



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0034692

(51)^{2013.01} A61L 24/00; A61L 15/28; A61L 15/32 (13) B

(21) 1-2020-02494

(22) 04/05/2020

(45) 25/01/2023 418

(43) 26/10/2020 391A1

(73) Viện Kỹ thuật nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A13, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thúy Chinh (VN); Thái Hoàng (VN); Hoàng Trần Dũng (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP CHẾ TẠO VẬT LIỆU CÀM MÁU TRÊN CƠ SỞ COLLAGEN
TỪ VẢY CÁ ĐƯỢC BIẾN TÍNH HÓA HỌC

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp chế tạo vật liệu trên cơ sở collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học và vật liệu thu được bằng phương pháp này. Phương pháp theo sáng chế, đặc trưng ở chỗ, là sử dụng công nghệ in 3D để tạo ra vật liệu trên cơ sở collagen được chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học ở tỷ lệ tối ưu, nhờ đó tạo ra vật liệu cầm máu với cấu trúc đồng đều, có khả năng cầm máu tốt hơn và thời gian đông máu nhanh hơn so với các vật liệu đã biết.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất phương pháp chế tạo vật liệu trên cơ sở collagen từ vảy cá nước ngọt (ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam) được biến tính hóa học có tác dụng cầm máu và vật liệu thu được bằng phương pháp này. Phương pháp theo sáng chế, đặc trưng là sử dụng công nghệ in 3D để tạo ra vật liệu cầm máu từ collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học ở tỷ lệ thích hợp. Vật liệu này với cấu trúc đồng đều, có khả năng cầm máu tốt hơn và thời gian đông máu nhanh hơn so với các vật liệu đã biết.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong phẫu thuật hiện đại, các chất kết dính mô ngày càng được sử dụng phổ biến để đóng vết thương bên trong và bên ngoài trong mô cơ thể và để kết nối hai phần mô tách biệt, đặc biệt là trong phẫu thuật xâm lấn tối thiểu. Để phát huy hiệu quả tối đa của các chất kết dính mô, chúng phải có khả năng bám dính tốt trên vết thương có bề mặt phẳng hay bề mặt không đồng đều. Một số phương pháp cầm máu thường được sử dụng trong thực tế như phương pháp hóa học, phương pháp cơ học, phương pháp dựa trên năng lượng/nhiệt, trong đó phương pháp hóa học là một trong những phương pháp phổ biến nhất được sử dụng hiện nay do tính tiện lợi, khả năng cầm máu nhanh và dễ sử dụng của nó. Các tác nhân cầm máu hóa học được phân chia thành các tác nhân được và các tác nhân cầm máu tại chỗ (tác nhân cầm máu thụ động và tác nhân cầm máu hoạt động). Các tác nhân cầm máu tại chỗ được sử dụng cho chảy máu khuếch tán từ bề mặt phúc mạc hoặc màng phổi, mặt cắt của các cơ quan rắn, mặt cắt xương, chảy máu dây thần kinh, gần các cấu trúc quan trọng có nguy cơ chấn thương, từ các cấu trúc mạch máu hoặc mảnh ghép do lỗ khâu, ổ răng, mũi... Tác nhân được gồm Epinephrine, vitamin K, protamine, desmopressin... Tác nhân cầm máu tại chỗ gồm tác nhân cầm máu thụ động (collagen vi sợi, collagen bột biển, màng

collagen, cellulose tái sinh oxy hóa, gelatin...) và tác nhân cầm máu hoạt động (thrombin). Tác nhân cầm máu thụ động hoạt động theo cơ chế tương tác với bề mặt chảy máu và thúc đẩy sự kết tụ tiểu cầu để hình thành cục máu đông. Một số sản phẩm cầm máu thụ động phổ biến gồm:

- Cellulose tái sinh oxy hóa (ORC): là một lưới vô trùng khô, có thể hấp thụ, được áp dụng trực tiếp vào một khu vực chảy máu tại mạch máu, bề mặt cắt của cơ quan rắn... Vật liệu cầm máu PAHACEL tiêu chuẩn sản xuất từ ORC của Thổ Nhĩ Kỳ có khả năng cầm máu nhanh trong vòng 2-3 phút, và tiêu hoàn toàn 7 tới 14 ngày. Có thể cắt, khâu sử dụng trong các phẫu thuật khác nhau.
- Vi sợi collagen (MC): thu được từ collagen da bò tinh khiết, được sử dụng trực tiếp trên vị trí chảy máu ở dạng bột hoặc màng, được hấp thụ hoàn toàn trong 3 tháng, có thời gian cầm máu ngắn hơn đáng kể so với ORC.
- Bột biển collagen: được chiết tách từ gân bò tinh khiết, được hấp phụ sau 8 – 10 tuần, có phản ứng với cơ thể lạ.
- Bột biển gelatin hấp thụ máu gấp 40 lần trọng lượng của nó, khi đó, kích thước của nó được mở rộng tới 200%. Xốp cầm máu gelatin vô trùng Scrofolon® có nguồn gốc từ lợn, an toàn hơn so với gelatin từ bò (có thể bị nhiễm bệnh bò điên). Nó dễ dàng bám dính vào nơi chảy máu. Có độ xốp đồng nhất giúp cho việc cầm máu thuận lợi. Nó được cơ thể hấp thụ hoàn toàn trong 3-4 tuần, không độc hại, không gây dị ứng, không gây miễn dịch, không sinh mụn, và đạt tính tương thích sinh học. Nhược điểm của gelatin là tăng tỷ lệ nhiễm trùng, u hạt và hình thành xơ hóa, tương tự như sản phẩm nền khô.
- Hạt vi cầu polysaccharide xốp (MPS): có nguồn gốc từ tinh bột khoai tây, làm tăng tốc độ hình thành cục máu đông bằng cách hoạt động như một rây phân tử để hấp thụ nước và cô đặc tiểu cầu và protein máu. MPS được sử dụng trong phẫu thuật thần kinh.
- Nền khô: Các tác nhân khô tạo thành một nền kích hoạt tăng đông máu và đóng vai trò là bộ khung mà trên đó huyết khối có thể dễ dàng hình thành. Các

tác nhân này rất dễ sử dụng; tuy nhiên, chúng ít hiệu quả hơn nếu chảy máu nhanh.

Các báo cáo cho thấy rằng thường thì việc cầm máu là không mấy khó khăn. Tuy nhiên, trong các trường hợp nặng, hiện tượng máu chảy nhiều và liên tục có thể dẫn đến sốc, rối loạn tuần hoàn máu hoặc gây ra các hậu quả nghiêm trọng khác. Trong một số trường hợp, tình trạng chảy máu không kiểm soát có thể gây tổn thương mô và các cơ quan trọng yếu của cơ thể, dẫn đến nguy cơ tử vong. Mất máu ở những bệnh nhân do chấn thương cũng là một nguyên nhân hàng đầu dẫn đến tái phẫu thuật. Hai thập niên trở lại đây, những tiến bộ trong công nghệ sinh học đã đưa đến sự phát triển bùng nổ của các chất hoặc vật liệu cầm máu tại chỗ.

Collagen là một loại protein chiếm tới 30% tổng lượng protein trong cơ thể người, collagen có chức năng chính là kết nối các mô trong cơ thể lại với nhau. Collagen được xem là giống như một chất keo dính các bộ phận trong cơ thể người lại thành một khối hoàn chỉnh, nếu không có chúng cơ thể người sẽ chỉ là các phần rời rạc. Collagen còn là yếu tố cần thiết trong quá trình tạo ra các axit amin tinh khiết cho sức khỏe của làn da, mái tóc, móng tay, khớp xương, các mô khác trên cơ thể người và là yếu tố quan trọng nhất giúp con người duy trì sự trẻ trung của mình. Trong tự nhiên, con người có thể bổ sung lượng collagen bằng cách sử dụng những loại thực phẩm có nhiều collagen như thịt, cá...

Collagen có nhiều ứng dụng trong thương mại và y sinh. Kể từ khi được phát hiện, collagen đã được sử dụng một cách rộng rãi trong các loại vật liệu cầm máu nhờ tác dụng cầm máu hiệu quả của nó. Cụ thể hơn, hợp chất này có khả năng thúc đẩy quá trình đông máu, kích thích liền vết thương và không độc hại. Một số sản phẩm cầm máu thương mại trên cơ sở collagen được sử dụng rộng rãi trên thế giới và ở trong nước gồm Avitene (vi sợi collagen; MedChem

Products), Actifoam (bọt biển collagen; MedChem Products), Helistat (bọt biển collagen sponge, Plainsboro, NJ), Instat (bọt biển collagen, Arlington, TX). Cơ chế cầm máu của collagen là tạo phức hệ prothrombinase làm nhiệm vụ chuyển prothrombin thành thrombin-chất có vai trò rất lớn trong đông cầm máu. Fibrinogen dưới tác dụng của thrombin sẽ tạo ra lưới fibrin giữ chặt tiểu cầu và các thành phần khác của máu tạo nên cục máu ổn định vững chắc có đủ khả năng cầm máu. Ưu điểm của miếng cầm máu collagen là khả năng cầm máu nhanh, phản ứng mô thấp và hấp thu nhanh, ngoài ra, phần dư thừa miếng dán không gây ra sự tái chảy máu.

Hiện nay, các nghiên cứu này chủ yếu sử dụng collagen chiết tách từ da bò hoặc da lợn, nhược điểm của các loại collagen từ nguồn động vật hay từ con người là khả năng lây nhiễm các loại bệnh truyền nhiễm như bệnh viêm não thể bọt biển ở bò, bệnh lở mồm long móng ở lợn hay HIV ở người. Collagen có thể được biến tính hóa học hoặc vật lý để tăng khả năng bám dính với bề mặt chảy máu tốt hơn và thời gian cầm máu nhanh hơn đáng kể so với collagen không biến tính. Các vật liệu được chế tạo chủ yếu bằng phương pháp dung dịch bốc hơi dung môi. Nói cách khác, nghiên cứu phát triển vật liệu có khả năng cầm máu trên cơ sở collagen chiết tách từ vảy cá được biến tính hóa học bằng công nghệ in 3D còn rất hạn chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết theo sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp chế tạo vật liệu trên cơ sở collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học có tác dụng cầm máu và vật liệu thu được bằng phương pháp này với cấu trúc đồng đều, có khả năng cầm máu tốt hơn và thời gian đông máu nhanh hơn so với các vật liệu đã biết.

Cách thức giải quyết vấn đề

Cụ thể hơn, để đạt được mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để chế tạo vật liệu cầm máu trên cơ sở collagen được chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học có tác dụng cầm máu, phương pháp này bao gồm các bước:

- i) chiết tách collagen từ vảy cá nước ngọt bằng phương pháp hóa sinh trong dung dịch axit axetic và pepsin, sau đó, collagen thu được được thẩm tích trong nước cất và li tâm thu được dạng gel collagen;
- ii) chuẩn bị mẫu gel collagen biến tính hóa học bằng riboflavin và ginsenosit Rb1, kèm khuấy siêu âm;
- iii) chuẩn bị mẫu gel collagen biến tính hóa học bằng glutaraldehyt và ginsenosit Rb1, kèm khuấy siêu âm;
- iv) các mẫu gel ở bước ii) hoặc iii) được đưa vào xi lanh và được xem như mực in và được lắp vào thiết bị in 3D;
- v) Quá trình in 3D được tiến hành như sau: Trước tiên, mẫu in được thiết kế trên phần mềm vẽ 3D (SolidWorks), kích thước mẫu $80 \times 80 \times 0,4$ (mm), sau đó, mẫu thiết kế được chuyển sang định dạng .stl và được tính toán tạo tập lệnh G-code trên phần mềm KISSlicer, các thông số tính toán như sau: độ dày lớp in 0,2 mm, độ rộng đường in 0,6 mm, độ điền đầy 33%, tốc độ in 10 mm/s, nhiệt độ bàn in là nhiệt độ phòng, tiếp theo, tệp lệnh sau thiết kế được chuyển vào thẻ nhớ SD của máy in để tiến hành in mẫu, trong quá trình in, máy in điều khiển đẩy hỗn hợp mực in trong xy lanh ở bước iv) để phủ lên để in, sau khi hoàn thành một lượt in, máy in có thể được điều khiển để in lượt sau phủ lên lượt trước để tạo độ dày cần thiết cho sản phẩm;
- vi) để bay hơi tự nhiên các màng thu được ở bước v) để thu được các vật liệu cầm máu trên cơ sở collagen có độ dày 0,2-1 mm;
- vii) sản phẩm vật liệu cầm máu được bảo quản trong ống PE kín.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất vật liệu cầm máu, đặc trưng ở chỗ, vật liệu này là vật liệu trên cơ sở collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học được chế tạo bằng phương pháp in 3D theo khía cạnh nêu trên.

Theo một phương án ưu tiên của vật liệu cầm máu, vật liệu cầm máu này là ở dạng màng.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp chế tạo vật liệu trên cơ sở collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học có tác dụng cầm máu và vật liệu thu được bằng phương pháp này với cấu trúc đồng đều, có khả năng cầm máu tốt hơn và thời gian đông máu nhanh hơn so với các vật liệu đã biết. Cụ thể hơn, khi so với mẫu đối chứng có thời gian đông máu lâu, mẫu vật liệu theo sáng chế có thời gian đông máu nhỏ hơn các đối chứng rất nhiều (mà sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây).

Ngoài ra, giải pháp theo sáng chế được cho là không chỉ hoàn toàn khác biệt với các giải pháp đã biết xét về công nghệ chế tạo mẫu, hình dạng sản phẩm, thành phần vật liệu và lượng tương ứng, v.v., mà còn có thể dùng làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực công nghệ vật liệu mới. Nói cách khác, sáng chế giải quyết được vấn đề cả về tính thực tiễn và học thuật. Cụ thể là, giải pháp theo sáng chế phù hợp với điều kiện chế tạo và ứng dụng tại Việt Nam và còn được sử dụng làm cơ sở tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể minh họa và mô tả chi tiết hơn nữa cho sáng chế. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, các phương án cụ thể sau đây được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế

và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể này. Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở các nội dung mô tả trong bản mô tả này, có thể thực hiện các phương án tương đương mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế như được mô tả trong yêu cầu bảo hộ kèm theo sau đây.

Phương pháp chế tạo vật liệu cầm máu trên cơ sở collagen được biến tính hóa học bằng công nghệ in 3D

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chế tạo vật liệu cầm máu trên cơ sở collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học bằng công nghệ in 3D, phương pháp này bao gồm các bước:

- i) chiết tách collagen từ vảy cá nước ngọt bằng phương pháp hóa sinh trong dung dịch axit axetic nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3% và pepsin (0,1-3 % khối lượng so với khối lượng vảy cá), sau đó, collagen thu được được thẩm tích trong nước cất trong 48 giờ và li tâm thu được collagen dạng gel;
- ii) chuẩn bị mẫu gel collagen biến tính hóa học bằng riboflavin và ginsenosit Rb1 với tỷ lệ khối lượng collagen/riboflavin/ginsenosit Rb1 100/30/40-100/1/1, kèm khuấy siêu âm, thể tích mẫu trong khoảng 0,5 đến 6 mL;
- iii) chuẩn bị mẫu gel collagen biến tính hóa học bằng glutaraldehyt và ginsenosit Rb1, với tỷ lệ khối lượng collagen/glutaraldehyt/ginsenosit Rb1 500/1/200-200/1/2, kèm khuấy siêu âm thể tích mẫu trong khoảng 0,5 đến 6 mL;
- iv) các mẫu gel ở bước ii) hoặc iii) được đưa vào xi lanh và được xem như mực in và được lắp vào thiết bị in 3D;
- v) Quá trình in 3D được tiến hành như sau: Trước tiên, mẫu in được thiết kế trên phần mềm vẽ 3D (SolidWorks), kích thước mẫu 80×80×0,4 (mm), sau

đó, mẫu thiết kế được chuyển sang định dạng .stl và được tính toán tạo tập lệnh G-code trên phần mềm KISSlicer, các thông số tính toán như sau: độ dày lớp in 0,2 mm, độ rộng đường in 0,6 mm, độ điền đầy 33%, tốc độ in 10 mm/s, nhiệt độ bàn in là nhiệt độ phòng, tiếp theo, tệp lệnh sau thiết kế được chuyển vào thẻ nhớ SD của máy in để tiến hành in mẫu, trong quá trình in, máy in điều khiển đầy hỗn hợp mực in trong xy lanh ở bước iv) để phủ lên đế in, sau khi hoàn thành một lượt in, máy in có thể được điều khiển để in lượt sau phủ lên lượt trước để tạo độ dày cần thiết cho sản phẩm;

vi) để bay hơi tự nhiên các màng thu được ở bước v) để thu được các vật liệu cầm máu trên cơ sở collagen có độ dày 0,2-1 mm;

vii) sản phẩm vật liệu cầm máu được bảo quản trong ống PE kín.

Theo một phương án được ưu tiên, dung dịch axit axetic được sử dụng trong bước i) tốt hơn là có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2%, tốt nhất là 1% để tạo thuận lợi cho quá trình tạo ra collagen có cấu trúc vi sợi và nhờ đó tăng khả năng cầm máu.

Theo một phương án được ưu tiên, pepsin được sử dụng trong bước i) tốt hơn là có khối lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 3 %, tốt nhất là 2% so với khối lượng vảy cá để tạo thuận lợi cho quá trình tạo ra collagen có cấu trúc vi sợi và nhờ đó tăng khả năng cầm máu.

Theo một phương án được ưu tiên, thể tích các mẫu gel collagen biến tính trong các bước ii) hoặc iii) nằm trong khoảng từ 1 đến 3 mL, tốt nhất là 2 mL để tạo thuận lợi cho quá trình tạo ra màng vật liệu cầm máu có cấu trúc và độ dày đồng đều, nhờ đó tăng khả năng cầm máu.

Theo một phương án được ưu tiên, riboflavin được sử dụng trong bước ii) tốt hơn là có khối lượng nằm trong khoảng từ 10-25 %, tốt nhất là 20 % để tạo thuận lợi cho quá trình biến tính hóa học collagen và nhờ đó tăng khả năng cầm

máu. Riboflavin là chất biến tính hóa học tối ưu nhất theo sáng chế với mục đích tạo ra vật liệu collagen biến tính có khả năng cầm máu tốt. Tuy nhiên, theo phương án khác, các hợp chất tương đương và/hoặc có đặc tính tương đương tạo ra kết quả mong muốn tương đương thông dụng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đều có thể sử dụng theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, glutaraldehyt được sử dụng trong bước iii) tốt hơn là có khối lượng nằm trong khoảng từ 0,3-1 %, tốt nhất là 0,5 % để tạo thuận lợi cho quá trình biến tính hóa học collagen và nhờ đó tăng khả năng cầm máu. Glutaraldehyt là chất biến tính hóa học tối ưu nhất theo sáng chế với mục đích tạo ra vật liệu collagen biến tính có khả năng cầm máu tốt. Tuy nhiên, theo phương án khác, các hợp chất tương đương và/hoặc có đặc tính tương đương tạo ra kết quả mong muốn tương đương thông dụng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đều có thể sử dụng theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, ginsenosit Rb1 được sử dụng trong bước ii) hoặc bước iii) tốt hơn là có khối lượng nằm trong khoảng từ 20-40 %, tốt nhất là 30 % để tạo thuận lợi cho quá trình biến tính hóa học collagen và nhờ đó tăng khả năng cầm máu. Mặc dù ginsenosit bất kỳ đều có được sử dụng một cách thích hợp theo sáng chế, tuy nhiên theo một phương án được ưu tiên, ginsenosit được sử dụng trong sáng chế là ginsenosit Rb1, tốt hơn nữa nếu hợp chất này được chiết tách từ bột củ Tam thất, như sản phẩm do Viện Dược liệu cung cấp ở dạng bột màu trắng với độ tinh khiết lớn hơn 90%. Tuy nhiên, ginsenosit Rb1 thương mại hoặc chiết tách từ bột củ Tam thất được trồng ở các địa phương khác hay quốc gia khác đều có thể được sử dụng một cách thích hợp theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, thiết bị in 3D được sử dụng trong bước iv) tốt hơn là thiết bị được chế tạo bởi Viện Kỹ thuật nhiệt đới. Thiết bị này tùy biến trên cơ sở máy in vật liệu dạng sợi theo công nghệ FDM với việc

thay cơ cấu đầu in sợi bằng cơ cấu đầu in lỏng; Kích thước vùng in $190 \text{ mm} \times 190 \text{ mm} \times 120 \text{ mm}$; Độ phân dải chuyển động theo trục X và Y: $0,01 \text{ mm}$; Độ phân dải chuyển động theo trục Z và E (đẩy mực): $0,0025 \text{ mm}$; Tốc độ in: từ 1 đến 20 mm/s ; Nhiệt độ bàn in: điều khiển được từ nhiệt độ môi trường đến 100°C ; Độ dày lớp in $\geq 0,1 \text{ mm}$; Vật liệu in dạng lỏng. Tuy nhiên, theo phương án khác, các thiết bị in 3D dành cho vật liệu dạng gel hoặc dạng lỏng đều có thể được sử dụng một cách thích hợp theo sáng chế.

Theo một phương án khác, kích thước mẫu in được thiết kế trong bước v) có thể được thiết kế tùy theo nhu cầu và mục đích sử dụng.

Theo một phương án khác, độ dày lớp in trong bước v) có thể thay đổi từ $0,1-1 \text{ mm}$ tùy thuộc vào kích thước đầu in sử dụng.

Theo một phương án khác, độ rộng đường in trong bước v) có thể thay đổi từ $0,1-1 \text{ mm}$ tùy thuộc vào kích thước đầu in sử dụng.

Theo một phương án khác, độ điền đầy trong bước v) có thể thay đổi từ $0-100 \%$ tùy thuộc vào hình dạng sản phẩm mong muốn.

Theo một phương án khác, tốc độ in trong bước v) có thể thay đổi từ $1-20 \text{ mm/s}$ tùy thuộc vào hình dạng sản phẩm mong muốn.

Theo một phương án được ưu tiên, chiều dày các màng vật liệu cầm máu trên cơ sở collagen trong bước vi) tốt hơn là có độ dày nằm trong khoảng từ $0,2-0,6 \text{ mm}$, tốt nhất là $0,4 \text{ mm}$ để tạo thuận lợi cho quá trình tạo ra màng vật liệu cầm máu có cấu trúc và độ dày đồng đều, nhờ đó tăng khả năng cầm máu.

Cần lưu ý rằng, các bước, hóa chất sử dụng và điều kiện thực hiện trên đây được xem là thích hợp nhất để thực hiện phương pháp theo sáng chế để thu được sản phẩm cuối có cấu trúc đồng đều, có khả năng cầm máu tốt hơn và thời gian đông máu nhanh hơn so với các vật liệu đã biết. Tuy nhiên, các hóa chất sử dụng và điều kiện thực hiện mà tạo ra kết quả tương đương cũng có thể được sử

dụng theo sáng chế. Ví dụ, thay vì sử dụng collagen ở dạng gel, có thể sử dụng collagen ở dạng dung dịch, tuy nhiên cần điều chỉnh quy trình in để thu được vật liệu cầm máu mong muốn.

Theo một phương án khác, sản phẩm sau khi để bay hơi tự nhiên ở dạng màng, dễ quan sát. Sau đó, sản phẩm sẽ được bảo quản trong ống kín ở nhiệt độ phòng. Theo một phương án cụ thể, sản phẩm tốt hơn là được bảo quản trong ống polyetylen (Polyethylene – PE) kín ở nhiệt độ phòng, mặc dù bảo quản trong ống nhựa kín khác cũng có thể được thực hiện.

Vật liệu cầm máu

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất vật liệu, đặc trưng ở chỗ, vật liệu này là vật liệu trên cơ sở collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học với glutaraldehyt và ginsenosit Rb1 hoặc riboflavin và ginsenosit Rb1 được sản xuất bằng phương pháp theo khía cạnh bất kỳ trên đây. Vật liệu thu được theo phương pháp của sáng chế thể hiện khả năng cầm máu tốt nhờ có cấu trúc đồng đều, do đó có khả năng cầm máu tốt hơn (so với mẫu đối chứng như được mô tả sau đây).

Không có bất kỳ giới hạn nào đối với collagen mà được sử dụng theo sáng chế. Do đó, collagen có nguồn gốc bất kỳ hoặc collagen có bán sẵn trên thị trường đều có thể được sử dụng theo sáng chế. Tuy nhiên, theo một phương án được ưu tiên, collagen mà được chiết tách từ vảy cá nước ngọt bằng axit axetic và pepsin, có thể được sử dụng một cách thích hợp theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, collagen tốt hơn là được sử dụng ở dạng gel theo sáng chế. Nếu sử dụng collagen ở dạng dung dịch, cần kết hợp nhiều điều kiện chế tạo mới có thể thu được màng bằng phương pháp đề xuất trong sáng chế này.

Theo một phương án được ưu tiên, collagen tốt hơn là được biến tính hóa học với glutaraldehyt và ginsenosit Rb1 hoặc riboflavin và ginsenosit Rb1 theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, collagen tốt hơn là được biến tính hóa học với riboflavin và ginsenosit Rb1 theo sáng chế.

Theo một phương án khác, vật liệu theo sáng chế được tạo ra ở dạng màng, tốt hơn là các màng có độ dày 0,4 mm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả chi tiết hơn nữa thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng, các ví dụ này không làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Nguyên liệu, hoá chất

- Vây cá nước ngọt thu thập từ các chợ ở khu vực thị xã Vĩnh Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, glutaraldehyt, riboflavin, pepsin từ hãng Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ) sản xuất, ginsenosit Rb1 được chiết tách từ bột củ tam thất do Viện Dược liệu cung cấp ở dạng bột màu trắng với độ tinh khiết lớn hơn 90%;

- Một số hóa chất và dung môi khác là các sản phẩm thương mại của Việt Nam và Trung Quốc.

Ví dụ 1: Chiết tách collagen từ vây cá

Mẫu vây cá được rửa sạch (300 g), sau đó ngâm vây cá trong dung dịch NaOH 0,1M ở 4 °C trong 8 giờ, kết hợp khuấy cơ. Sau đó, lọc thu vây cá, rửa sạch vây cá với nước. Tiếp tục ngâm vây cá thu được trong hỗn hợp axit HCl 0,2M và H₂SO₄ 0,5M trong 30 phút ở 4 °C, kết hợp khuấy cơ, sau đó lọc thu vây cá, rửa sạch vây cá với nước cất. Tiếp tục ngâm vây cá thu được trong dung dịch axit axetic 0,5 M và pepsin (6 g) trong 24 giờ ở 4 °C, kết hợp khuấy cơ và khuấy siêu âm tốc độ cao. Lọc thu dung dịch collagen trong axit axetic, phần

chất rắn được thu gom để xử lý chôn lấp. Thêm NaCl rắn vào dung dịch collagen trong axit axetic ở trên, làm lạnh dung dịch để collagen kết tủa. Sau đó hút bỏ nước và li tâm thu được collagen. Thẩm tích collagen bằng màng thẩm tích có MWCO 12000 trong 48 giờ để thu collagen dạng gel.

Ví dụ 2: Chế tạo vật liệu cầm máu

Ví dụ 2-1: Vật liệu cầm máu collagen biến tính với glutaraldehyt và ginsenosit Rb1

Cụ thể, glutaraldehyt, ginsenosit Rb1 và gel collagen được cân chính xác khối lượng, sau đó nhỏ từ từ glutaraldehyt vào gel collagen, kết hợp khuấy siêu âm để tăng độ đồng đều của mẫu. Tiếp tục thêm ginsenosit Rb1 vào hỗn hợp trên, kết hợp khuấy siêu âm để tăng độ đồng đều của mẫu. Hỗn hợp gel collagen biến tính glutaraldehyt và ginsenosit Rb1 được đưa vào xi lanh và được lắp vào thiết bị in 3D. Quá trình in 3D được tiến hành như sau: Trước tiên, mẫu in được thiết kế trên phần mềm vẽ 3D (SolidWorks), kích thước mẫu 80×80×0,4 (mm). Mẫu thiết kế sau đó được chuyển sang định dạng .stl và được tính toán tạo tập lệnh G-code trên phần mềm KISSlicer. Thông số tính toán như sau: độ dày lớp in 0,2 mm, độ rộng đường in 0,6 mm, độ điền đầy 33%, tốc độ in 10 mm/s, nhiệt độ bàn in là nhiệt độ phòng. Tập lệnh sau thiết kế được chuyển vào thẻ nhớ SD của máy in để tiến hành in mẫu. Trong quá trình in, máy in điều khiển đẩy hỗn hợp gel collagen biến tính glutaraldehyt và ginsenosit Rb1 trong xy lanh để phủ lên đế in. Sau khi hoàn thành một lượt in, máy in có thể được điều khiển để in lượt sau phủ lên lượt trước để tạo độ dày cần thiết cho sản phẩm. Để bay hơi tự nhiên thu được vật liệu cầm máu collagen có độ dày 0,4 mm. Sản phẩm vật liệu cầm máu được bảo quản trong ống PE kín.

Thí nghiệm này được lặp lại thêm 02 lần (tổng 03 mẫu).

Ví dụ 2-2: Vật liệu cầm máu collagen biến tính với riboflavin và ginsenosit Rb1

Cụ thể, riboflavin, ginsenosit Rb1 và gel collagen được cân chính xác khối lượng, sau đó thêm riboflavin vào gel collagen, kết hợp khuấy siêu âm để tăng độ đồng đều của mẫu. Tiếp tục thêm ginsenosit Rb1 vào hỗn hợp trên, kết hợp khuấy siêu âm để tăng độ đồng đều của mẫu. Hỗn hợp gel collagen biến tính riboflavin và ginsenosit Rb1 được đưa vào xi lanh và được lắp vào thiết bị in 3D. Quá trình in 3D được tiến hành như sau: Trước tiên, mẫu in được thiết kế trên phần mềm vẽ 3D (SolidWorks), kích thước mẫu $80 \times 80 \times 0,4$ (mm). Mẫu thiết kế sau đó được chuyển sang định dạng .stl và được tính toán tạo tập lệnh G-code trên phần mềm KISSlicer. Thông số tính toán như sau: độ dày lớp in 0,2 mm, độ rộng đường in 0,6 mm, độ điền đầy 33%, tốc độ in 10 mm/s, nhiệt độ bàn in là nhiệt độ phòng. Tập lệnh sau thiết kế được chuyển vào thẻ nhớ SD của máy in để tiến hành in mẫu. Trong quá trình in, máy in điều khiển đẩy hỗn hợp gel collagen biến tính riboflavin và ginsenosit Rb1 trong xy lanh để phủ lên để in. Sau khi hoàn thành một lượt in, máy in có thể được điều khiển để in lượt sau phủ lên lượt trước để tạo độ dày cần thiết cho sản phẩm. Để bay hơi tự nhiên thu được vật liệu cầm máu collagen có độ dày 0,4 mm. Sản phẩm vật liệu cầm máu được bảo quản trong ống PE kín.

Thí nghiệm này được lặp lại thêm 02 lần (tổng 03 mẫu).

Ví dụ 3: Đặc trưng của vật liệu

Các vật liệu được điều chế còn được xác định các đặc trưng vật liệu. Kết quả được thể hiện trong các Bảng sau đây.

Bảng 1: Vị trí các pic dao động của một số nhóm đặc trưng trong các mẫu vật liệu cầm máu

Mẫu	Số sóng (cm^{-1})					
	$\nu_{\text{OH, NH}}$	$\nu_{\text{C-H}}$	$\nu_{\text{C=O, C=C}}$	δ_{NH}	δ_{CH}	$\nu_{\text{C-O, C-C}}$
Collagen	3277,	2934	1630	1538	1452,	1238,

	3072				1394	1081
Collagen biến tính glutaraldehyt và ginsenosit Rb1	3288, 3077	2970	1633	1542	1452, 1393	1238, 1074
Collagen biến tính riboflavin và ginsenosit Rb1	3292, 3088	2939	1731, 1643	1540	1454, 1396	1240, 1069

Bảng 2: Thành phần nguyên tố và nhiệt độ biến tính của các mẫu vật liệu cầm máu

Nguyên tố (%) Mẫu	C	O	N	S	Ca + Cl	Nhiệt độ biến tính (°C)
Collagen	49,98	27,31	21,04	0,71	0,96	41
Collagen biến tính glutaraldehyt và ginsenosit Rb1	54,25	31,08	14,06	0,35	0,26	39-41
Collagen biến tính riboflavin và ginsenosit Rb1	53,30	29,43	16,43	0,35	0,49	39-41

Bảng 3: Hàm lượng axit amin của các mẫu vật liệu cầm máu

Axit amin	Collagen	Collagen biến tính glutaraldehyt và ginsenosit Rb1	Collagen biến tính riboflavin và ginsenosit Rb1
	% (theo diện tích pic)*		
Aspartate	1,847	0,409	0,588

Glutamate	1,793	-	0,571
Serine	0,704	0,690	0,261
Histidine	0,662	0,426	0,050
Glycine	3,695	9,075	59,052
Threonine	0,501	-	-
Arginine	22,913	13,865	1,476
Alanine	-	-	3,712
Tyrosine	2,158	-	0,639
Cystine	0,936	0,354	0,815
Valine	0,438	-	0,248
Methionine	4,184	2,223	0,726
Phenylalanine	0,639	0,377	0,269
Isoleucine	3,076	0,492	0,410
Leusine	1,275	0,901	0,531
Lysine	0,386	0,370	0,051
Proline	0,863	-	0,380

**pic phổ axit amin chuẩn thu được trên thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)*

Để đánh giá khả năng cảm máu của vật liệu chế tạo được, các mẫu được chuyển đến Học viện Quân y, Bệnh viện Quân y 103 để thử nghiệm.

Máu được thu thập từ người tình nguyện khỏe mạnh, người không uống bất kỳ loại thuốc nào có hoạt tính tiểu cầu trong 10 ngày trước đó. Quá trình thử nghiệm như sau:

1 mL máu toàn phần được nhỏ giọt trực tiếp từ đường tĩnh mạch (lấy tại vùng mắt trước khuỷu tay) vào một bộ ống 5 mL chứa 10 mg mẫu, hoặc không có gì (mẫu đối chứng). Không có thuốc chống đông máu được sử dụng.

Sau khi 1 mL máu được đưa vào ống, nắp được đậy và từ từ đảo ngược liên tục cho đến khi hình thành cục máu đông. Số giây (s) cho đến khi hình thành cục máu đông được ghi lại cho mỗi ống. Các cá nhân đánh giá sự hình thành cục máu đông bị mù với nội dung của các ống. Kết quả thu được sau thử nghiệm được thống kê trong Bảng 4.

Bảng 4: Thời gian đông máu của các mẫu vật liệu cầm máu

Mẫu	Thời gian đông máu (giây)
Mẫu đối chứng	541
Ginsenosit Rb1	557
Riboflavin	363
Collagen	223
Collagen biến tính glutaraldehyt và ginsenosit Rb1	127
Collagen biến tính riboflavin và ginsenosit Rb1	184

Bảng 5. Thời gian đông máu và giá thành của một số sản phẩm cầm máu thương mại

Mẫu	Thành phần chính	Thời gian trung bình để cầm máu (giây)	Giá thành
Floseal®	Gelatin, canxi clorit và huyết tương có nguồn gốc từ người	170	262 USD (5 ml)
Surgiflo®	Gelatin lợn, thrombin JMI	121	325 USD

PAHACEL Standard	Cellulose tái sinh oxy hóa	72-180	190 USD
Surgicel®	Cellulose tái sinh oxy hóa	320-468	12-20 USD
Evicel®	Protein clottable của con người (chủ yếu là fibrinogen của con người) và thrombin của con người	282	340 USD (5 ml)
Gelfoam®	Gelatin lợn	300-480	80-120 USD
Helistat®	Bột biển collagen (collagen bò)	200	225 USD
Instat®	Bột biển collagen (collagen bò)	300	294 USD
Actifoam®	Bột biển collagen (collagen bò)	220	290 USD
Avitene®	Vi sợi collagen	250	350-550 USD

Như được thể hiện trong Bảng 4, kết quả cho thấy:

- Mẫu máu đối chứng cần thời gian đông máu khá lâu nếu để tự nhiên (khoảng 9 phút);
- Các mẫu ginsenosit Rb1, riboflavin đều có khả năng cầm máu;
- ***Các mẫu vật liệu collagen và collagen biến tính theo sáng chế có thời gian cầm máu nhỏ hơn mẫu chứng rất nhiều;***
- Các mẫu collagen biến tính theo sáng chế có thời gian cầm máu nhỏ hơn so với mẫu collagen ban đầu;
- Mẫu collagen biến tính glutaraldehyt và ginsenosit Rb1 theo sáng chế có thời gian cầm máu nhỏ hơn so với các mẫu collagen biến tính khác. Điều này có thể do cấu trúc đồng đều và khả năng liên kết ngang của glutaraldehyt với collagen tốt hơn làm cho mẫu có khả năng cầm máu tốt hơn. Kết quả này mở ra triển vọng ứng dụng của vật liệu cầm máu dạng màng theo sáng chế.
- So sánh thời gian cầm máu của 2 loại vật liệu cầm máu theo sáng chế (collagen biến tính glutaraldehyt và ginsenosit Rb1 và collagen biến tính

riboflavin và ginsenosit Rb1) với một số sản phẩm cầm máu thương mại trên thế giới đang bán có thể thấy các vật liệu cầm máu sản xuất theo phương án của sáng chế có thời gian đông máu nhỏ hơn. Thành phần chính của vật liệu là collagen được chiết tách từ phế thải vảy cá nước ngọt, vật liệu được sản xuất hoàn toàn ở trong nước nên giá thành rẻ hơn nhiều so với các sản phẩm thương mại.

Sáng chế đã được mô tả thông qua các phương án và ví dụ cụ thể minh họa cho sáng chế liên quan đến các hiệu quả kỹ thuật cụ thể và hiệp đồng mà sáng chế tạo ra. Các hóa chất được sử dụng theo sáng chế là thông dụng đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này và do đó người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng thu mua từ các nguồn hoặc nhà cung cấp, hoặc có thể điều chế theo các phương pháp thông dụng đã biết trong lĩnh vực này.

Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, các phương án và ví dụ được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án và ví dụ này. Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở các nội dung mô tả trong bản mô tả này, có thể thực hiện các phương án biến đổi tương đương mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế như được mô tả trong yêu cầu bảo hộ kèm theo sau đây.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề xuất phương pháp chế tạo vật liệu trên cơ sở collagen được chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học có tác dụng cầm máu và vật liệu thu được bằng phương pháp này. Phương pháp theo sáng chế, đặc trưng ở chỗ, là sử dụng công nghệ in 3D để tạo ra vật liệu trên cơ sở collagen được chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học ở tỷ lệ tối ưu, nhờ đó tạo ra vật liệu cầm máu với cấu trúc đồng đều, có khả năng cầm máu tốt hơn và thời gian đông máu nhanh hơn so với các vật liệu đã biết. Vật liệu cầm máu trong sáng chế này được tạo ra từ các nguyên vật liệu sẵn có trong nước.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp chế tạo vật liệu cầm máu trên cơ sở collagen chiết tách từ vảy cá nước ngọt được biến tính hóa học, phương pháp này bao gồm các bước:

i) chiết tách collagen từ vảy cá nước ngọt bằng phương pháp hóa sinh trong dung dịch axit axetic và pepsin, sau đó, collagen thu được được thẩm tích trong nước cất và ly tâm thu được dạng gel collagen;

ii) chuẩn bị mẫu gel collagen biến tính hóa học bằng riboflavin và ginsenosit Rb1, kèm khuấy siêu âm;

iii) chuẩn bị mẫu gel collagen biến tính hóa học bằng glutaraldehyt và ginsenosit Rb1, kèm khuấy siêu âm;

iv) các mẫu gel ở bước ii) hoặc iii) được đưa vào xi lanh và được xem như mực in và được lắp vào thiết bị in 3D (thiết bị là sản phẩm nghiên cứu của Viện Kỹ thuật nhiệt đới);

v) Quá trình in 3D được tiến hành như sau: Trước tiên, mẫu in được thiết kế trên phần mềm vẽ 3D (SolidWorks), kích thước mẫu $80 \times 80 \times 0,4$ (mm), sau đó, mẫu thiết kế được chuyển sang định dạng .stl và được tính toán tạo tập lệnh G-code trên phần mềm KISSlicer, các thông số tính toán như sau: độ dày lớp in 0,2 mm, độ rộng đường in 0,6 mm, độ điền đầy 33%, tốc độ in 10 mm/s, nhiệt độ bàn in là nhiệt độ phòng, tiếp theo, tệp lệnh sau thiết kế được chuyển vào thẻ nhớ SD của máy in để tiến hành in mẫu, trong quá trình in, máy in điều khiển đẩy hỗn hợp mực in trong xy lanh ở bước iv) để phủ lên đế in, sau khi hoàn thành một lượt in, máy in có thể được điều khiển để in lượt sau phủ lên lượt trước để tạo độ dày cần thiết cho sản phẩm;

vi) để bay hơi tự nhiên các màng thu được ở bước v) để thu được các vật liệu cầm máu trên cơ sở collagen có độ dày 0,2-1 mm;

vii) sản phẩm vật liệu cầm máu được bảo quản trong ống PE kín.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch axit axetic trong bước i) có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2%, tốt hơn là 1%.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó pepsin trong bước i) có khối lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 3 %, tốt nhất là 2%.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thể tích các mẫu gel collagen biến tính trong bước ii) và iii) nằm trong khoảng từ 1 đến 3 mL, tốt nhất là 2 mL.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó glutaraldehyt được sử dụng trong bước iii) có khối lượng nằm trong khoảng từ 0,3-1 %, tốt nhất là 0,5 %.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó riboflavin được sử dụng trong bước ii) có khối lượng nằm trong khoảng từ 10-25 %, tốt nhất là 20 %.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ginsenosit Rb1 được sử dụng trong bước ii) và iii) có khối lượng nằm trong khoảng từ 20-40 %, tốt nhất là 30 %.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kích thước mẫu in, độ dày lớp in, độ rộng đường in, độ điền đầy, tốc độ in được thiết kế tùy thuộc vào hình dạng sản phẩm mong muốn.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó sản phẩm thu được ở dạng màng.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó chiều dày các màng vật liệu cầm máu tốt hơn là có độ dày nằm trong khoảng từ 0,2-0,6 mm, tốt nhất là 0,4 mm.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó sản phẩm được bảo quản trong ống polyetylen (Polyethylene – PE) kín ở nhiệt độ phòng.