



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

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

(11)



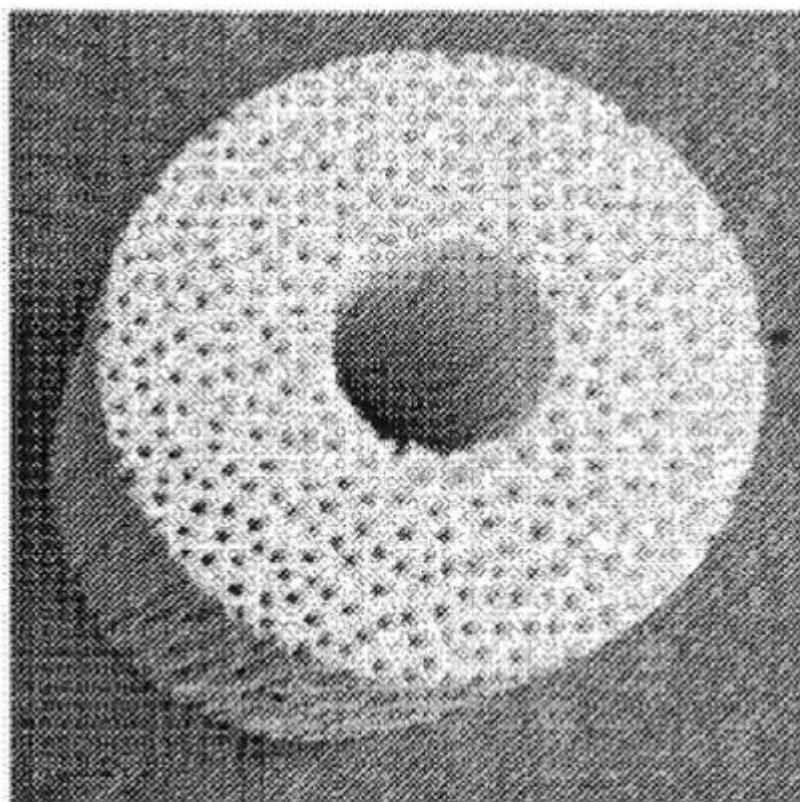
1-0036110

(51)⁷ A61L 27/12; A61L 27/56; A61L 27/36 (13) B

-
- (21) 1-2018-00851 (22) 03/08/2016
(86) PCT/IB2016/054665 03/08/2016 (87) WO 2017/021894 09/02/2017
(30) 102015000042834 06/08/2015 IT; 102015000042762 06/08/2015 IT
(45) 26/06/2023 423 (43) 27/08/2018 365A
(73) GREENBONE ORTHO S.R.L. (IT)
Via Albert Einstein 8 48018 Faenza (Ravenna) Italy
(72) TAMPIERI, Anna (IT); SPRIO, Simone (IT); RUFFINI, Andrea (IT).
(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)
-

(54) KHUNG HYDROXYPATIT SINH HỌC THU ĐƯỢC TỪ GỖ, BỘ PHẬN THAY THẾ XƯƠNG, QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHUNG NÀY VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT BỘ PHẬN THAY THẾ XƯƠNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ xộp, có độ bền nén cao và kích thước thích hợp cho các ứng dụng lâm sàng. Gỗ xộp có độ xộp nằm trong khoảng 60-95%, độ xộp này được đo sau khi đưa gỗ qua bước nhiệt phân và gỗ được lựa chọn trong số các loại gỗ mây, thông, abachi, balsa, sipo, sồi, cẩm lai, kempas và gỗ óc chó. Hydroxyapatit có thể được thay thế bằng một hoặc nhiều ion như magie, stronti, silic, titan, cacbonat, kali, natri, bạc, gali, đồng, sắt, kẽm, mangan, europi, gadolini. Sáng chế cũng đề xuất bộ phận thay thế xương bao gồm khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ xộp. Bộ phận thay thế xương này được sử dụng để thay thế và tái tạo xương hoặc một phần xương, tốt nhất là cho xương chịu tải cơ học, như xương dài của chân và tay, tốt hơn là xương chày, xương ống chân, xương đùi, xương cánh tay và xương quay. Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất khung hydroxyapatit sinh học từ gỗ và quy trình sản xuất bộ phận thay thế xương bao gồm khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hydroxyapatit thu được từ gỗ xốp. Cụ thể, sáng chế đề cập đến xương nhân tạo làm từ hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ xốp để sử dụng thay thế xương. Sáng chế cũng đề cập đến quá trình biến đổi gỗ thành khung hydroxyapatit sinh học để sử dụng thay thế xương.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kỹ thuật và quy trình gia công gốm hiện nay dựa trên sự phối hợp các quy trình đã có từ lâu để tạo ra các khối gốm ba chiều (3D) lớn. Cụ thể hơn, các trạng thái gốm cải biến có thể được tổng hợp dưới dạng bột, trong đó các tiêu chí cụ thể như hệ số tỉ lệ lượng/sự trao đổi ion, kích thước nano, và hoạt động bề mặt, đáp ứng cho các chức năng cụ thể. Quy trình gia công gốm hiện được sử dụng để thu được các khối gốm ba chiều dạng thô có hình dạng và độ xốp thích hợp chính là việc xử lý nhiệt (thiêu kết) các loại bột gốm tổng hợp tạo thành khối 3D thích hợp (để làm chắc thể 3D). Tất cả các bước này là cần thiết để thu được các loại gốm ba chiều có tính chất hóa lý và cơ học thích hợp, các khối này hầu hết bị biến đổi trong quá trình gia công gốm nêu trên (cụ thể là việc xử lý thiêu kết). Những hạn chế quan trọng trong việc phát triển vật liệu gốm chức năng cũng như quy trình gia công gốm hiện tại làm cản trở sự phát triển hơn nữa trong lĩnh vực này.

Ngày nay, với sự phát triển của xã hội hiện đại, các sản phẩm công nghệ đang đảm đương vai trò ngày càng tăng trong đời sống và sản xuất của con người, do đó cần thiết phải có những công cụ thông minh có thể cung cấp các giải pháp cho những nhu cầu phức tạp và mang tính cá nhân trong nhiều lĩnh vực ứng dụng khác nhau, ví dụ như sức khỏe, môi trường, năng lượng. Do đó, cần có các phương pháp tiếp cận mới cho việc sản xuất lặp lại và khối lượng lớn các thiết bị vĩ mô với tổ chức cấu trúc phức tạp ở mức độ nano, nhưng đồng thời với cả cấu trúc phức tạp được xác định ở kích thước siêu vi, và ngay cả ở mức tinh thể. Các cấu trúc cỡ lớn và cỡ nano có liên quan đến việc tạo ra các hiệu ứng chức năng khác thường nhưng thông minh.

Với các vấn đề nêu trên đối với các vật liệu gốm sứ, cần phải có sự thay đổi mô hình để phát triển các loại gốm có tính năng cao có cấu trúc vi mô và vĩ mô phức tạp.

Khung xương, đặc biệt tập trung vào việc tái tạo phần khuyết tật của xương lớn chịu tải, có thể được coi như một ví dụ điển hình vì chúng phải là những sản phẩm gốm ba chiều với hoạt tính sinh học cao để có thể có khả năng được nhân lên bằng các tế bào và cuối cùng được tái tạo như các khiếm khuyết xương lớn. Trong thực tế, hiện nay chưa có giải pháp phù hợp để giải quyết nhu cầu lâm sàng này.

Trong nhiều thập kỷ, hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) đã được nhận biết là vật liệu chính cho khung xương vì nó gần giống với thành phần khoáng chất của xương và đã được chứng minh tính tương thích sinh học và tính dẫn truyền xương tốt. Tuy nhiên, tính mô phỏng sinh học của hydroxyapatit có liên quan đến kích cỡ nano của nó và sự hiện diện của các loại ion, thay thế một phần canxi và phosphat trong mạng lưới apatit, đây là nguồn gốc của hoạt tính sinh học của xương trong quá trình tạo hình mô mới, tái mô hình hóa mô mới và tiêu tan mô mới.

Việc áp dụng phương pháp xử lý thiêu kết lên các khung hydroxyapatit kích hoạt các phản ứng bề mặt và toàn bộ mặt phân cách giữa các hạt hydroxyapatit liền kề nhau tạo ra sự sắp xếp tinh thể, với việc loại bỏ các ion ngoại lai ra khỏi mạng lưới apatit và sự kết tụ các hạt lên đến một vài micromet, tạo ra tính ưa nước và ái lực đối với protein và tế bào.

Sự kết tụ hạt được hoạt hóa bởi quá trình thiêu kết tạo ra sự hợp nhất trên toàn bộ khối hydroxyapatit thông qua việc giảm độ xốp liên vùng, từ đó làm giảm thể tích toàn khối. Điều này cũng tạo ra các ứng suất dư thừa là một trong số các nguyên nhân chính của các khiếm khuyết cấu trúc trong các vật liệu gốm. Thật vậy, việc chứa đựng các ứng suất dư trong vật liệu gốm rất khó khăn do độ cứng cao (so với kim loại và polyme) và là một trong những yếu tố quan trọng làm suy yếu hiệu suất cơ học của vật liệu gốm, đặc biệt trong trường hợp các mảnh lớn có đặc tính phức tạp về hình dạng và cấu trúc xốp, trong đó các biến đổi thể tích sau các chu trình gia nhiệt/làm mát dễ gây tổn hại cấu trúc quan trọng.

Vì những lý do trên, quy trình tổng hợp gốm cổ điển không cho phép các vật liệu gốm, đặc biệt là các hydroxyapatit có thành phần và cấu trúc sinh học, hoạt tính sinh học cao và khả năng tái hấp thu được sản xuất. Điều này đặc biệt đúng khi gốm xốp ba

chiều cỡ lớn được tổng hợp để tái tạo các khiếm khuyết xương kích thước tới hạn (cụ thể là ≥ 2 cm).

Thành phần khoáng sinh học và cấu trúc có ý nghĩa quan trọng để tạo ra các tầng tái sinh trong cơ thể vốn có thể chỉ xác định và thúc đẩy tái tạo các bộ phận xương lớn chịu tải, chẳng hạn như xương dài của các chi. Những hiện tượng này liên quan chặt chẽ đến nhau và phải có sự đồng bộ để kích hoạt và duy trì sự tái tạo của xương với tất cả các chức năng của nó là: i) sự sinh xương nhanh, sự dẫn truyền xương và sự hợp nhất xương; ii) sự hình thành mạch máu diện rộng; iii) khả năng tái hấp thu sinh học liên tục.

Sự sinh xương nhanh và dẫn truyền xương nhanh cho phép hình thành xương và sự xâm nhập vào khung, dẫn đến kết nối xương/khung chặt chẽ và sự hợp nhất xương tốt nhất. Để đạt được những hiệu quả này, cần phải có thành phần hoá học giống như xương và độ xốp mở rộng và liên kết với nhau, qua đó bên cạnh sự xâm nhập sâu rộng của mô xương mới, có thể đạt được sự hình thành đồng thời mạng lưới mạch máu giúp đạt được sự hình thành và trưởng thành của xương mới. Việc hình thành tập trung không hoàn toàn của khung có thể dẫn đến sự hình thành các lỗ rỗng, các mô sợi hoặc các vùng hoại tử và sẽ làm giảm độ bền tổng thể và hiệu suất cơ học của cấu trúc xương/khung.

Trong thời gian tương thích với sự hình thành xương mới, khung cần được tái hấp thu dần dần, để đạt được sự tái tạo tốt nhất của xương sau khi bị tổn thương hoặc bệnh tật. Tất cả các khung xương ba chiều (3D) được phát triển cho đến nay đều dựa trên canxi phosphat thiêu kết, là những vật liệu dạng tinh thể làm cản trở hoạt động của tế bào hủy xương, so với các tinh thể cỡ nano, hạt cỡ nano, apatit được thể ion; vì vậy mặc dù khung xương xốp hydroxyapatit có thể được ghép tốt vào xung quanh xương bởi sự kết dính bề mặt, nhưng việc thiếu sự tái hấp thu sinh học cản trở quá trình tu sửa hoàn chỉnh, cụ thể là thay thế khung xương bằng xương mới. Điều này dẫn đến sự phục hồi không đầy đủ về khả năng hoạt động của xương bị bệnh, nhất là trong trường hợp các đoạn xương rất dài, xương chịu tải.

Đặc biệt trong trường hợp xương dài, xương chịu tải, thì khung phải có hiệu suất cơ học đủ lớn, đồng thời duy trì được độ xốp mở rộng, đó là một thách thức vì các đặc điểm này thường có tỷ lệ nghịch (cụ thể là độ xốp cao hơn thì độ bền cơ học thấp hơn)

và cần có độ xốp cao để tạo ra sự hình thành tập trung và hợp nhất xương. Đây là một trong những yếu tố có liên quan quan trọng nhất hạn chế việc sử dụng các khung hiện tại trong việc tái tạo các phần xương dài, xương chịu tải. Về mặt này, khung có cấu trúc xốp được cấu trúc phân tầng có thể mang lại hiệu suất cơ học cao hơn so với các vật liệu có độ xốp tương tự nhưng được sắp xếp ngẫu nhiên. Về mặt này, chỉ những khung có cấu trúc được tổ chức như vậy mới có thể kích hoạt các quy trình truyền dẫn tín hiệu cơ học thành hoạt động hóa học ở mức độ tế bào, do đó kích hoạt sự tái tạo của xương trưởng thành, được tổ chức và có khả năng cơ học.

Sự đổi mới được đề xuất dựa trên sự thay đổi mô hình từ quy trình tổng hợp gồm cổ điển sang quy trình thiêu kết phản ứng mới, cho phép tạo ra các trạng thái gồm với thành phần hoá học xác định, được tổ chức thành một cấu trúc ba chiều cỡ lớn với hình thái phức tạp, cấu trúc phân tầng, và đồng thời, tối ưu hóa hiệu suất cơ học, bắt đầu từ các cấu trúc tự nhiên được tổ chức phân tầng. Về mặt này, biến đổi sinh học là điểm tựa của cách tiếp cận sáng tạo này có thể áp dụng cho các cấu trúc tự nhiên được tổ chức phân tầng (cụ thể như gỗ, thực vật, khung xương ngoài).

Sự biến đổi sinh học của các cấu trúc gỗ thành gốm mô phỏng xương đã được thực hiện thành công bằng cách sử dụng các loại gỗ có cấu trúc xốp như gỗ tùng và mây, và các loại gỗ đặc như sồi đỏ và sipo làm khuôn để tái tạo tương ứng cấu trúc và hoạt động cơ của xương xốp và xương vỏ não .

Việc sử dụng gỗ trong quá trình tạo thành của khung hydroxyapatit sinh học đã được báo cáo bởi Anna Tampieri và cộng sự trên *Journal of Material Chemistry*, 2009, 19, 4973-4980. Trong bài báo này, Tampieri và cộng sự mô tả quy trình chuyển dạng các mảnh dài 1 cm (một mảnh nhỏ, không đủ để phục hồi các khuyết tật kích thước tới hạn) của gỗ mây và gỗ thông thành hydroxyapatit. Quy trình này bao gồm công đoạn nhiệt phân mẫu gỗ ở nhiệt độ 1000°C sử dụng tốc độ gia nhiệt chậm, tiếp theo là công đoạn cacbua hóa, trong đó mẫu cacbon được chuyển thành canxi cacbua. Công đoạn cacbua hóa đã đạt được bằng cách thẩm pha lỏng hoặc thẩm pha hơi. Việc thẩm pha hơi được thực hiện ở nhiệt độ cao hơn điểm sôi của canxi (1484°C). Công đoạn cacbua hoá liên quan đến việc gia nhiệt ban đầu của gỗ được nhiệt phân lên đến 800°C, tiếp theo là gia nhiệt đến 1100°C và cuối cùng đến 1650°C trong 3 giờ. Cần thiết phải gia nhiệt gỗ được nhiệt phân đến nhiệt độ này trong 3 giờ để đảm bảo rằng phản ứng đã

hoàn thành. Sau công đoạn cacbua hóa, khung canxi cacbua ba chiều được oxy hóa để chuyển từ dạng canxi cacbua thành canxi oxit, trong khi đó vẫn duy trì hình thái của gỗ tự nhiên. Sau quá trình oxy hóa, khung canxi oxit ba chiều được cacbonat hóa để chuyển từ khung canxi oxit thành khung canxi cacbonat. Các giá trị áp suất cao (2,2 MPa) được sử dụng để cho phép sự thâm nhập của CO_2 trên toàn bộ quy mô CaCO_3 được hình thành, đến cốt lõi của cấu trúc CaO . Cuối cùng, bước phosphat hóa được thực hiện để biến đổi khung canxi cacbonat thành khung hydroxyapatit với hình thái đẳng hướng được tổ chức phân tầng giống như gỗ tự nhiên. Trong bước này, các mẫu CaCO_3 có nguồn gốc từ gỗ được ngâm trong dung dịch KH_2PO_4 ở nhiệt độ 200°C , dưới áp suất 1,2 MPa trong 24 giờ.

Quy trình được mô tả ở trên tạo ra các khung gồm hydroxyapatit với hình thái đẳng hướng của gỗ tự nhiên được tổ chức phân tầng.

Độ bền nén của khung có nguồn gốc từ gỗ tùng, được đo theo chiều dọc, dao động từ 2,5 đến 4 MPa, và theo chiều ngang, dao động từ 0,5 đến 1 MPa. Do đó, chỉ có các khung có kích thước hạn chế, thường nhỏ hơn 1 cm, có thể đạt được bằng quy trình nói trên. Các giá trị độ bền nén thấp, cũng có liên quan đến kích thước ≤ 1 cm, làm cho những khung này không thích hợp với việc tái tạo xương, đặc biệt là trong trường hợp xương chịu tải. Trong thực tế, người ta chấp nhận rằng khiếm khuyết xương nên có chiều dài gấp 2-3 lần đường kính của xương bị ảnh hưởng. Do đó, khung có kích thước 1 cm không thể coi là hữu ích trong khía cạnh này.

Bước phosphat hóa đã đề cập ở trên trong việc chuyển dạng gỗ thành hydroxyapatit, đã được báo cáo chi tiết hơn bởi Ruffini và cộng sự trên *Chemical Engineering Journal* 217 (2013) 150-158. Theo công bố này, các mẫu hình trụ của canxi cacbonat có nguồn gốc từ gỗ mây có đường kính 8 mm và chiều dài 10 mm được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu. Quá trình phosphat hóa được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch nước của diamoni hydrophosphat, amoni dihydrophosphat và amoniac.

Công bố đơn sáng chế quốc tế WO 2012/063201 ngày 18 tháng 5 năm 2012 mô tả bộ phận thay thế xương bao gồm một lõi, dựa trên hydroxyapatit, thu được từ ít nhất một gỗ xốp, và một vỏ là hydroxyapatit hoặc silic cacbua thu được từ ít nhất một gỗ có độ xốp thấp hơn so với ít nhất lõi của một loại gỗ. Vỏ được chế tạo dưới dạng hình trụ rỗng phù hợp để chứa lõi, có thể được chế tạo dạng trụ rắn để lắp vào khoang vỏ. Quy

trình để thu bộ phận thay thế xương từ gỗ cũng được mô tả trong sáng chế. Bước thứ nhất là nhiệt phân gỗ tự nhiên như mây hoặc thông, bằng cách gia nhiệt đến nhiệt độ 800-2000°C. Từ quá trình này, thu được vật liệu cacbon. Trong bước thứ hai, vật liệu cacbon được biến đổi thành canxi cacbua ở nhiệt độ 1500-1700°C. Tiếp theo, canxi cacbua bị oxy hoá ở nhiệt độ 900-1000°C. Để chuyển dạng vật liệu canxi oxit thành canxi cacbonat, quá trình cacbonat hóa được thực hiện trong một nồi hấp ở nhiệt độ 400°C với áp suất khí CO₂ là 2,2 MPa trong 24 giờ. Vật liệu canxi cacbonat sau đó được biến đổi thành hydroxyapatit một phần được thế bằng cacbonat bằng quá trình phosphat hóa. Kết quả là khung hydroxyapatit có nguồn gốc từ gỗ mây, có độ bền nén từ 4 đến 5 MPa theo chiều dọc, và độ bền nén 1 MPa theo chiều ngang.

Mặc dù các công bố đã đề cập ở trên mô tả việc chuyển dạng thành công gỗ như gỗ mây và thông thành hydroxyapatit, đồng thời mô phỏng lại hình thái ba chiều của gỗ, tuy nhiên không thể thu được các khung có tính năng thích hợp cho việc tái tạo các đoạn xương dài chịu tải.

Trên thực tế, các công bố trên đều đề cập đến khung hydroxyapatit thu được từ gỗ, có kích thước nhỏ (tức là thể tích nhỏ hơn 1 cm³), thực tế các khung với kích thước trên không thể ứng dụng lâm sàng, nhất là đối với sự tái sinh của phần xương chịu tải lớn. Các quy trình đã được mô tả trong các kỹ thuật hiện nay không thích hợp để sản xuất khung hydroxyapatit có kích thước thuận tiện cho các ứng dụng lâm sàng, cụ thể như tái tạo các khiếm khuyết xương chịu tải kích thước tới hạn có khung lớn, nghĩa là với kích thước cần thiết ít nhất bằng 2 cm.

Do đó, cần thiết phải có quy trình kỹ thuật sản xuất khung sinh học, đặc biệt là khung xốp ba chiều, với thành phần khoáng sinh hóa có hiệu suất cơ học thích hợp, hình thái thuận lợi cho sự hình thành tập trung và tăng trưởng mạch máu và đồng thời có kích thước thích hợp cho các ứng dụng lâm sàng.

Khung sinh học như vậy không chỉ thích hợp cho việc tái tạo xương, nhất là cho việc cấy ghép các khiếm khuyết xương chịu tải, cụ thể như xương dài của các chi (như xương đùi, xương chày, xương cánh tay, xương ống chân, xương quay), mà còn thích hợp để thay thế và tái sinh xương cột sống (ví dụ như đốt sống, đĩa đệm), phần xương sọ hoặc phần xương hàm - mặt.

Sáng chế đáp ứng được các yêu cầu trên bằng cách đề xuất khung sinh học, tốt nhất là khung hydroxyapatit thích hợp cho việc thay thế và tái tạo xương, đặc biệt là để thay thế và tái tạo phần xương dài, xương chịu tải.

Sáng chế đáp ứng các yêu cầu trên bằng cách đề xuất quy trình sản xuất khung sinh học, tốt nhất là khung sinh học ba chiều. Cụ thể hơn là khung sinh học là khung hydroxyapatit.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nhìn chung, sáng chế mô tả khung hydroxyapatit thu được từ gỗ có độ xốp tổng số 60-95%, độ xốp này được đo sau khi đưa gỗ vào bước nhiệt phân, khung có chiều dài được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung là tối đa, lớn hơn hoặc bằng 2 cm.

Cụ thể hơn, sáng chế mô tả khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ có độ xốp tổng số 60-95% (độ xốp được đo sau khi đưa gỗ vào bước nhiệt phân), khung hydroxyapatit được đặc trưng bởi cấu trúc lỗ được tổ chức phân tầng và độ bền nén lớn hơn 5 MPa, tốt nhất là từ 10 MPa đến 20 MPa, được đo theo dọc theo các lỗ dạng kênh (theo chiều dọc).

Tốt nhất là, hydroxyapatit theo sáng chế có độ bền nén dọc theo hướng vuông góc với trục dài của các rãnh (chiều ngang) lên đến 10 MPa.

Tốt nhất là, khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ, có cấu trúc lỗ được tổ chức phân tầng được tạo thành từ cấu trúc lỗ được tổ chức phân tầng của gỗ dùng để tạo ra khung này (gỗ tự nhiên).

Sáng chế cũng đề xuất khung hydroxyapatit sinh học có nguồn gốc từ gỗ, trong đó hydroxyapatit được thay thế một phần (pha tạp) với một hoặc nhiều ion được lựa chọn từ nhóm bao gồm magie, stronti, silic, titan, cacbonat, natri, kali, gali, bạc, đồng, sắt, kẽm, mangan, europi và gadolini.

Loại gỗ dùng để chế tạo khung hydroxyapatit sinh học có độ xốp tổng số 60-95%, tốt nhất là 65-85% (độ xốp này được đo sau khi đưa gỗ vào bước nhiệt phân). Các loại gỗ có độ xốp trong phạm vi này bao gồm mây, thông, abachi, balsa, sipo, gỗ sồi, cẩm lai, gỗ kempas và gỗ óc chó. Tốt nhất là hydroxyapatit sinh học được chế tạo từ gỗ mây.

Khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ theo sáng chế có sự kết dính cấu trúc và các đặc tính cơ học thích hợp để sử dụng làm bộ phận thay thế xương.

Vì vậy, sáng chế đề xuất sử dụng khung hydroxyapatit sinh học làm bộ phận thay thế xương, cũng như bộ phận thay thế xương có chứa khung hydroxyapatit sinh học. Sáng chế cũng đề xuất bộ phận thay thế xương bao gồm khung hydroxyapatit sinh học nêu trên.

Khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ có thể được sử dụng làm bộ phận thay thế xương để tái tạo lại xương hoặc một phần của xương, cụ thể là xương người và động vật. Hơn nữa, khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ có thể được sử dụng làm bộ phận thay thế xương hoặc một phần của xương, được đưa vào để chịu tải cơ học. Cụ thể hơn là, xương hoặc một phần của xương là xương dài của chân và cánh tay như xương chày, xương ống chân, xương đùi, xương cánh tay và xương quay.

Khung hydroxyapatit sinh học có nguồn gốc từ gỗ cũng có thể được sử dụng để thay thế và/hoặc phục hồi các phần của xương sọ, các phần xương hàm-mặt và xương cột sống (ví dụ như các đốt xương cột sống, đĩa đệm giữa đốt xương).

Khung hydroxyapatit sinh học theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm bộ lọc cho chất lỏng hoặc khí.

Sáng chế cũng mô tả quy trình để sản xuất khung hydroxyapatit sinh học có nguồn gốc từ gỗ.

Cụ thể hơn là, sáng chế mô tả quy trình sản xuất khung hydroxyapatit sinh học có chiều dài, được đo dọc theo hướng của khung có kích thước tối đa, lớn hơn hoặc bằng 2 cm, bao gồm các bước: nhiệt phân, cacbua hóa, oxy hóa, hydrat hóa, cacbonat hóa và phosphat hóa mảnh gỗ (gỗ tự nhiên) có độ xốp tổng số ít nhất 20%, tốt hơn là không dưới 40%, tốt hơn nữa là 60-95%, trong đó độ xốp được đo sau khi đưa gỗ qua bước nhiệt phân.

Ví dụ về gỗ tự nhiên có thể được sử dụng cho quy trình của sáng chế là: mây, thông, abachi, balsa, sipo, sồi, cẩm lai, kempas và óc chó.

Mặc dù có nhiều phương án thực hiện được mô tả, nhưng vẫn còn nhiều phương án thực hiện khác có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật thông qua việc tham khảo phần mô tả chi tiết sau đây. Rõ ràng các phương án thực hiện cụ thể như được mô tả ở đây có khả năng cải biến theo các khía cạnh khác

nhau mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Theo đó, các hình vẽ và phần mô tả chi tiết chỉ mang tính minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Những hình vẽ sau đây nhằm minh họa các phương án thực hiện ưu tiên của đối tượng được bộ lộ của sáng chế. Đối tượng của sáng chế có thể được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo mô tả dưới đây được thực hiện kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 là hình minh họa phương án thực hiện ưu tiên của khung sinh học được đặc trưng bởi kênh trung tâm.

Fig.2 là hình ảnh mô tả các mô của vòm sọ chuột thu mẫu sau 8 tuần. Sự hình thành xương ở mức độ rộng và sự xâm nhập của các lỗ đã đạt được ở mức tương tự khi được cấy riêng lẻ hoặc cùng với các tế bào tăng sinh xương, ở đó a) thể hiện gỗ và không có tế bào, b) thể hiện hydroxyapatit và không có tế bào, c) thể hiện gỗ và tế bào, và d) thể hiện hydroxyapatit và tế bào. Các mũi tên trên Fig.2f chỉ tới các lỗ rỗng giống như các kênh của khung mô phỏng hệ thống Haversian. Hệ thống Haversian hay hệ Havers là đơn vị chức năng của xương đặc, dưới dạng hình trụ bởi các phiến xương được sắp xếp thành các lớp đồng tâm. Ở giữa trụ xương có ống xương chứa các tủy xương và cung cấp máu.

Fig.3 là hình minh họa đường cong biến dạng - ứng suất của khung sinh học được đưa vào chịu tải nén, trong đó y = ứng suất (N), và x = độ biến dạng (mm).

Fig.4 là biểu đồ minh họa sự phân bố số lượng lỗ rỗng bên trong của hydroxyapatit sinh học theo sáng chế so sánh với số lượng lỗ rỗng của hydroxyapatit được cấu trúc phân tầng thu được bằng phương pháp đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Fig.5 là biểu đồ mô tả khả năng sống sót được tăng cường của tế bào gốc trung mô khi tiếp xúc với khung chứa 2 và 5 mol% Sr, so với khung không có stronti (BC) sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 7 ngày và 14 ngày. $y = \%$ đối với BC.

Fig.6 là các biểu đồ mô tả sự biểu hiện của gen liên quan đến sự hình thành xương, như (a) RUNX2 và (b) ALP với khung chứa 2 mol% (Sr2%-BC) và 5 mol% (Sr5%-BC) stronti. y = sự biểu hiện biến đổi về tỷ số liên quan đến BC và x = ngày.

Fig.7 là biểu đồ mô tả khả năng sống sót của nguyên bào xương khi tiếp xúc với khung chứa 2 mol% (Sr2%-BC) và 5 mol% (Sr5%-BC) stronti, so với khung không có stronti (BC) sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 7 ngày và 14 ngày. $y = \% \text{ đối với BC}$.

Fig.8 là các biểu đồ mô tả sự biểu hiện của gen liên quan đến sự hình thành xương, như (a) Osterix, (b) BGláp và (c) IBSP với khung chứa 2 mol% (Sr2%-BC) và 5 mol% (Sr5%-BC) stronti. $y = \text{sự biểu hiện biến đổi về tỷ số liên quan đến CT}$ và $x = \text{ngày}$.

Fig.9 là các biểu đồ mô tả sự biểu hiện của gen liên quan đến tế bào hủy xương, như (a) Osacr, (b) CTSK và (c) Itg $\beta 3$ với khung chứa 2 mol% (Sr2%-BC) và 5 mol% (Sr5%-BC) stronti. $y = \text{sự biểu hiện biến đổi về tỷ số liên quan đến CT}$ và $x = \text{ngày}$. Sự giảm đáng kể biểu hiện của các gen liên quan đến các con đường phân tử chính của các tế bào hủy xương theo thời gian có thể được nhìn thấy; do đó chỉ ra rằng sự hiện diện của ion Sr^{2+} trong khung ức chế sự hình thành và hoạt động của các tế bào hủy xương; trên Fig.9a: số liệu thu được sau 14 ngày thấp hơn giới hạn phát hiện.

Fig.10 là biểu đồ minh họa sự so sánh độ phân bố lỗ rỗng của hai khung canxi cacbua thu được sau bước cacbua hóa của kỹ thuật hiện nay và bước cacbua hóa theo sáng chế và so sánh với độ phân bố lỗ rỗng của gỗ được nhiệt phân ban đầu. Diện tích bề mặt riêng của hai khung canxi cacbua cũng được thể hiện trên hình;

Fig.11, Fig.12 và Fig.13 là hình ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) từ phía trên của hai khung canxi cacbua thu được tương ứng từ quy trình theo sáng chế và quy trình theo kỹ thuật hiện nay;

Fig.13 là hình ảnh chụp từ phía dưới so sánh kích thước của các hạt canxi cacbua;

Fig.14 là hình so sánh trạng thái tinh thể của hai khung canxi cacbua, được đo bằng tia X - nhiễu xạ tia X (XRD) thu được tương ứng từ quy trình theo sáng chế và quy trình kỹ thuật hiện nay.

Fig.15 là hình ảnh SEM của khung canxi oxit thu được sau bước oxy hóa theo sáng chế và bước oxy hóa của kỹ thuật hiện nay;

Fig.16 là biểu đồ minh họa sự phân bố của hai khung canxi oxit thu được tương ứng sau bước oxy hóa theo sáng chế và bước oxy hóa của kỹ thuật hiện nay;

Fig.17 và Fig.18 là hình ảnh SEM của canxi cacbonat thu được tương ứng sau bước cacbonat hóa theo sáng chế và bước cacbonat hóa của kỹ thuật hiện nay;

Fig.19 là biểu đồ minh họa sự phân bố của hai khung canxi cacbonat thu được tương ứng sau bước cacbonat hóa theo sáng chế và bước cacbonat hóa của kỹ thuật hiện nay;

Fig.20 là biểu đồ minh họa sự phân bố lỗ rỗng của khung hydroxyapatit sinh học cuối cùng (sau quá trình phosphat hóa) thu được từ quy trình theo sáng chế so với khung hydroxyapatit sinh học cuối cùng của quy trình đã biết;

Fig.21 là hình minh họa sản phẩm thu được sau khi đưa mảnh gỗ mây có chiều dài được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung đạt tối đa, bằng hoặc lớn hơn 2 cm qua các bước xử lý theo các điều kiện của kỹ thuật hiện nay, ngay trước bước phosphat hóa khung có thể bị vỡ;

Fig.22 là hình minh họa sản phẩm thu được sau khi đưa mảnh gỗ mây có chiều dài được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung đạt tối đa, bằng hoặc lớn hơn 2 cm qua các bước xử lý theo các điều kiện của kỹ thuật hiện nay: ngay cả khi khung qua được bước phosphat hóa thì sau quá trình phosphat hóa khung vẫn bị vỡ;

Fig.23 thể hiện sự định lượng tương đối ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) biểu hiện gen đối với sự biểu hiện của khung không pha tạp của kỹ thuật hiện nay được sử dụng làm giá trị chuẩn, sau 14 ngày mMSCs 3D được nuôi cấy trong điều kiện tối ưu với tất cả các mẫu được kiểm tra;

Fig.24 là hình minh họa phương án thực hiện khung sinh học có dạng hình khối.

Fig.25 là hình minh họa cấu trúc giống các kênh của khung hydroxyapatit sinh học thu được từ quy trình theo sáng chế được đặc trưng bởi các kênh lớn dễ dàng cho thấm qua (đường kính 100-300 μm) (chụp cắt lớp vi tính cỡ μm). Các kênh cho phép hình thành các mạch máu thích hợp hỗ trợ cho việc tái tạo xương.

Mô tả chi tiết sáng chế

Khi được sử dụng trong phần mô tả sáng chế và yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "cấu trúc lỗ phân tầng" hoặc "cấu trúc lỗ được tổ chức phân tầng" dùng để chỉ vật liệu có cấu trúc lỗ ba chiều bất đẳng hướng, trong đó các lỗ dạng kênh giống nhau được kết nối với nhau qua các kênh ngang và trong đó các lỗ vi và siêu vi có ở khu vực xung quanh các lỗ dạng kênh.

Khi được sử dụng trong phần mô tả sáng chế và yêu cầu bảo hộ, các giá trị của "độ bền nén" thu được bằng phương pháp trong phần mô tả dưới đây bằng cách sử dụng các lực cơ học dọc theo các chiều dọc và ngang đối với các lỗ dạng kênh.

Khi được sử dụng trong phần mô tả sáng chế và yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "khiếm khuyết xương" đề cập đến phần bị mất hoặc một phần của xương hoặc toàn bộ xương bị thiếu và cần phải được thay thế hoàn toàn bằng khung sinh học theo sáng chế.

Khi được sử dụng trong phần mô tả sáng chế, "hydroxyapatit sinh học" dùng để chỉ vật liệu mà: 1) có chứa hydroxyapatit hoặc 2) bao gồm hydroxyapatit hoặc 3) là một vật liệu bao gồm hoặc chứa hydroxyapatit và canxi phosphat. Trong trường hợp vật liệu có chứa hydroxyapatit và canxi phosphat, vật liệu là vật liệu hai pha. Theo phương án thực hiện của sáng chế, nếu "hydroxyapatit sinh học" là vật liệu bao gồm hoặc có chứa hydroxyapatit và canxi phosphat, hydroxyapatit được pha tạp với một hoặc nhiều ion được chọn trong nhóm gồm magie, stronti, silic, titan, cacbonat, kali, kẽm, mangan, europi, gadolini và hỗn hợp của chúng.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng có thể thu được khung hydroxyapatit sinh học từ gỗ có thành phần hóa học sinh học, hiệu suất cơ học thích hợp, hình thái học thuận lợi cho sự hình thành tập trung và tăng trưởng mạch và đồng thời có kích thước thích hợp cho các ứng dụng lâm sàng.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất khung hydroxyapatit thu được từ gỗ có độ xốp tổng số ít nhất là 20%, tốt hơn là không dưới 40%, và tốt hơn nữa là 60-95%, trong đó độ xốp này được đo sau khi đưa gỗ vào bước nhiệt phân, khung có chiều dài được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung là tối đa, lớn hơn hoặc bằng 2 cm.

Độ xốp tổng số của khung hydroxyapatit sinh học thu được sau quy trình theo sáng chế có cùng độ xốp tổng số với gỗ ban đầu được đo sau khi đưa gỗ đến bước nhiệt phân. Cụ thể là, độ xốp tổng số của khung hydroxyapatit sinh học thu được sau quy trình theo sáng chế ít nhất là 20%, tốt hơn là không dưới 40%, tốt hơn nữa là 60-95%.

Tốt nhất là, khung có chiều dài được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung là lớn nhất, lớn hơn hoặc bằng 2 cm và đạt đến một giá trị cuối cùng được xác định theo ứng dụng lâm sàng. Ví dụ trong trường hợp việc thay thế xương là xương dài, cụ thể như xương chày, xương đùi, xương ống chân, xương cánh tay, xương quay, thì

chiều dài của khung được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung là tối đa, có thể từ 2 đến 20 cm.

Tốt nhất là, khung theo sáng chế có độ bền nén được đo theo chiều dọc lớn hơn 5 MPa, tốt hơn là trong khoảng 10 MPa và 20 MPa.

Tốt nhất là khung theo sáng chế thể hiện độ bền nén dọc theo chiều ngang lên đến 10 MPa.

Tốt nhất là, khung hydroxyapatit sinh học được đặc trưng bởi cấu trúc lỗ có cấu trúc phân tầng.

"Cấu trúc lỗ phân tầng" hay "cấu trúc lỗ được cấu trúc phân tầng" của khung hydroxyapatit theo sáng chế có nguồn gốc từ cấu trúc phân tầng ba chiều phức tạp của gỗ ban đầu để thu được khung và do vậy có nhiều lỗ có kích thước khác nhau. Các lỗ có kích thước khác nhau trong cấu trúc phân tầng làm cho nó có khả năng được sử dụng làm bộ phận thay thế xương.

Cụ thể là, các lỗ có đường kính $\geq 200 \mu\text{m}$, tốt hơn là trong khoảng 150-300 μm , tốt nhất là 200-300 μm sẽ cho phép hình thành tập trung và tăng sinh tế bào, và tạo thành hệ thống sinh mạch thích hợp. Các lỗ có đường kính $\leq 10 \mu\text{m}$, tốt hơn là $<1 \mu\text{m}$, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 0,1 μm (vi lỗ và siêu lỗ), kết nối một phần các lỗ dạng kênh, cho phép trao đổi dịch dinh dưỡng và đào thải các chất thải từ sự trao đổi chất của tế bào.

Việc duy trì cấu trúc lỗ của gỗ trong hydroxyapatit, tạo ra các khung với các tính năng cơ học tối ưu và cho phép giảm bớt tải cơ học một cách hiệu quả.

Vì hydroxyapatit thu được từ gỗ tái tạo cấu trúc của một vật liệu tự nhiên một cách chi tiết, nên nó có thể được gọi là mô phỏng sinh học.

Cụ thể là, cấu trúc lỗ có cấu trúc được tổ chức phân tầng của khung theo sáng chế có 30-80% độ xốp tổng số là các lỗ có đường kính dưới 150 μm , và thậm chí là 100% độ xốp tổng số là các lỗ có đường kính lớn hơn 150 μm .

Theo một phương án thực hiện ưu tiên, tốt nhất là nếu gỗ ban đầu là gỗ mây, thì 30-60% độ xốp tổng số của khung do các lỗ có đường kính $\leq 10 \mu\text{m}$.

Theo một phương án thực hiện ưu tiên, tốt nhất là nếu gỗ ban đầu là gỗ mây, thì độ xốp tổng số ít nhất là 25%, tốt nhất là 25-50% khung hydroxyapatit do các lỗ có đường kính $\leq 1 \mu\text{m}$, tốt hơn là $\leq 0,1 \mu\text{m}$, cụ thể là nằm trong khoảng 0,01-0,1 μm .

Theo một phương án thực hiện ưu tiên, tốt nhất là nếu gỗ ban đầu là gỗ mây, thì độ xốp tổng số ít nhất là 20% khung hydroxyapatit do các lỗ có đường kính $\geq 150 \mu\text{m}$.

Tốt nhất là khung hydroxyapatit có diện tích bề mặt riêng (SSA) $> 9 \text{ m}^2/\text{g}$, tốt hơn là từ 9 đến $20 \text{ m}^2/\text{g}$.

Gỗ được sử dụng để thu được khung hydroxyapatit có thể là bất kỳ loại gỗ nào có độ xốp tổng số ít nhất là 20%, tốt hơn là không dưới 40%, tốt hơn nữa là 60-95%, thậm chí tốt nhất là độ xốp nằm trong khoảng 65-85% (độ xốp này được đo sau khi đưa gỗ qua bước nhiệt phân).

Ví dụ về loại gỗ thích hợp được sử dụng để thu được hydroxyapatit bao gồm gỗ mây, thông, abachi, balsa, sipo, gỗ sồi, cẩm lai, gỗ kempas và gỗ óc chó, tốt hơn là gỗ được sử dụng là gỗ mây.

Khung hydroxyapatit thu được từ gỗ có thể bao gồm hydroxyapatit được thay thế một phần bằng một hoặc nhiều ion. Ví dụ về các ion này là cacbonat, magie, stronti, silic, titan, natri, kali, bạc, gali, đồng, sắt, kẽm, mangan, europi và gadolini. Việc đưa cacbonat vào vị trí phosphat làm tăng độ hòa tan trong sinh học và tăng cường ái lực bề mặt với các nguyên bào xương.

Việc bổ sung magie sẽ tăng cường sự bám và hình thành xương mới. Việc bổ sung stronti giúp cho việc sản xuất xương tái tạo mà bị ảnh hưởng bởi các chứng rối loạn chuyển hóa như loãng xương, do đó sự hiện diện của nó có thể làm tăng sự tái tạo xương.

Việc bổ sung bạc, gali, đồng và kẽm tạo ra tính chất kháng khuẩn.

Nếu khung hydroxyapatit thu được từ gỗ bao gồm hydroxyapatit được thay thế một phần bằng một hoặc nhiều ion, thì khung là vật liệu bao gồm hoặc chứa hydroxyapatit được pha tạp và canxi phosphat. Theo một phương án thực hiện khác, khung sinh học hydroxyapatit của sáng chế có thể bao gồm:

- magie chiếm 0-15% trọng lượng, tốt hơn là 1-10% trọng lượng; và/hoặc
- cacbonat chiếm 0-15% trọng lượng, tốt hơn là 1-10% trọng lượng; và/hoặc
- stronti chiếm 0-15% trọng lượng, tốt hơn là 1-10% trọng lượng; và/hoặc
- titan chiếm 0-20% trọng lượng, tốt hơn là 1-10% trọng lượng; và/hoặc
- kali chiếm 0-15% trọng lượng, tốt hơn là 1-10% trọng lượng; và/hoặc

- natri chiếm 0-15% trọng lượng, tốt hơn là 1-10% trọng lượng; và/hoặc
- silic chiếm 0-15% trọng lượng, và/hoặc tốt hơn là 1-10% trọng lượng;
- bạc chiếm 0-15% trọng lượng, và/hoặc tốt hơn là 1-10% trọng lượng;
- gali chiếm 0-15% trọng lượng, và/hoặc tốt hơn là 1-10% trọng lượng;
- đồng chiếm 0-15% trọng lượng, và/hoặc tốt hơn là 1-10% trọng lượng;
- sắt chiếm 0-30% trọng lượng, tốt hơn là 1-10% trọng lượng; và/hoặc
- kẽm chiếm 0-15% trọng lượng, và/hoặc tốt hơn là 1-10% trọng lượng;
- mangan chiếm 0-15% trọng lượng, và/hoặc tốt hơn là 1-10% trọng lượng;
- europi chiếm 0-15% trọng lượng, và/hoặc tốt hơn là 1-10% trọng lượng;
- gadolini chiếm 0-15% trọng lượng, và/hoặc tốt hơn là 1-10% trọng lượng.

Khung sinh học hydroxyapatit thu được từ gỗ theo sáng chế có các đặc điểm về hoạt tính sinh học và tính tái hấp thụ sinh học kết hợp với đặc điểm về độ bền cơ học và kích thước khiến cho nó đặc biệt thích hợp cho việc sử dụng lâm sàng như vật liệu thay thế xương, cụ thể trên người và động vật. Bộ phận thay thế xương này có thể được sử dụng để thay thế và/hoặc khôi phục và/hoặc tái tạo xương, các phần xương hoặc các khiếm khuyết xương. Ví dụ, bộ phận thay thế xương có thể được sử dụng để thay thế hoặc tái tạo lại xương hoặc các phần xương chịu tải cơ học. Ví dụ, bộ phận thay thế xương có thể được sử dụng để thay thế hoặc tái tạo lại các xương dài của cánh tay và chân. Những xương dài này có thể là xương chày, xương đùi, xương sườn, xương hông, xương quay ...

Bộ phận thay thế xương cũng có thể được sử dụng để thay thế và/hoặc tái tạo các bộ phận xương sọ, các phần xương hàm - mặt và xương cột sống, ví dụ như các đốt cột sống, đĩa đệm giữa đốt cột sống và trong các phương thức phẫu thuật ghép tủy sống.

Khi được sử dụng làm bộ phận thay thế xương, khung hydroxyapatit sinh học có thể có hình dạng phù hợp với hình dạng của khiếm khuyết xương cần phải được khôi phục lại để cơ bản lấp đầy vị trí xương thiếu sót. Vì vậy, khung và bộ phận thay thế xương theo sáng chế có thể có hình dạng bất kỳ phù hợp cho mục đích khôi phục và tái tạo các khiếm khuyết xương hoặc để thay thế bất kỳ phần nào bị mất của xương.

Ví dụ, khung hoặc bộ phận thay thế xương theo sáng chế có thể có dạng hình trụ, hình lăng trụ thẳng đứng, hoặc hình lập phương, hoặc hình nêm. Theo phương án thực

hiện, khung hoặc bộ phận thay thế xương bao gồm một ống trung tâm có đường kính bằng khoảng 20-60% so với đường kính của khung hoặc bộ phận thay thế xương. Cụ thể, khung hoặc bộ phận thay thế xương có dạng hình ống.

Theo phương án thực hiện, sáng chế đề xuất khung hoặc bộ phận thay thế xương có dạng hình trụ, hình lăng trụ đứng, hình lập phương hoặc hình ống, có chiều cao lớn hơn hoặc bằng 2 cm.

Theo phương án thực hiện ưu tiên theo sáng chế, khung hoặc bộ phận thay thế xương có thể được phủ một lớp mỏng hydroxyapatit và/hoặc collagen để tăng sự kết dính và tăng sinh tế bào, và qua đó có sự kết tụ ở trong mô xương xung quanh. Lớp này có thể bao gồm hydroxyapatit được thay thế bằng một hoặc nhiều ion có liên quan đến sự kích thích tái tạo xương như cacbonat, magie, silic, kali, natri và stronti, hoặc có tác dụng kháng khuẩn như gali, bạc, đồng hoặc kẽm.

Theo phương án thực hiện ưu tiên khác của sáng chế, khung hoặc bộ phận thay thế xương có thể được ngâm trong polyme tự nhiên (được lựa chọn trong các nhóm bao gồm gelatin, collagen, alginate, chitosan, gellan, xenluloza) để tăng thêm các đặc tính cơ học và thúc đẩy sự kết dính tế bào.

Đối với các tế bào khung hay các tế bào thay thế xương, có thể bổ sung thêm tiểu cầu giàu huyết tương, kháng thể, các protein như các yếu tố tăng trưởng, các phân đoạn DNA, miRNA, siRNA để giúp kết dính tế bào.

Cũng có thể bổ sung thêm các loại thuốc, như thuốc kháng sinh hoặc thuốc chống ung thư, vào khung hoặc bộ phận thay thế xương.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp khôi phục và/hoặc tái tạo xương người hoặc động vật có khiếm khuyết xương, bao gồm các bước sau:

- chế tạo bộ phận thay thế xương chứa hoặc bao gồm khung hydroxyapatit sinh học theo sáng chế có hình dạng tương ứng với hình dạng của khiếm khuyết xương;
- cấy ghép bộ phận thay thế xương vào vị trí khiếm khuyết xương của bệnh nhân.

Tốt hơn là, phương pháp khôi phục và/hoặc tái tạo bao gồm các bước: chế tạo mô hình ba chiều của khiếm khuyết xương và, dựa trên mô hình ba chiều thu được, tạo hình cho khung một hình dạng tương ứng với hình dạng khiếm khuyết của xương. Bước tạo hình cho khung có thể được áp dụng với phần gỗ ban đầu hoặc với khung hydroxyapatit thu được khi kết thúc quá trình chuyển dạng theo sáng chế hoặc với

khung thu được sau mỗi bước của quá trình (ví dụ sau bước cacbonat hóa). Tốt nhất là bước tạo hình được áp dụng trên phần gỗ ban đầu.

Khung hydroxyapatit sinh học theo sáng chế và khung hydroxyapatit sinh học được thay thế một phần bằng một hoặc nhiều ion, thu được từ quá trình chuyển dạng nhiều bước bao gồm các bước sau:

1) Nhiệt phân: gỗ tự nhiên được nung nóng ở nhiệt độ trong khoảng 600-1000°C trong môi trường trơ để cho phép phân hủy và loại bỏ tất cả các chất hữu cơ. Từ quá trình này, thu được một mẫu cacbon.

2) Cacbua hóa: mẫu cacbon được thấm canxi ở trạng thái hơi ở nhiệt độ trong khoảng 900-1200°C, và ở áp suất <100000 Pa (<1000 mbar), tốt hơn là <60000 Pa (<600 mbar), tốt nhất là trong khoảng 5-10000 Pa (0,05-100 mbar), qua đó chuyển dạng mẫu cacbon thành canxi cacbua (CaC_2).

3) Oxy hóa: mẫu canxi cacbua được làm nóng trong không khí ở nhiệt độ trong khoảng 750-1300°C, tốt hơn là 1000-1200°C, qua đó cho phép chuyển dạng canxi cacbua thành canxi oxit (CaO).

4) Hydrat hóa: mẫu canxi oxit được tiếp xúc với nước, do vậy cho phép hấp thụ nước với lượng 1-25 mol%, tốt hơn là 5-15% trọng lượng.

5) Cacbon hóa: mẫu canxi oxit được chuyển dạng thành canxi cacbonat bằng cách nung ở nhiệt độ trong khoảng 500-900°C, tốt hơn là ở nhiệt độ trong khoảng 750-850°C dưới áp suất khí CO_2 hoặc hỗn hợp áp suất khí CO_2 và khí trơ (ví dụ như argon, nito). Dải áp suất từ 4 đến 20 MPa.

6) Phosphat hóa: mẫu canxi cacbonat được xử lý với ít nhất một muối phosphat.

Trong bước nhiệt phân 1) của quá trình nhiều bước, gỗ tự nhiên được lựa chọn tốt nhất trong số các loại: mây, thông, abachi, balsa, sipo, gỗ sồi, cẩm lai, gỗ kempas và gỗ óc chó. Tốt nhất lựa chọn gỗ tự nhiên là gỗ mây.

Gỗ tự nhiên có độ xốp tổng số ít nhất là 20%, tốt hơn là không dưới 40%, tốt nhất là 60-95%, trong đó độ xốp được đo sau khi đưa gỗ qua bước nhiệt phân.

Trước quá trình nhiệt phân ở bước 1), gỗ tự nhiên ban đầu có thể được sấy khô ở nhiệt độ 50-90°C, tốt hơn là ở nhiệt độ 60-80°C, tốt nhất là ở nhiệt độ khoảng 65-75°C. Gỗ tự nhiên có thể được làm khô trong hơn 6 giờ, tốt hơn là trong hơn 12 giờ, tốt hơn nữa là trong hơn 18 giờ, tốt nhất là 20-30 giờ.

Trong bước nhiệt phân của quy trình, môi trường khí trơ có thể là môi trường khí được chọn từ nhóm bao gồm khí nitơ và argon.

Trong bước nhiệt phân của quá trình nhiều bước, gỗ tự nhiên có thể được nung nóng ở nhiệt độ từ 600-1000°C, tốt hơn là ở nhiệt độ từ 800-1000°C. Bước nhiệt phân có thể kéo dài trên 6 giờ, tốt hơn là trên 12 giờ, tốt hơn nữa là trên 18 giờ, tốt nhất là bước có thể kéo dài trong khoảng 20-30 giờ.

Chu trình nhiệt của quá trình nhiệt phân ở bước 1) có thể được thực hiện bằng cách gia nhiệt gỗ tự nhiên với tốc độ không cao hơn 5°C/phút, tốt hơn là không cao hơn 3°C/phút và làm mát với tốc độ không cao hơn 3°C/phút, tốt hơn là không cao hơn 2°C/phút, để tránh hình thành vết gãy và khe nứt bên trong của vật liệu.

Trước quá trình nhiệt phân ở bước 1), phương pháp nhiều bước có thể bao gồm thêm bước i) là lựa chọn và chuẩn bị gỗ tự nhiên, trong đó gỗ tự nhiên có thể được cắt thành mảnh có hình dạng tương ứng với hình dạng của khiếm khuyết xương cần được khôi phục. Cụ thể, gỗ tự nhiên được tạo hình thành mảnh gỗ có chiều dài được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của mảnh gỗ là lớn nhất, lớn hơn hoặc bằng 2 cm. Tốt hơn là kích thước của mảnh gỗ đạt đến giá trị cuối cùng được xác định theo ứng dụng lâm sàng.

Ví dụ, gỗ tự nhiên có thể được định hình ở dạng hình trụ, lăng trụ thẳng đứng, hoặc hình khối lập phương. Gỗ tự nhiên cũng có thể được định hình sao cho bao gồm ống trung tâm có đường kính bằng khoảng 20-60% đường kính của mảnh gỗ. Cụ thể, gỗ tự nhiên có thể được cắt thành dạng hình ống.

Tốt nhất là, việc lựa chọn và chuẩn bị gỗ tự nhiên của bước i) bao gồm các bước: chế tạo mô hình ba chiều của khiếm khuyết xương và, dựa trên mô hình ba chiều thu được, tạo hình cho gỗ tự nhiên có hình dạng tương ứng với hình dạng khiếm khuyết của xương. Bước tạo hình cho gỗ tự nhiên có thể được áp dụng cho gỗ tự nhiên ban đầu hoặc khung hydroxyapatit thu được khi kết thúc quá trình chuyển dạng nhiều bước. Tốt hơn là bước tạo hình được áp dụng trên gỗ tự nhiên ban đầu để tránh tổn thương bên trong và bên ngoài (vết nứt) khung.

Trong bước cacbua hóa 2) của quy trình, phản ứng tốt nhất được thực hiện với tỉ lệ mol Ca/C (lúc bắt đầu phản ứng) trong khoảng 1,10-2,50, tốt nhất là trong khoảng 1,50-2,00. Tỷ lệ mol Ca/C là rất quan trọng bởi nếu tỷ lệ nằm dưới khoảng đề xuất sẽ

dẫn đến các phản ứng không hoàn toàn và tỷ lệ nằm trên khoảng đề xuất sẽ dẫn đến sự bít kín các lỗ rỗng do dư lượng Ca.

Trong bước cacbua hóa của quy trình, mẫu cacbon được gia nhiệt với tốc độ gia nhiệt trong khoảng 1-10°C/phút, tốt nhất là gia nhiệt với tốc độ trong khoảng 1-7°C/phút.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc thực hiện bước cacbua hóa ở áp suất thấp theo như mô tả ở trên thuận lợi cho việc áp dụng thành công các bước tiếp theo của quy trình, đặc biệt là khi cần tạo ra khung sinh học cỡ lớn.

Trên thực tế, bằng cách sử dụng các điều kiện áp suất được mô tả ở trên, sự bay hơi của canxi có thể xảy ra ở nhiệt độ thấp hơn 400-500°C so với điểm sôi của canxi ở môi áp suất khí quyển (tức là 1484°C), điều kiện này mang lại kết quả ngoài mong đợi là sự chuyển dạng hoàn toàn của gỗ đã được nhiệt phân thành canxi cacbua xảy ra ở nhiệt độ thấp hơn nhiều so với bất kỳ quá trình khác được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể là, việc sử dụng áp suất trong khoảng 50-60000 Pa (0,5-600 mbar), hoặc tốt nhất là 5-10000 Pa (0,05-100 mbar) dẫn đến kết quả là cơ bản chuyển dạng hoàn toàn gỗ đã được nhiệt phân thành canxi cacbua.

Sự chuyển dạng cơ bản hoàn toàn gỗ đã được nhiệt phân thành canxi cacbua sẽ tạo thuận lợi đối với hiệu suất của các bước chuyển dạng tiếp theo.

Các điều kiện cacbua hóa của sáng chế cũng cải thiện việc duy trì các vi lỗ và siêu vi lỗ có đường kính $\leq 1 \mu\text{m}$ (tốt hơn là 0,01-0,1 μm) của gỗ tự nhiên ở cả trong khung sau quá trình cacbua hóa và trong khung sinh học thu được sau cùng, liên quan đến các khung đã biết thu được từ gỗ sử dụng các quy trình đã biết.

Giai đoạn cacbua hóa là một bước quan trọng trong quy trình này bởi vì việc duy trì các vi lỗ và siêu vi lỗ sau bước này sẽ đảm bảo rằng khung sinh học thu được sau cùng có độ xốp vi/siêu vi tương tự. Sự hiện diện với tỷ lệ phần trăm lớn của các lỗ vi và siêu vi liên kết với nhau trong khung sinh học thu được sau cùng cho phép trao đổi dịch dinh dưỡng và đào thải các chất thải từ quá trình trao đổi chất của tế bào.

Bên cạnh việc nâng cao sự duy trì các lỗ vi và siêu vi có đường kính $\leq 1 \mu\text{m}$, các điều kiện cacbua hóa được mô tả tạo ra khung sau cacbua hóa (và cũng là khung sinh học cuối cùng) với diện tích bề mặt riêng (SSA) từ 9 đến 20 m²/g. Diện tích bề mặt

riêng này cao gấp đôi so với SSA của khung thu từ quy trình đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật - khoảng 5-6 m²/g (xem ví dụ so sánh 4 và từ Fig.10-Fig.13).

Các điều kiện cacbua hóa theo sáng chế cũng tạo ra khung canxi cacbua xốp có chứa các hạt canxi cacbua nhỏ hơn so với hạt của khung thu được từ quy trình đã biết (xem ví dụ so sánh 4 và từ Fig.13- các hình vẽ phía dưới).

Các ví dụ so sánh cho thấy kích thước của các hạt canxi cacbua trong khung sinh học sau quá trình cacbua hóa là khoảng 5-15 μm (tốt hơn là khoảng 10 μm), trong khi kích thước tinh thể của khung sau quá trình cacbua hóa thu được từ các quá trình đã biết là khoảng 100 μm .

Các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng với các điều kiện cacbua hóa đã được mô tả ở trên thì thu được khung có diện tích bề mặt riêng cao hơn (SSA) và kích thước các hạt nhỏ hơn và không thể có được bằng các phương pháp đã được bộc lộ trước đây, điều này là rất quan trọng để đảm bảo hiệu suất chuyển dạng gỗ tự nhiên cao sau mỗi bước của quy trình.

Ví dụ so sánh 4 và Fig.14 cũng chỉ ra rằng khung sinh học sau quá trình cacbua hóa theo sáng chế chứa canxi cacbua dưới dạng một hỗn hợp mạng tinh thể tứ phương và tinh thể lập phương, trong khi khung làm bằng với các quy trình đã biết chỉ chứa canxi cacbua với mạng tinh thể tứ phương. Do canxi oxit chỉ có cấu trúc tinh thể lập phương nên việc chuyển dạng từ canxi cacbua có một phần là dạng lập phương thành canxi oxit có thể xảy ra với mức rủi ro thấp tạo những vết rạn nứt nhỏ trong khung sinh học. Điều này là cực kỳ tích cực cho chất lượng của khung sinh học thu được sau cùng.

Do đó, các điều kiện được sử dụng trong bước cacbua hóa làm giảm đáng kể số lượng các khiếm khuyết có thể nhìn thấy được trong cấu trúc lỗ phân tầng của canxi cacbua.

Ngoài ra, nhiệt độ thấp được sử dụng trong sáng chế (tức là dưới 1500°C) ngăn ngừa sự kết tụ hạt và sự gắn kết quá mức của canxi cacbua, gây ra sự méo mó cấu trúc và sai lệch so với cấu trúc vi mô của gỗ ban đầu, do đó làm giảm hiệu quả của các bước tiếp theo của quy trình.

Trong bước oxy hóa 3) của quy trình, mẫu canxi cacbua được làm nóng với mức nhiệt độ cuối cùng trong khoảng 800-1300°C, tốt nhất là nhiệt độ cuối cùng trong khoảng 1000- 1200°C.

Trong bước oxy hóa, mẫu canxi cacbua được gia nhiệt với tốc độ gia nhiệt trong khoảng 1-15°C/phút, tốt nhất là gia nhiệt với tốc độ trong khoảng 1-7°C/phút.

Sự oxy hóa canxi cacbua thu được dưới áp suất theo mô tả ở trên tạo ra khung canxi oxit với diện tích bề mặt riêng cao hơn và độ xốp cao hơn với phần có các lỗ vi và siêu vi cao hơn so với khung thu được từ các quy trình đã biết (xem ví dụ so sánh 4 và Fig.16). Thí nghiệm so sánh cho thấy rằng độ xốp vi và siêu vi được duy trì sau bước oxy hóa.

Trong bước hydrat hóa 4) của quy trình, mẫu canxi oxit được tiếp xúc với nước, qua đó cho phép hấp thu một lượng nước khoảng 1-25mol%, tốt hơn là khoảng 5-15 mol %. Bước này dẫn đến sự hình thành canxi oxit ngậm nước với lượng canxi hydroxit chiếm $\leq 50\%$ trọng lượng của cấu trúc ba chiều, chất này xúc tác cho quá trình cacbonat hóa CaO tiếp theo. Cần phải kiểm soát chặt chẽ lượng canxi hydroxit (Ca(OH)_2) như là sản phẩm trung gian để tránh sự lún sụt của cấu trúc ba chiều. Các điều kiện hydrat hóa được mô tả ở đây cho phép giữ lượng canxi hydroxit ở mức $\leq 50\%$.

Theo phương án thực hiện ưu tiên, bước hydrat hóa được tiến hành cùng lúc với bước cacbonat hóa, cụ thể là bằng cách sử dụng CO_2 được làm giàu với nước.

Trong bước cacbonat hóa 5) của quy trình, việc sử dụng nhiệt độ cao trong khi tăng dần áp suất CO_2 trong hệ thống lên đến các giá trị được đề cập ở trên cho phép chuyển dạng hoàn toàn canxi oxit ngậm nước thành dạng canxi cacbonat có độ kết dính và độ bền cơ học cao ngoài mong đợi.

Bước cacbonat hóa của quy trình có thể được thực hiện theo một trong các chu trình nhiệt sau đây:

- tại mức áp suất CO_2 không đổi khoảng 10-15 MPa, từ từ tăng giá trị nhiệt độ trong khoảng 750-850°C, tốt nhất là vào khoảng 800°C;
- ở nhiệt độ không đổi khoảng 750-850°C (hoặc khoảng 700-800°C), tốt nhất là ở khoảng 800°C tiến hành tăng áp suất lên đến khoảng 10-15 MPa;
- duy trì áp suất ở khoảng 4-6 MPa trong khi nâng nhiệt độ lên đến khoảng 750-850°C (hoặc khoảng 700-800°C), tốt nhất là lên đến khoảng 800°C và sau đó tăng áp suất lên đến khoảng 10-15 MPa.

Quá trình cacbonat hóa xảy ra thông qua sự hình thành các chất trung gian phản ứng, như canxi hydroxit. Điều này dẫn đến canxi cacbonat cuối cùng được đặc trưng

bởi một cấu trúc mịn không chứa bất cứ tinh thể lập phương cỡ lớn nào của canxi cacbonat ($> 10\mu\text{m}$) mà có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của cấu trúc ba chiều. Ví dụ so sánh 4 và các Fig.17-Fig.18 cho thấy, nhờ vào việc thực hiện bước hydrat hóa, sau đó bước cacbonat hóa nên thu được cấu trúc mịn hơn so với cấu trúc ba chiều trung gian thu được từ các quy trình đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Quá trình cacbonat hóa được thực hiện trong các điều kiện được mô tả ở trên đưa đến kết quả khung hydroxyapatit sinh học thu được từ quy trình theo sáng chế có đặc tính cơ học tốt hơn so với các quy trình đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, trong đó bước cacbonat hóa được thực hiện ở nhiệt độ cao và áp suất thấp hoặc ở áp suất cao và nhiệt độ thấp.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc đạt được các tính năng nói trên của canxi cacbonat là một điều kiện quan trọng để cho phép chuyển dạng hoàn toàn các mảnh lớn (cụ thể là $\geq 2\text{ cm}$) thành khung sinh học có thành phần mong muốn và duy trì được cấu trúc vi mô của gỗ ban đầu.

Trong bước phosphat hóa 6) của quy trình, ít nhất một muối phosphat có thể được lựa chọn từ nhóm gồm amoni phosphat, natri phosphat và kali phosphat. Việc sử dụng amoni phosphat cho phép kiểm soát tốt hơn pH, qua đó khiến quá trình chuyển dạng hiệu quả hơn và vật liệu thu được có các đặc tính cơ học và sự gắn kết vật lý tốt.

Trong bước phosphat hóa của quy trình, mẫu canxi cacbonat có thể được nhúng ngập trong một dung dịch chứa ít nhất một trong số các muối phosphat được đề cập nêu trên. Dung dịch có thể có nồng độ 0,1-5 M, tốt nhất là có nồng độ 0,5-2,0 M.

Tỷ lệ ban đầu của PO_4/CO_3 trong bước phosphat hóa của quy trình tốt hơn là gấp 1,5-5 lần giá trị hệ số tỷ lượng theo lý thuyết, tốt nhất là gấp 2-4 lần giá trị hệ số tỷ lượng theo lý thuyết.

Trong bước phosphat hóa của quy trình, mẫu canxi cacbonat nhúng ngập trong dung dịch giàu phosphat có thể được làm nóng đến 25-300°C dưới áp suất hơi với giá trị trong khoảng 0,1-2,5 MPa (điều kiện nhiệt độ thủy nhiệt).

Bước phosphat hóa có thể kéo dài khoảng 12-180 giờ, tốt hơn là khoảng 48-120 giờ, tốt nhất là 24-72 giờ.

Giá trị pH ban đầu của dung dịch giàu phosphat trong bước phosphat hóa của quy trình tốt hơn là pH trong khoảng từ 7-12.

Việc thay thế hydroxyapatit bằng các ion khác có thể đạt được bằng cách bổ sung muối hòa tan thích hợp có chứa ion trong suốt hoặc sau khi hoàn thiện quá trình, tốt nhất là tiến hành trong quá trình phosphat hóa. Các ion thích hợp có thể bao gồm stronti, magie, silic, titan, cacbonat, natri, kali, gali, bạc, đồng, sắt, kẽm, mangan, europi, gadolin. và hỗn hợp của chúng. Một ví dụ của dung dịch chứa các ion magie là $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, và một ví dụ của dung dịch chứa các ion stronti là $SrCl_2 \cdot 6H_2O$.

Theo kết quả của việc pha lẫn ion, khung sinh học cuối cùng bao gồm hoặc chứa một loại vật liệu bao gồm hoặc chứa hydroxyapatit pha tạp và canxi phosphat.

Theo phương án thực hiện, khi gỗ tự nhiên chưa được định hình thành dạng và kích thước thích hợp để được sử dụng làm bộ phận thay thế xương (tức là nếu bước i) không được thực hiện), thì khung hydroxyapatit sinh học thu được từ quy trình kể trên có thể được tạo hình một cách dễ dàng thành khung có hình dạng theo yêu cầu bằng các kỹ thuật hiện nay.

Sáng chế cũng đề xuất cấu trúc khung hydroxyapatit sinh học thu được (hoặc có khả năng thu được) từ quy trình được mô tả ở trên, có các đặc tính cơ học và vật lý được nâng cao khi so sánh với hydroxyapatit có cấu trúc phân tầng thu được từ các quy trình tương tự đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Cụ thể là, khung hydroxyapatit sinh học thu được (hoặc có khả năng thu được) từ quy trình theo sáng chế có tất cả các đặc tính được mô tả cho khung hoặc bộ phận thay thế xương theo sáng chế.

Cụ thể là, so với các sản phẩm đã biết, khung sinh học cuối cùng thu được bởi quy trình được mô tả ở đây có độ xốp cao hơn với tỷ lệ phần trăm cao các lỗ vi và siêu vi so với các loại khung thu được bởi các quy trình tương tự được biết đến trước đó trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Đặc biệt, khung hydroxyapatit theo sáng chế có độ xốp tổng số đạt ít nhất 25%, tốt nhất là 25-50% do các lỗ có đường kính $\leq 1 \mu m$, tốt hơn là $\leq 0,1 \mu m$, tốt nhất là trong khoảng 0,01-0,1 μm .

Theo khía cạnh lâm sàng, tỷ lệ phần trăm cao các lỗ vi và siêu vi rất hữu ích, vì các lỗ vi và siêu vi cho phép có sự trao đổi các dịch dinh dưỡng và đào thải các chất thải từ quá trình trao đổi chất của tế bào, qua đó cải thiện sự tái tạo xương.

Hơn nữa, khung sinh học theo sáng chế thể hiện diện tích bề mặt riêng cao hơn (9 đến 20 m^2/g so với 5-6 m^2/g) so với khung thu được từ quy trình đã biết trong cùng

lĩnh vực kỹ thuật. Diện tích bề mặt cao quyết định hoạt tính sinh học bề mặt được tăng cường và tính thấm ẩm được tăng cường của khung hoặc bộ phận thay thế xương, qua đó cải thiện quá trình kết tụ và tái hấp thu sinh học.

Ngoài ra, khung sinh học theo sáng chế bao gồm các hạt hydroxyapatit có kích thước khoảng 100-200 nm (tức là hạt cỡ nano), nhỏ hơn nhiều so với các hạt có trong hydroxyapatit thiêu kết (cụ thể là $> 1 \mu\text{m}$). Các hạt nhỏ cho thấy lợi ích về mặt lâm sàng cho việc tái tạo xương bởi chúng có thể được các tế bào tái hấp thu lại dễ dàng hơn, do đó cho phép tái tạo xương tốt hơn so với các khung đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, khung sinh học theo sáng chế thể hiện độ bền nén lớn hơn 5 MPa, tốt nhất là 10-20 MPa, được đo theo dọc theo các lỗ dạng kênh (theo chiều dọc) và độ bền nén dọc theo hướng vuông góc của trục dài của các rãnh (theo chiều ngang) lên đến 10 MPa. Các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng các tính năng cơ học này khiến cho khung hydroxyapatit cuối cùng giống như một loại vật liệu độc lập, do đó nó có thể được ứng dụng trong các quy trình tái tạo các bộ phận xương chịu tải mà không phải sử dụng thêm bất kỳ cấu trúc gia cố hoặc duy trì nào như áo khuôn hoặc thanh nẹp.

Trong tự nhiên, tinh thể cỡ nano, hydroxyapatit được thể bằng ion là thành phần chính trong các mô cứng của cơ thể; trên thực tế, trạng thái khoáng trong xương là trạng thái cấu trúc nano cấu tạo gồm các tiểu cầu hydroxyapatit phân tán mịn có kích thước dưới 100 nm tổ chức theo cấu trúc xốp có cấu trúc phân tầng ba chiều trên toàn bộ mô xương.

Về mặt này, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, khi so sánh với các kỹ thuật hiện nay, sự chuyển dạng sinh học của các cấu trúc gỗ tự nhiên thu được theo quy trình được mô tả ở trên, có thể tạo ra các khung xương hydroxyapatit cuối cùng cho thấy thành phần giống với xương, có độ xốp cao và các lỗ rỗng cỡ nhỏ/vi/siêu vi được kết nối với nhau và độ bền cơ học cao, có kích thước phù hợp để ứng dụng vào các vị trí chịu tải, cụ thể là đoạn xương dài của chi, chân hoặc vùng xương hàm - mặt lớn, hoặc ở cột sống.

Tất cả những đặc điểm này chưa bao giờ được thể hiện xảy ra đồng thời, vì vậy chúng có tầm quan trọng vượt trội để cho phép tái tạo xương trên diện rộng tại các vị trí chịu tải. Sự khác biệt trong cấu trúc khung hydroxyapatit sinh học có thể thu được nhờ

quy trình theo sáng chế tạo ra lợi ích theo góc độ lâm sàng quan trọng được thể hiện trong ví dụ so sánh 6. Đặc biệt, khung này thể hiện sức quy tụ cao hơn sự biểu hiện gen liên quan đến sinh xương so với khung kỹ thuật hiện nay, điều này có nghĩa là có hiệu quả lâm sàng tốt hơn về tái tạo xương.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau đây, nhưng các ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa mà không giới hạn sáng chế.

Các phương pháp đo

Độ xốp tổng số của gỗ được đưa qua bước nhiệt phân (gỗ được nhiệt phân): một mảnh gỗ được nhiệt phân, được tạo hình dạng lăng trụ hoặc dạng hình trụ được cân, sau đó tính thể tích bằng cách đo đường kính và chiều cao. Mật độ tuyệt đối (AD) của gỗ được nhiệt phân thu được bằng tỷ lệ trọng lượng/thể tích; mật độ tương đối (RD) thu được bằng cách chia AD của gỗ được nhiệt phân cho mật độ tính theo lý thuyết của cacbon (tức là $RD = AD/2,25$). Độ xốp tổng số (%) thu được bằng biểu thức $(1-RD) * 100$.

Độ xốp tổng số của khung thu được sau mỗi bước của quy trình và của khung hydroxyapatit sinh học thu được vào cuối quy trình:

Độ xốp được tính toán bằng cách áp dụng phương pháp tương tự như trên với mật độ tính theo lý thuyết của từng loại vật liệu thu được sau mỗi bước (tức là mật độ tính theo lý thuyết của CaC_2 , CaO , $CaCO_3$, HA).

Độ bền nén: Khung hoặc bộ phận thay thế xương thu được cuối cùng được tạo hình dưới dạng hình lăng trụ hoặc hình trụ được chịu tải bằng cách sử dụng một máy kiểm tra kiểu trục vít đa năng để thu được các đường cong biến dạng - ứng suất và trọng tải phá hoại. Độ bền nén được tính bằng tỷ lệ giữa trọng tải phá hoại và diện tích bị nén.

Đường kính lỗ rỗng: Sự phân bố kích thước các lỗ và hình thái lỗ của khung cuối cùng hoặc khung thu được sau mỗi bước được đánh giá tương ứng bằng giá trị đo độ xốp bằng phương pháp thủy ngân và kính hiển vi điện tử quét (SEM). Việc phân tích độ xốp bằng phương pháp thủy ngân dựa trên việc định lượng thủy ngân trong các lỗ của mẫu ở các áp suất khác nhau.

Các trạng thái tinh thể: việc xác định và định lượng các trạng thái của tinh thể trên khung được thực hiện bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD), đánh giá kết quả về tỷ lệ bức xạ X trên mẫu, ở các góc khác nhau và liên tục.

Diện tích bề mặt riêng: tổng diện tích bề mặt của vật liệu trên một đơn vị thể tích khối (m^2/g) được đánh giá sử dụng phương pháp BET, ước lượng từ lượng khí được hấp phụ trong mối quan hệ với áp suất của nó.

Ví dụ 1: Sản xuất hydroxyapatit có nguồn gốc từ gỗ bằng cách sử dụng quy trình:

i) Một mảnh gỗ mây tự nhiên được tạo hình dạng hình trụ có kích thước như sau: đường kính = 2 cm; chiều cao = 3 cm;

1) Nhiệt phân gỗ tự nhiên

Mảnh gỗ ban đầu được làm khô ở 70°C trong 24 giờ, sau đó được xử lý ở 800°C trong hơn 30 phút dưới dòng khí nitơ, qua đó chuyển dạng thành mẫu cacbon tinh khiết. Chu trình nhiệt: gia nhiệt ở tốc độ $1^\circ\text{C}/\text{phút}$ lên đến 350°C và tốc độ $2^\circ\text{C}/\text{phút}$ từ 350°C lên 800°C . Mẫu được duy trì ở nhiệt độ 800°C trong ít nhất 30 phút và sau đó mẫu được làm mát ở tốc độ $1^\circ\text{C}/\text{phút}$.

2) Cacbua hóa

Mẫu cacbon được làm nóng ở 1000°C dưới môi trường argon và canxi ở 50 Pa (0,5 mbar), qua đó chuyển dạng thành dạng canxi cacbua. Thời gian duy trì ở 1000°C là 30 phút.

3) Oxy hóa

Mẫu canxi cacbua được gia nhiệt trong không khí đến 1100°C theo tỷ lệ gia nhiệt trong khoảng $1-7^\circ\text{C}/\text{phút}$, qua đó cho phép chuyển dạng hoàn toàn thành canxi oxit.

4) Hydrat hóa

Dạng canxi oxit được hoạt hóa bằng cách cho tiếp xúc với nước, qua đó cho phép nước được thu nhận với lượng khoảng 10% mol.

5) Cacbonat hóa

Dạng ngậm nước ở điều kiện trước được gia nhiệt đến 800°C dưới một áp suất CO_2 tăng dần từ 0,5 đến 10 MPa. Điều này làm biến đổi dạng canxi oxit thành canxi cacbonat.

6) Phosphat hóa

Dạng canxi cacbonat được nhúng hoàn toàn trong dung dịch amoni phosphat 0,5 M và tỉ lệ PO_4/CO_3 ban đầu gấp 2 lần hệ số tỷ lượng theo lý thuyết, ở nhiệt độ 200°C dưới áp suất hơi nước là 2 MPa.

Độ bền nén của khung được đánh giá bằng cách sử dụng các lực cơ học dọc theo hướng vuông góc và hướng ngang, so với hướng của các lỗ dạng kênh.

Bằng cách đặt tải dọc theo hướng lỗ rỗng (cấu trúc phản xạ lâm sàng nhất để bắt chước *kích thích* cơ sinh học *trong cơ thể* trong trường hợp xương là đoạn dài), khung (được phát triển dưới dạng hình trụ rỗng có đường kính ngoài = 15 mm, đường kính trong = 6 mm, chiều cao = 20 mm và kích thước lỗ chiếm 60-65% thể tích) thể hiện độ bền nén đến 16 MPa (tức là 250 kg tải trọng tối đa (Fig.1 và Fig.3). Theo chiều ngang, khung thể hiện độ bền nén lên đến 4 MPa.

Khung cũng có được đưa vào xử lý nhiệt ở nhiệt độ cao tối đa là 1300°C , trong môi trường được kiểm soát, để làm tăng thêm độ bền cơ học của khung.

Các đặc tính cấu trúc giống như xương của khung sinh học cho phép truyền thông tin từ mô đến các tế bào để tạo mô xương mới có cấu trúc được tổ chức. Điều này đã được khẳng định bằng các thử nghiệm *in vivo* đặt khung vào xương đùi thỏ và vòm sọ chuột.

Khung không gây ra bất kỳ phản ứng phụ độc hại nào cũng như không hoại tử hoặc nhiễm trùng sau phẫu thuật. Khung này đã tạo ra sự hình thành tập đoàn tế bào rộng rãi bằng việc xương được tạo mới sau 1 tháng, tương tự như đối chứng là khung xốp apatit thương mại: EngiPore, Finceramica S.p.A., Ý.

Các mô từ vòm sọ chuột được nuôi cấy đã cho thấy sự hình thành một cách rộng rãi của xương và sự thâm nhập vào các lỗ của khung cả khi khung được độc lập và khi các tế bào nguyên bào xương được cấy vào khung được cấy ghép (Fig.2a-d). Các lỗ dạng kênh của khung đã tạo ra sự tạo hình cho cấu trúc xương bắc chước theo hệ Havers (như được chỉ ra bằng các mũi tên trên Fig.2f). Hơn nữa, các lỗ dạng kênh của khung tạo ra sự tạo mạch một cách nhanh chóng để hỗ trợ sự hình thành và thâm nhập

của xương mới. Kết quả này xác nhận rằng một định hướng thích hợp của lỗ rỗng trong mối quan hệ với sự định hướng của mạng lưới mạch nội sinh có thể có hiệu quả trong việc thúc đẩy sự phát triển sớm của sự hình thành mạch máu.

Ví dụ 2: So sánh hydroxyapatit sinh học theo sáng chế và hydroxyapatit có được cấu trúc phân tầng đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật

Một thử nghiệm so sánh đã được thực hiện giữa sự phân bố kích thước lỗ của hydroxyapatit sinh học theo sáng chế thu được từ gỗ mây tự nhiên và sự phân bố kích thước lỗ của hydroxyapatit được cấu trúc phân tầng thu được từ gỗ tự nhiên tương tự theo hướng dẫn của Anna Tampieri và cộng sự trên *Journal of Material Chemistry*, 2009, 19, 4973-4980 sử dụng phương pháp hướng dẫn của Ruffini và cộng sự trên *Tạp chí kỹ thuật hóa học* 217 (2013) 150-158 cho bước phosphat hóa (hỗn hợp của $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH = 9, $T_{\text{max}} = 60^\circ\text{C}$, thời gian = 80h).

Các kết quả được thể hiện trên Fig.4, trong đó các cột đen thể hiện hydroxyapatit sinh học theo sáng chế và các cột màu xám tối thể hiện hydroxyapatit đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Rõ ràng là có sự gia tăng số lượng lỗ có đường kính trong khoảng 200-300 μm của hydroxyapatit sinh học theo sáng chế so với các hydroxyapatit được cấu trúc phân tầng đã biết, các lỗ này là những lỗ với kích thước phù hợp để thúc đẩy sự tạo mạch sinh lý của hydroxyapatit sinh học khi được cấy ghép vào để thay thế xương.

Hơn nữa, trên Fig.4 còn thể hiện sự tăng số lượng lỗ có đường kính nằm trong khoảng 0,01-0,1 μm , điều này rõ ràng chỉ ra rằng cấu trúc vi mô của gỗ tự nhiên được duy trì trong sản phẩm cuối cùng.

Ví dụ 3: Chế tạo hydroxyapatit có nguồn gốc từ gỗ được pha tạp với Mg^{2+} và/hoặc Sr^{2+} :

Các bước 1-5 của phương pháp như mô tả trong ví dụ 1 được tiếp tục để tạo ra dạng canxi cacbonat. Việc pha tạp Mg^{2+} và/hoặc Sr^{2+} đã đạt được theo từng phương pháp sau:

Phương pháp 1

Dung dịch Sr^{2+} (ở dạng SrCl) được thêm vào dung dịch giàu phosphat 1,0 M. Dạng canxi cacbonat được điều chế theo phương pháp nhiều bước sau đó được nhúng ngập vào trong dung dịch đã kết hợp và được nung ở nhiệt độ 200°C dưới áp suất hơi

nước là 2 MPa. Điều này tạo ra hydroxyapatit được pha tạp Sr^{2+} với hình thái của mảnh gỗ ban đầu.

Phương pháp 2

Dạng canxi cacbonat được nhúng ngập trong dung dịch giàu phosphat 1,0 M. Dung dịch Sr^{2+} được thêm vào dần dần trong dung dịch đang gia nhiệt ở nhiệt độ 25-90°C dưới áp suất hơi nước 0,1 MPa. Điều này tạo ra hydroxyapatit được pha tạp Sr^{2+} với hình thái của mảnh gỗ ban đầu.

Phương pháp 3

Dạng canxi cacbonat tinh khiết (hoặc được chuyển dạng một phần thành hydroxyapatit bằng cách ngâm vào dung dịch giàu dung dịch phosphat 1,5M ở nhiệt độ phòng hoặc cao hơn trong 24h) được ngâm trong nước hoặc dung dịch hữu cơ chứa ion Sr^{2+} trong 24h. Sau đó nó được lấy ra khỏi dung dịch và được ngâm trong dung dịch giàu phosphat 1,5M. Trong khi đó, dung dịch đang được gia nhiệt ở nhiệt độ 200°C dưới áp suất hơi nước trong khoảng 0,5-1,5 MPa. Điều này tạo ra hydroxyapatit được pha tạp Sr^{2+} với hình thái của mảnh gỗ ban đầu.

Các đặc tính của khung được thể với stronti

Khung hydroxyapatit được thể stronti đã được phát triển và phát hiện thấy khả năng sống sót của tế bào gốc trung mô (MSCs) tăng so với các khung không có stronti (Fig.5).

Khung stronti cũng cho thấy hình thái lan truyền tốt và sự biểu hiện được gia tăng của các gen liên quan đến sự hình thành xương, như RUNX2 và ALP (Fig.6), do đó hoạt động dưới dạng gen khởi động biệt hóa nguyên bào xương. Đặc biệt, khi so sánh với khung không chứa Sr, nhận thấy đã có sự gia tăng đáng kể mRNA của cả hai gen ($p < 0,05$). Sự gia tăng này đặc biệt cao đối với khung với 2 mol% Sr

Sự tăng sinh mạnh mẽ của các tiền nguyên bào xương trong 14 ngày nghiên cứu được quan sát thấy khi sử dụng khung hydroxyapatit được thể bởi Sr (Fig.7). Trên thực tế, sự gia tăng stronti trong khung tạo ra khả năng tồn tại của các tế bào cao hơn trong thời gian dài. Các kết quả này ngụ ý rằng sự hình thành xương mới có thể được đem lại và duy trì thành công.

Khung cũng cho thấy khả năng duy trì kiểu hình nguyên bào xương trong suốt hai tuần nghiên cứu (Fig.8).

Các phản ứng của các tế bào khi tiếp xúc với khung được thay thế stronti cũng đã được nghiên cứu bằng cách quan sát phản ứng của nguyên bào xương. Sự phân tích hình thái sơ bộ đã được thực hiện để xác nhận và công nhận mô hình sinh tế bào hủy xương. Các tế bào hủy xương phát triển trên bề mặt khung bộc lộ hình thái đặc trưng của chúng.

Đánh giá sự biểu hiện gen liên quan đến chỉ thị chính liên quan đến hoạt động và sự hình thành của tế bào hủy xương (Oscar, Integrin $\beta 3$ và CathepsinK) (Fig.9). Phân tích cho thấy sự giảm biểu hiện gen một cách đáng kể theo thời gian của tất cả các gen tham gia vào các con đường phân tử chính của tế bào hủy xương, do đó chỉ ra rằng sự hiện diện của ion Sr^{2+} trong khung ức chế, sự hình thành và hoạt động của tế bào hủy xương.

Tóm lại, sự thay thế hydroxyapatit với ion Sr^{2+} đã tạo ra hiệu quả sinh học đối với các tế bào xương, cụ thể là: i) tác động có ý nghĩa đáng kể đối với các gen có liên quan đến tạo xương MCSs; ii) tác động cảm ứng việc tăng sinh nguyên bào xương và iii) hiệu quả ức chế hoạt động của các tế bào hủy xương.

- Trong trường hợp cấy ghép vào khiếm khuyết đoạn xương, khung mới được thiết kế có ống ở trung tâm mở rộng theo hướng song song với lỗ rỗng chính theo hướng duy nhất để tiếp xúc với các gốc xương để dẫn hướng cho sự phát triển tủy xương mới (Fig.1). Kích thước rãnh được xác định dựa trên khiếm khuyết cụ thể; tuy nhiên, để duy trì đủ độ mạnh, rãnh có đường kính trong khoảng 20 đến 60% đối với toàn bộ chiều rộng của khung.

Ví dụ 4: So sánh hydroxyapatit sinh học theo sáng chế và hydroxyapatit có được cấu trúc phân tầng đã biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật

Một thử nghiệm so sánh đã được thực hiện giữa hydroxyapatit sinh học sử dụng quy trình theo sáng chế và hydroxyapatit thu được từ gỗ tự nhiên tương tự (gỗ mây) theo hướng dẫn của Anna Tampieri và cộng sự trên *Journal of Material Chemistry*, 2009, 19, 4973-4980. Gỗ mây được sử dụng trong quy trình theo sáng chế có chiều dài được đo dọc theo hướng có kích thước tối đa, bằng 2 cm. Gỗ mây được sử dụng trong quy trình kỹ thuật hiện nay có chiều dài, được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung là tối đa, bằng 1 cm.

Sau mỗi bước của hai quy trình, diện tích bề mặt riêng (SSA) và sự phân bố lỗ của các khung trung gian và khung cuối cùng được phân tích và so sánh (xem các

Fig.10, Fig.16, Fig.19 và Fig.20). Ngoài ra, sau bước cacbua hóa, kích thước tinh thể canxi cacbua của hai khung trung gian được so sánh (xem từ Fig.13 – các hình vẽ dưới).

Cấu trúc mạng tinh thể của hai khung canxi cacbua đã được so sánh sau bước cacbua hóa. Sự so sánh được thể hiện trên Fig.14.

Fig.10 là biểu đồ minh họa sự so sánh độ phân bố lỗ của hai khung canxi cacbua thu được sau bước cacbua hóa tương ứng theo kỹ thuật hiện nay và theo sáng chế và so sánh với độ phân bố lỗ của gỗ được nhiệt phân ban đầu. Diện tích bề mặt riêng của hai khung canxi cacbua cũng được thể hiện trên hình vẽ. Kết quả cho thấy rằng chỉ có khung canxi cacbua canxi thu được sau bước cacbua hóa theo sáng chế mới duy trì được sự phân bố các vi lỗ và siêu vi lỗ của gỗ mây (kích thước lỗ $< 1\mu\text{m}$). Ngoài ra việc so sánh hai diện tích bề mặt riêng cũng cho thấy sự cải tiến của các khung theo sáng chế.

Từ Fig.11, Fig.12 và Fig.13 – đến hai hình vẽ ở trên là hình SEM từ phía trên của hai khung canxi cacbua, từ đó có thể nhìn thấy rõ ràng rằng sự duy trì tốt hơn các vi lỗ và siêu vi lỗ của gỗ tự nhiên.

Từ Fig.13 – đến hai hình vẽ dưới là hình ảnh chụp từ phía dưới so sánh kích thước của các hạt canxi cacbua; các canxi carbua thu được theo sáng chế cho thấy các hạt có kích thước trung bình khoảng $10\mu\text{m}$, trong khi hạt thu được với quy trình kỹ thuật hiện nay có kích thước trung bình khoảng $100\mu\text{m}$.

Fig.14 là hình vẽ so sánh trạng thái tinh thể của hai khung canxi cacbua, được đo bằng tia X-XRD. Kết quả cho thấy canxi cacbua thu được theo sáng chế có cả mạng tinh thể tứ phương và mạng tinh thể lập phương, trong khi canxi cacbua kỹ thuật hiện nay chỉ có mạng tinh thể tứ phương. Khung canxi cacbua theo sáng chế có chứa một lượng Ca(OH)_2 cao hơn so với khung đã biết.

Fig.15 là hình ảnh SEM của khung canxi oxit thu được sau các bước oxy hóa tương ứng. Các Fig tương ứng với khung thu được theo sáng chế duy trì độ xốp vì mô giữa các hạt CaO , trong khi ở khung theo kỹ thuật hiện nay thì độ xốp vì mô bị mất hoàn toàn.

Fig.16 là biểu đồ minh họa sự phân bố lỗ của hai khung canxi oxit. Sự so sánh rõ ràng cho thấy rằng đoạn có độ xốp vi mô và siêu vi mô cũng như diện tích bề mặt riêng thu được sau bước oxy hóa là cao hơn ở khung theo sáng chế.

Fig.17 và 18 là hình ảnh SEM của CaCO_3 thu được sau quá trình cacbonat hóa tương ứng. Vật liệu theo sáng chế thể hiện cấu trúc mở rộng khá tốt, được so sánh với vật liệu đã biết có tinh thể canxi lớn (khoảng $50\text{ }\mu\text{m}$) đặc trưng cho toàn bộ cấu trúc. Các tinh thể cỡ lớn khiến cho cấu trúc vỡ hoặc sụp đổ trong suốt quá trình phosphat hóa.

Fig.19 là biểu đồ minh họa sự phân bố lỗ của hai khung canxi cacbonat thu được sau bước cacbonat hóa. Việc so sánh sự phân bố của lỗ và diện tích bề mặt riêng cho thấy kết quả tương tự như đã đề cập ở trên đối với canxi oxit: cấu trúc vi lỗ và siêu vi lỗ $<1\mu\text{m}$ được duy trì với quy trình theo sáng chế và SSA thu được cao hơn so với kỹ thuật hiện nay.

Fig.20 là biểu đồ minh họa sự phân bố lỗ rỗng của khung hydroxyapatit sinh học cuối cùng (sau quá trình phosphat hóa) thu được từ quy trình theo sáng chế so với khung hydroxyapatit sinh học cuối cùng của quy trình đã biết. Sự so sánh SSA tương ứng cũng được thể hiện.

Các kết quả cho thấy rằng khung sinh học theo sáng chế có phần độ xốp vi mô và siêu vi mô cao hơn so với khung đã biết cũng như diện tích bề mặt riêng cao hơn.

Ví dụ 5: Quy trình đã biết được áp dụng cho mảnh gỗ mây có chiều dài được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung là tối đa, bằng 2 cm

Thử nghiệm được thực hiện để chứng minh rằng quy trình đã biết (Anna Tampieri và cộng sự trên *Journal of Material Chemistry*, 2009, 19, 4973-4980) không cho phép khung được sản xuất có chiều dài, được đo dọc theo hướng sao cho kích thước của khung là tối đa, bằng hoặc lớn hơn 2 cm, tức là các khung chỉ chuyên cho tái tạo xương.

Để thực hiện mục đích này, mảnh gỗ mây đã được đưa vào các bước tiến trình theo các điều kiện được mô tả theo Tampieri và cộng sự.

Fig.21 cho thấy ngay cả trước bước phosphat hóa thì khung cũng có thể vỡ ra. Fig.22 cho thấy ngay cả khi khung đi qua được quá trình phosphat hóa thì sau quá trình phosphat hóa khung cũng vỡ ra.

Các thử nghiệm cho thấy rõ ràng rằng sản xuất gồm quy mô lớn thường không phải là hoạt động đơn giản; thay vào đó phải thay đổi các điều kiện của quy trình (đôi

khi thay đổi rất nhiều) để tạo ra các sản phẩm cỡ lớn hơn, ngay cả khi quy trình sản xuất sản phẩm gồm nhỏ đã được biết trong cùng lĩnh vực kỹ thuật..

Ví dụ 6: Kiểm tra so sánh

Một nghiên cứu *in vi tro* đã được thực hiện với tế bào gốc trung mô ở chuột (mMSCs). Định hình sự biểu hiện gen đã được phân tích để kiểm tra sự biểu hiện trên của các gen cụ thể có liên quan đến sự biệt hóa mô xương được tạo ra bởi khung hydroxyapatit sinh học thu được theo sáng chế và một khung hydroxyapatit sinh học thu được bằng quy trình kỹ thuật hiện nay.

Mô tả mẫu

Hai khung kiểm tra được xác định như sau:

	Mẫu vật			Kích thước đĩa	Số lượng mẫu	Phương pháp khử trùng
Khung của sáng chế	được pha tạp (sáng chế)	Ca/P = Mg/Ca = Sr/Ca =	1,65 1,64 0,59	Ø: 8,00 mm, Chiều dài: 4,00 mm,	5	EtOH + chiếu tia UV
	Không pha tạp (sáng chế)	Ca/P =	1,70	Ø: 8,00 mm, Chiều dài: 4,00 mm,	5	EtOH + chiếu tia UV
Khung của Tampieri và cộng sự	Không pha tạp (sản phẩm đã biết)	Ca/P = 1,77		Ø: 8,00 mm, Chiều dài: 4,00 mm,	8	25 kGy - tia bức xạ γ (GammaRad)

Kết quả

Các gen được kiểm tra, liên quan đến cả trạng thái sớm (Runx2 và ALP) và trạng thái muộn (OPN) liên quan đến sự biệt hóa mô xương, dường như được tăng lên trong các tế bào được nuôi trong tất cả các khung theo sáng chế so với các khung đã biết, với sự khác biệt đáng kể của hai gen Runx2 và OPN ($p \leq 0,0001$). Không có sự khác biệt nào được quan sát thấy trong biểu hiện gen BMP2 và Col15 trong tất cả các mẫu được kiểm tra, có thể vì BMP2, là gen điều hòa vùng phía trên của con đường biệt hóa, sau

14 ngày nuôi cấy tối ưu, chúng đều sẵn sàng thực hiện các chức năng sinh học như đã đề cập bằng việc tăng điều hòa của các gen Runx2, Alp và OPN [1]. Trái lại, Col15 là một chỉ thị rất muộn về sản xuất ma trận xương được khoáng hóa [2] và có thể thời gian nuôi cấy không đủ để tạo ra biểu hiện của nó. Không có sự khác biệt nào giữa hiệu quả thu được của khung theo sáng chế pha tạp và không pha tạp (xem Fig.23).

Fig.23 thể hiện sự định lượng tương đối ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) biểu hiện gen đối với sự biểu hiện của khung không pha tạp của kỹ thuật hiện nay được sử dụng làm giá trị chuẩn, sau 14 ngày mMSCs 3D được nuôi cấy trong điều kiện tối ưu với tất cả các mẫu được kiểm tra. Sai số trung bình và tiêu chuẩn của ba mẫu được chỉ định. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phương pháp ANOVA hai yếu tố, tiếp theo bằng phân tích hậu kiểm Bonferroni và sự khác biệt đáng kể được chỉ ra trên biểu đồ:**** $p \leq 0.0001$.

Từ những thử nghiệm trên, có thể khẳng định rằng khung theo sáng chế thể hiện sự biểu hiện của cao các gen liên quan đến sự sinh xương so với khung của kỹ thuật hiện nay.

Tài liệu tham khảo

[1] Arch Oral Biol. 01/2013;58(1):42-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.07.010. Epub 9/8/2012. *Leader genes in osteogenesis: a theoretical study*. Orlando B, Giacomelli L, Ricci M, Barone A, Covani U.

[2] J Cell Physiol. 8/2012;227(8):3151-61. doi: 10.1002/jcp.24001. *Extracellular calcium chronically induced human osteoblasts effects: specific modulation of osteocalcin and collagen type XV*. Gabusi E, Manferdini C, Grassi F, Piacentini A, Cattini L, Filardo G, Lambertini E, Piva R, Zini N, Facchini A, Lisignoli G.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Khung hydroxyapatit sinh học thu được từ gỗ có độ xốp tổng số ít nhất 20%, tốt hơn là 40%, tốt hơn nữa là từ 60% đến 95%, độ xốp này được đo sau khi đưa gỗ qua bước nhiệt phân, khung này có chiều dài được đo dọc theo hướng khung có kích thước tối đa, lớn hơn hoặc bằng 2 cm.
2. Khung theo điểm 1, trong đó khung này có độ bền nén được đo theo chiều dọc, lớn hơn 5 MPa, tốt hơn là nằm trong khoảng 10-40 MPa, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 10-20 MPa.
3. Khung theo điểm 1 hoặc 2, trong đó khung này có cấu trúc lỗ được tổ chức phân tầng được tạo thành từ cấu trúc lỗ được tổ chức phân tầng của gỗ dùng để thu được khung này.
4. Khung theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó gỗ được chọn từ nhóm gồm mây, thông, abachi, balsa, sipo, sồi, cẩm lai, kempas và gỗ óc chó, tốt nhất là mây.
5. Khung theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-4, trong đó cấu trúc lỗ có cấu trúc được tổ chức phân tầng có 30-80% độ xốp tổng số là các lỗ có đường kính dưới 150 μm , và phần còn lại cho tới 100% độ xốp tổng số là các lỗ có đường kính lớn hơn 150 μm .
6. Khung theo điểm 5, trong đó nếu gỗ là gỗ mây thì 30-60% độ xốp tổng số của khung do các lỗ có đường kính $\leq 10 \mu\text{m}$.
7. Khung theo điểm 5, trong đó nếu gỗ là gỗ mây thì 25%, tốt nhất là 25-50% độ xốp tổng số của khung do các lỗ có đường kính $\leq 1 \mu\text{m}$, tốt hơn là $\leq 0,1 \mu\text{m}$, tốt hơn nữa là trong khoảng 0,01-0,1 μm .
8. Khung theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó nếu gỗ là gỗ mây thì ít nhất 20% độ xốp tổng số của khung do các lỗ có đường kính $\geq 150 \mu\text{m}$.
9. Khung theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8, trong đó khung này có diện tích bề mặt riêng (SSA) $> 9 \text{ m}^2/\text{g}$, tốt nhất là 9-20 m^2/g .
10. Khung theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó hydroxyapatit được thay thế một phần bằng một hoặc nhiều ion được lựa chọn từ nhóm bao gồm magie,

stronti, silic, titan, cacbonat, natri, kali, bạc, gali, đồng, sắt, kẽm, mangan, europi và gadolini.

11. Khung theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó khung được sử dụng trong lĩnh vực y tế, tốt nhất là được sử dụng làm bộ phận thay thế xương, trong đó tốt nhất là bộ phận thay thế xương này có hình dạng tương ứng với hình dạng của khiếm khuyết xương cần được khôi phục.

12. Khung theo điểm 11, trong đó khung được sử dụng trong việc thay thế hoặc tái tạo xương hoặc phần xương.

13. Khung theo điểm 12, trong đó xương hoặc phần xương là xương hoặc phần xương chịu tải cơ học, tốt nhất là xương dài của chân và cánh tay, hoặc xương hoặc phần xương là phần xương sọ, xương cột sống hoặc phần xương hàm-mặt.

14. Khung theo điểm 13, trong đó xương dài của chân và cánh tay là xương chày, xương bàn chân, xương ống chân, xương đùi, xương cánh tay hoặc xương quay.

15. Bộ phận thay thế xương bao gồm khung theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.

16. Quy trình sản xuất khung theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó quy trình này bao gồm các bước sau:

(1) nhiệt phân: gỗ tự nhiên, tốt nhất là được lựa chọn trong số các loại: mây, thông, abachi, balsa, sipo, sồi, cẩm lai, kempas và óc chó, tốt hơn là gỗ mây, được nung nóng ở nhiệt độ trong khoảng 600-1000°C trong một môi trường trơ để tạo ra mẫu cacbon;

(2) cacbua hóa: mẫu cacbon được thấm canxi ở trạng thái hơi ở nhiệt độ trong khoảng 900-1200°C và áp suất $< 100000 \text{ Pa}$ ($< 1000 \text{ mbar}$), tốt nhất là $< 60000 \text{ Pa}$ ($< 600 \text{ mbar}$), tốt hơn nữa là từ 5 đến 10000 Pa (0,05 đến 100 mbar), để tạo ra mẫu canxi cacbua;

(3) oxy hoá: mẫu canxi cacbua (CaC_2) được nung nóng trong không khí ở nhiệt độ trong khoảng 750-1300°C, tốt hơn là 1000-1200°C, để tạo ra mẫu canxi oxit;

(4) hydrat hóa: mẫu canxi oxit được tiếp xúc với nước, tốt nhất là với hơi nước, do vậy cho phép hấp thụ nước với lượng chiếm từ 1-25 mol%, tốt nhất là chiếm từ 5-15mol%;

(5) cacbonat hóa: mẫu canxi oxit được chuyển dạng thành canxi cacbonat bằng cách nung ở nhiệt độ trong khoảng 500-900°C, tốt hơn là ở nhiệt độ trong khoảng 750-850°C dưới áp suất 4-20 MPa;

(6) phosphat hóa: mẫu canxi cacbonat được xử lý với ít nhất một muối phosphat, tốt nhất là được chọn từ nhóm gồm amoni phosphat, natri phosphat, kali phosphat và các hỗn hợp của chúng, để tạo ra khung hydroxyapatit sinh học.

17. Quy trình sản xuất bộ phận thay thế xương theo điểm 15, trong đó quy trình này bao gồm các bước sau:

(1) nhiệt phân: gỗ tự nhiên, tốt nhất là được lựa chọn trong số các loại: mây, thông, abachi, balsa, sipo, sồi, cẩm lai, kempas và óc chó, tốt hơn là gỗ mây, được nung nóng ở nhiệt độ trong khoảng 600-1000°C trong một môi trường trơ để tạo ra mẫu cacbon;

(2) cacbua hóa: mẫu cacbon được thấm canxi ở trạng thái hơi ở nhiệt độ trong khoảng 900-1200°C và áp suất < 100000 Pa (< 1000 mbar), tốt nhất là < 60000 Pa (< 600 mbar), tốt hơn nữa là từ 5 đến 10000 Pa (0,05 đến 100 mbar), để tạo ra mẫu canxi cacbua;

(3) oxy hoá: mẫu canxi cacbua (CaC_2) được nung nóng trong không khí ở nhiệt độ trong khoảng 750-1300°C, tốt hơn là 1000-1200°C, để tạo ra mẫu canxi oxit;

(4) hydrat hóa: mẫu canxi oxit được tiếp xúc với nước, tốt nhất là với hơi nước, do vậy cho phép hấp thụ nước với lượng chiếm từ 1-25 mol%, tốt nhất là chiếm từ 5-15 mol%;

(5) cacbonat hóa: mẫu canxi oxit được chuyển dạng thành canxi cacbonat bằng cách nung ở nhiệt độ trong khoảng 500-900°C, tốt hơn là ở nhiệt độ trong khoảng 750-850°C dưới áp suất 4-20 MPa;

(6) phosphat hóa: mẫu canxi cacbonat được xử lý với ít nhất một muối phosphat, tốt nhất là được chọn từ nhóm gồm amoni phosphat, natri phosphat, kali phosphat và các hỗn hợp của chúng, để tạo ra khung hydroxyapatit sinh học;

(7) trước bước (1) hoặc sau bước (6), cắt mảnh gỗ tự nhiên bất kỳ hoặc khung hydroxyapatit sinh học thành miếng có hình dạng tương ứng với hình dạng khiếm khuyết của xương cần phải được khôi phục.

18. Quy trình theo điểm 16 hoặc 17, trong đó sau bước (1), gỗ tự nhiên có độ xốp tổng số ít nhất là 20%, tốt hơn là không dưới 40%, tốt nhất là trong khoảng 60-95%.

19. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 18, trong đó trước bước nhiệt phân (1), quy trình bao gồm bước (i) để lựa chọn và chuẩn bị gỗ tự nhiên, trong đó gỗ tự nhiên được cắt thành mảnh có chiều dài được đo dọc theo hướng của gỗ có kích thước tối đa, lớn hơn hoặc bằng 2 cm, trong đó tốt nhất là bước (i) còn bao gồm thêm các bước: chế tạo mô hình ba chiều của khiếm khuyết xương và, dựa trên mô hình ba chiều thu được, tạo hình cho gỗ tự nhiên có hình dạng tương ứng với hình dạng khiếm khuyết của xương.

20. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 19, trong đó bước cacbua hóa (2) được thực hiện với tỉ lệ mol Ca/C (lúc bắt đầu phản ứng) trong khoảng 1,10-2,50, tốt nhất là trong khoảng 1,50-2,00.

21. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 20, trong đó bước cacbonat hóa (5) được thực hiện theo một trong các chu trình nhiệt sau đây:

- tại hằng số áp suất CO_2 là 10 MPa, từ từ tăng giá trị nhiệt độ lên mức từ 750-850°C, tốt nhất là 800°C;

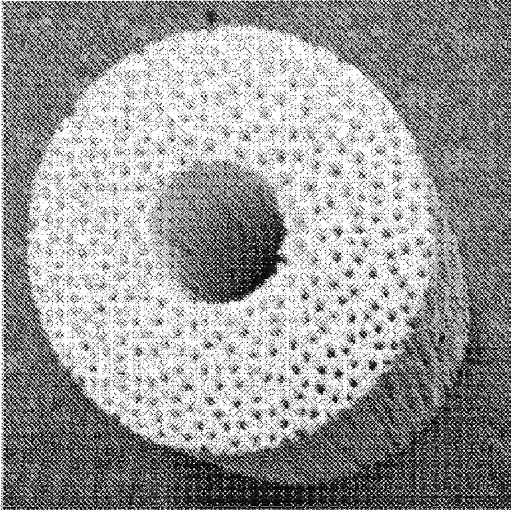
- ở nhiệt độ không đổi từ 750-850°C, tốt nhất là ở 800°C tiến hành tăng áp suất lên đến 10 MPa;

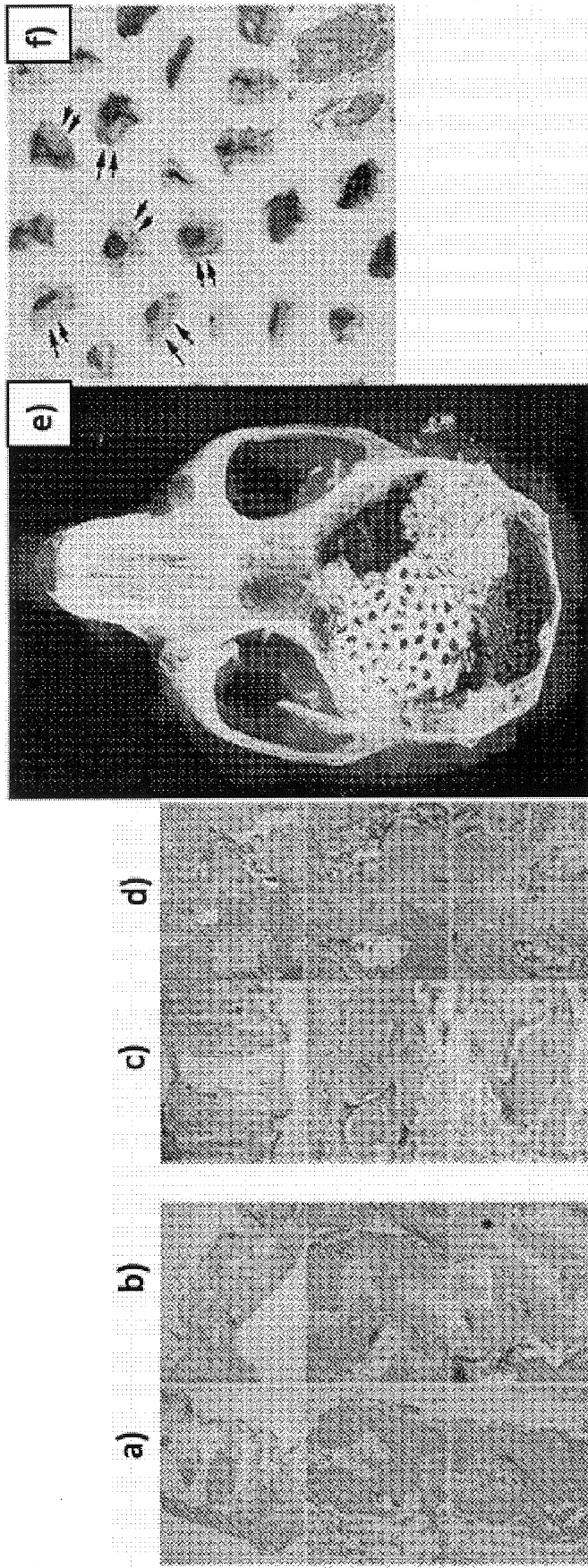
- duy trì áp suất ở mức 4-6 MPa trong khi nâng nhiệt độ lên đến mức từ 750-850°C, tốt nhất là lên đến 800°C và sau đó tăng áp suất lên đến 10 MPa.

22. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 21, trong đó ở bước phosphat hóa (6), mẫu canxi cacbonat được ngâm trong dung dịch chứa ít nhất một muối phosphat trong nước, dung dịch này có nồng độ phosphat 0,1-5 M, tốt nhất là nồng độ 0,5-2,0 M.

23. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 22, trong đó tỷ lệ ban đầu của PO_4/CO_3 trong bước phosphat hóa (6) gấp 1,5-5 lần giá trị hệ số tỷ lệ theo lý thuyết, tốt nhất là gấp 2-4 lần giá trị hệ số tỷ lệ theo lý thuyết.

24. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 23, trong đó bước phosphat hóa (6) được thực hiện với sự có mặt của ion magie, stronti, silic, titan, cacbonat, natri, kali, bạc, gali, đồng, sắt, kẽm, mangan, europi, gadolini hoặc các hỗn hợp của chúng.

**Fig.1**

**Fig.2**

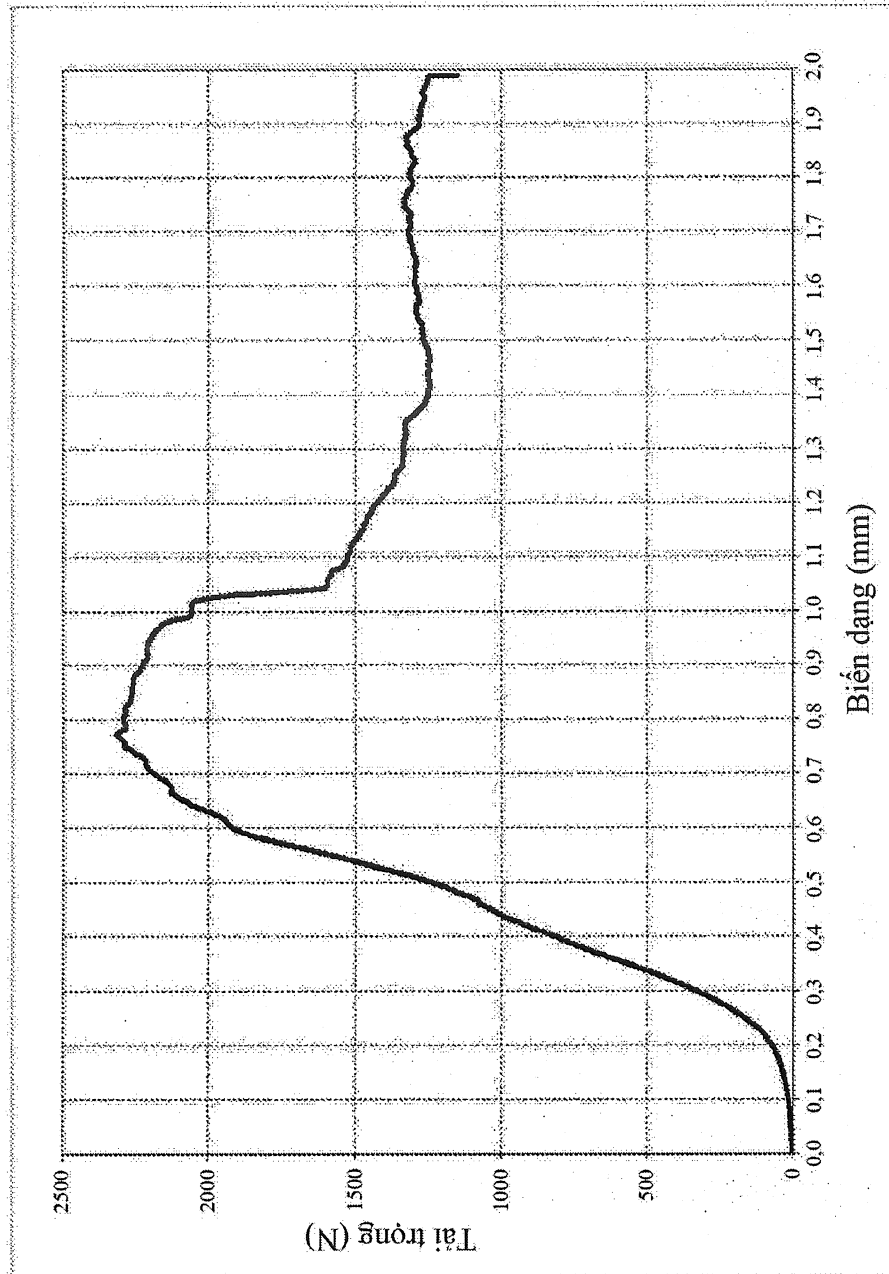


Fig.3

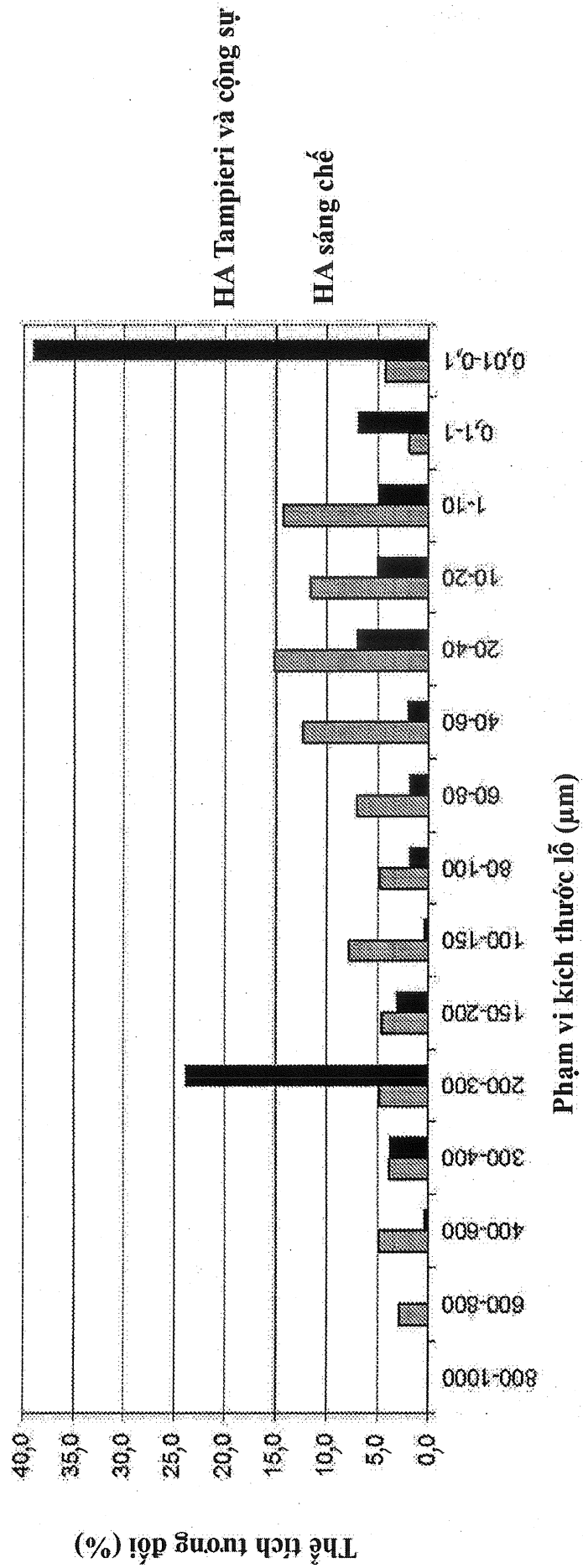


Fig.4

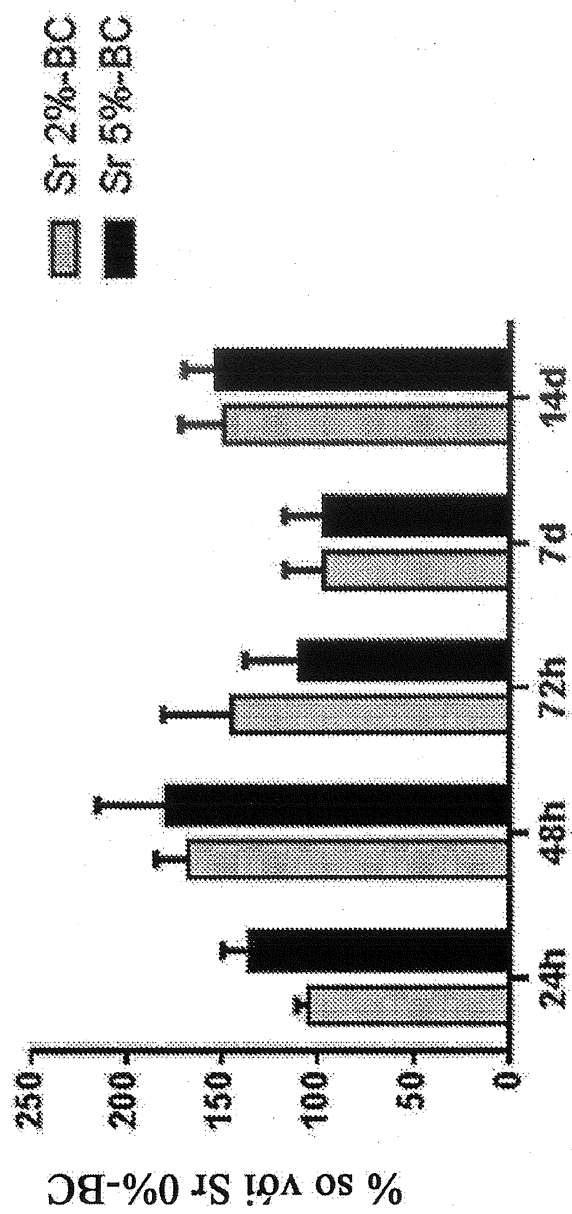


Fig.5

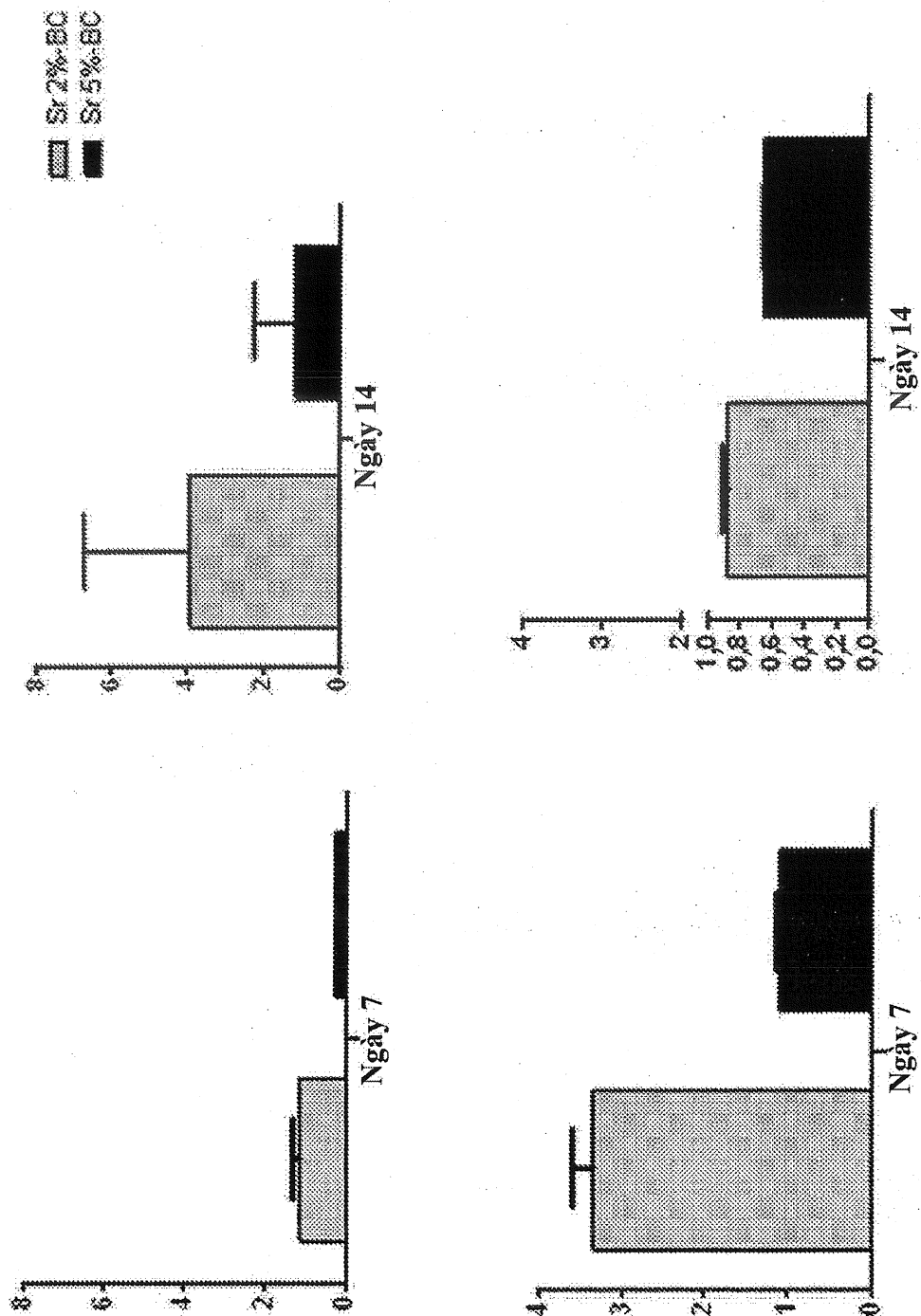


Fig.6

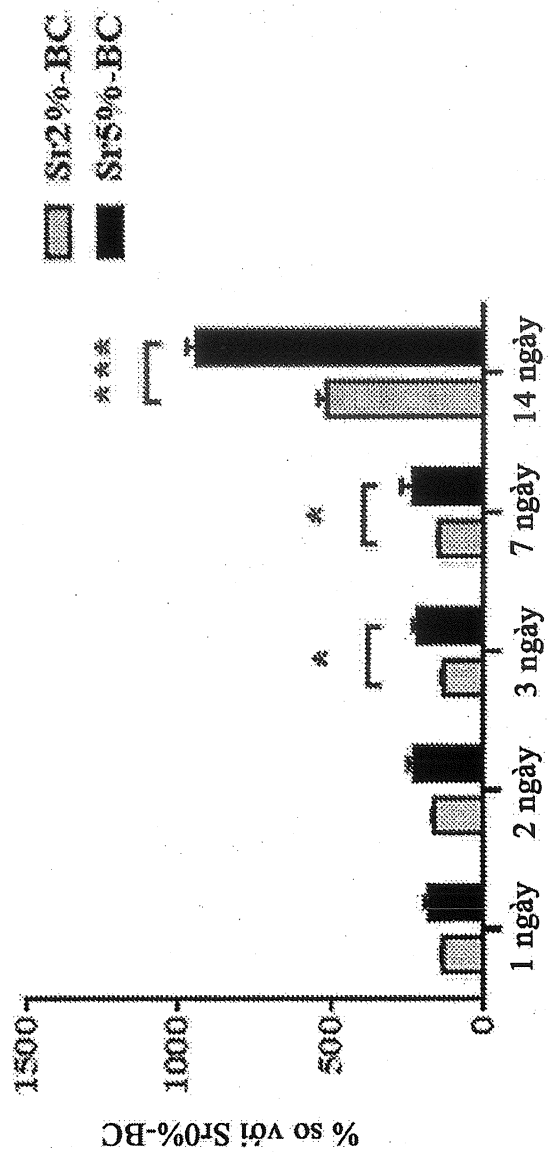


Fig.7

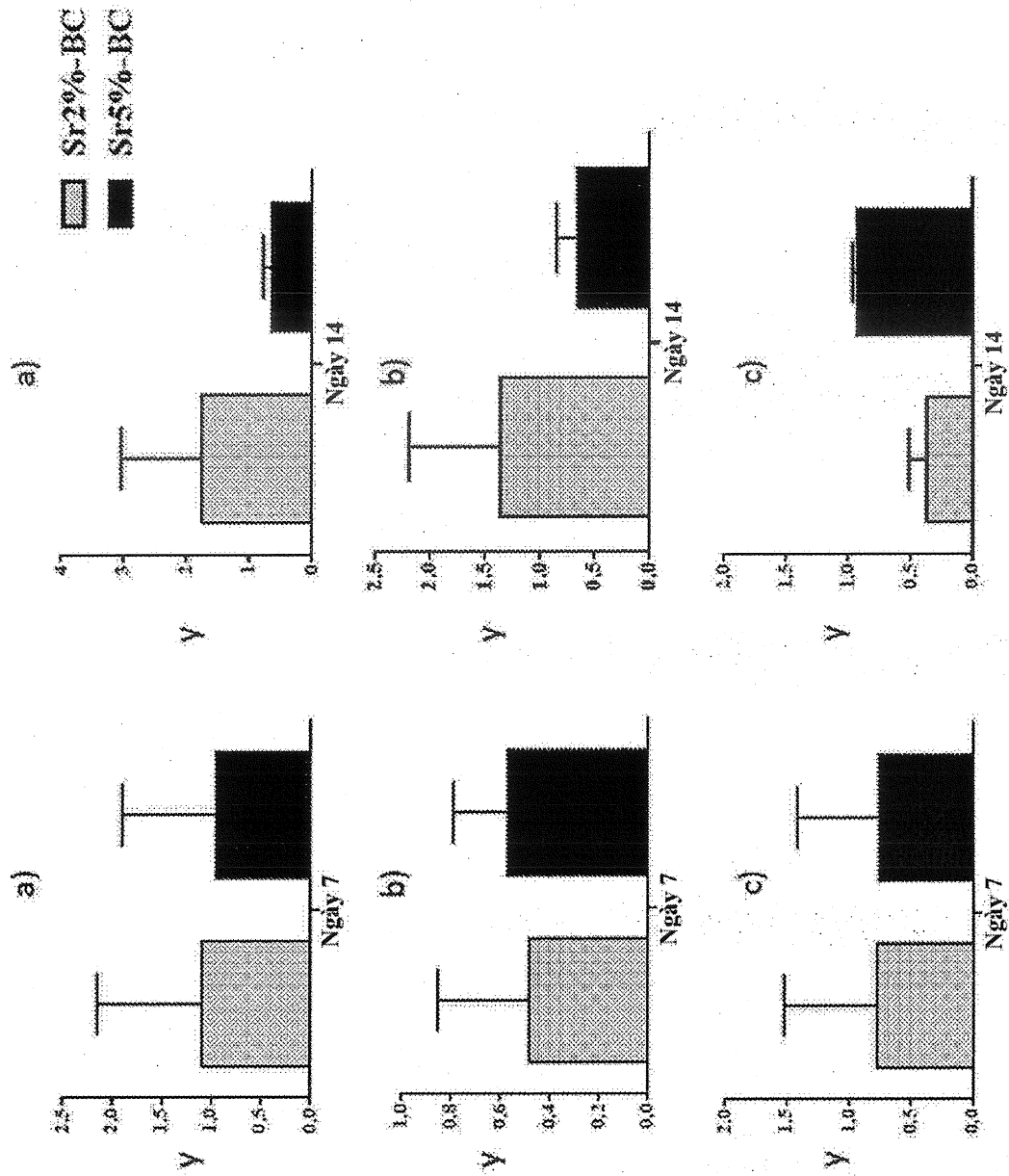


Fig.8

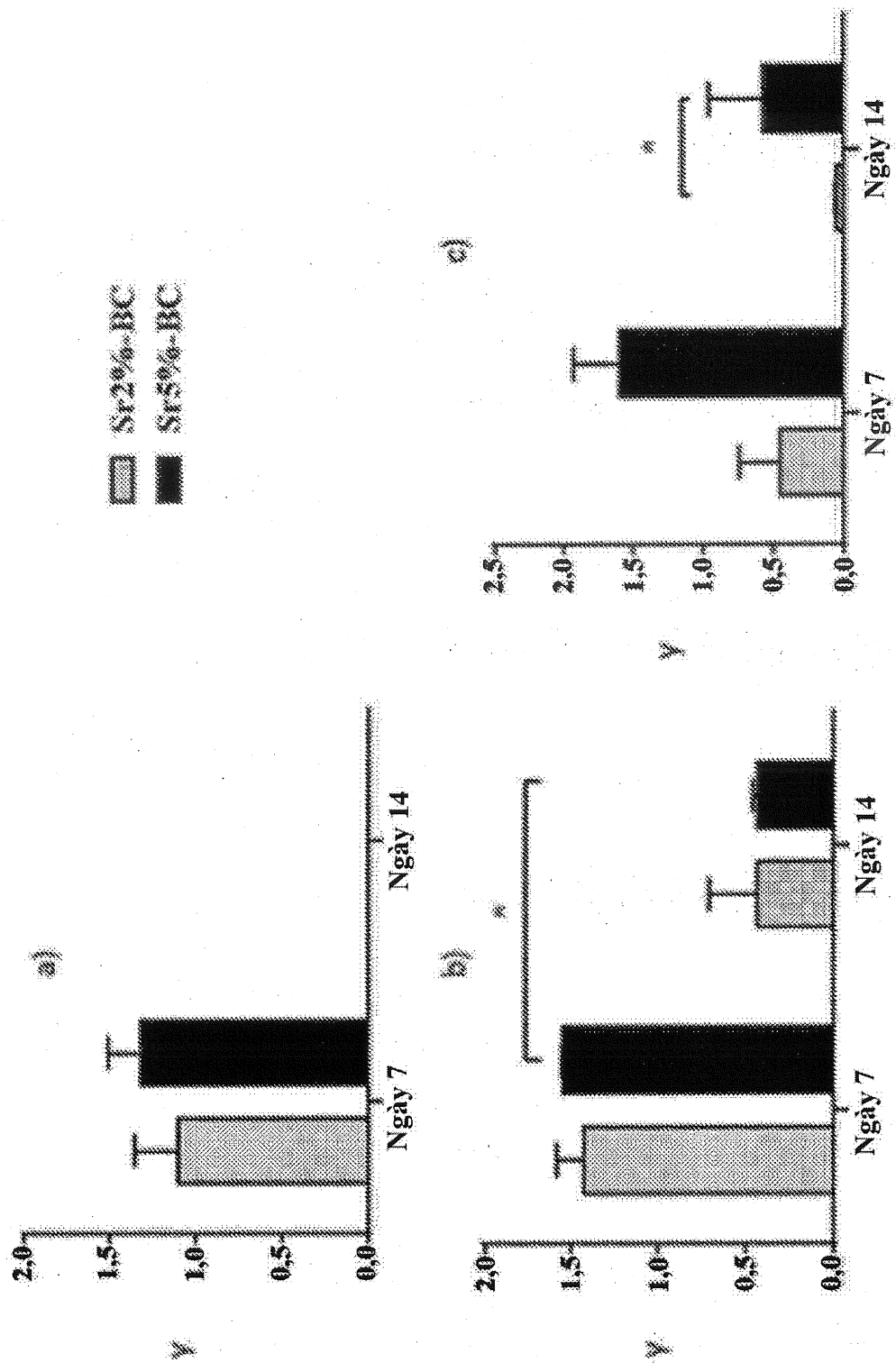


Fig.9

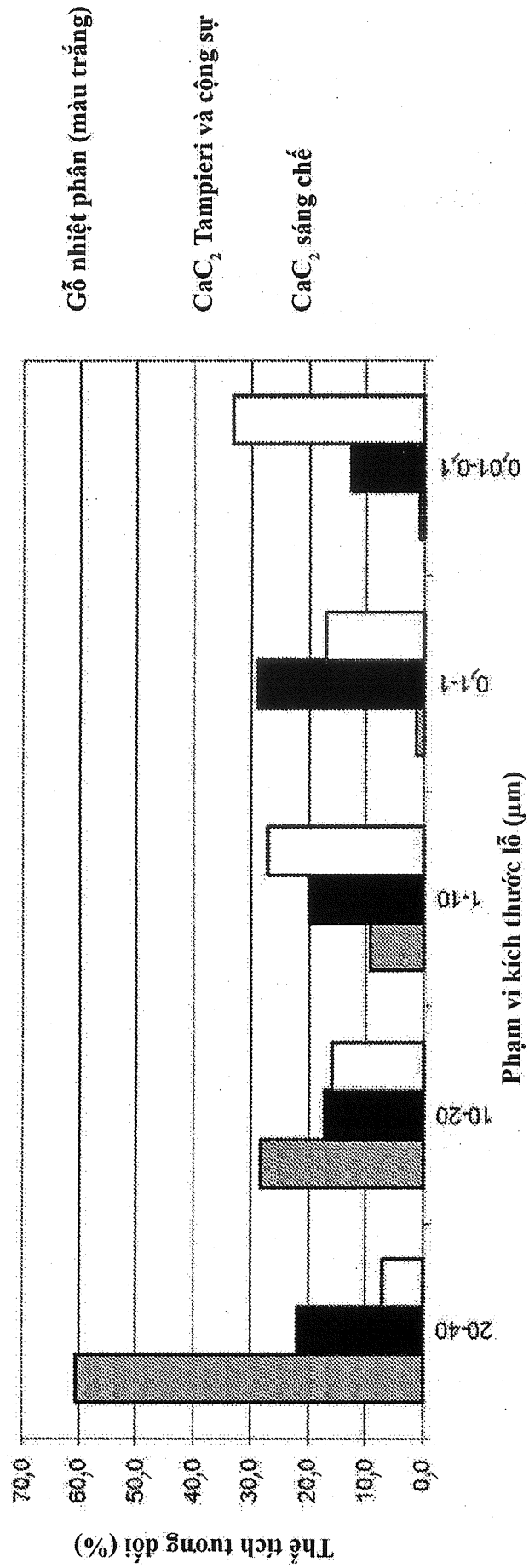


Fig.10

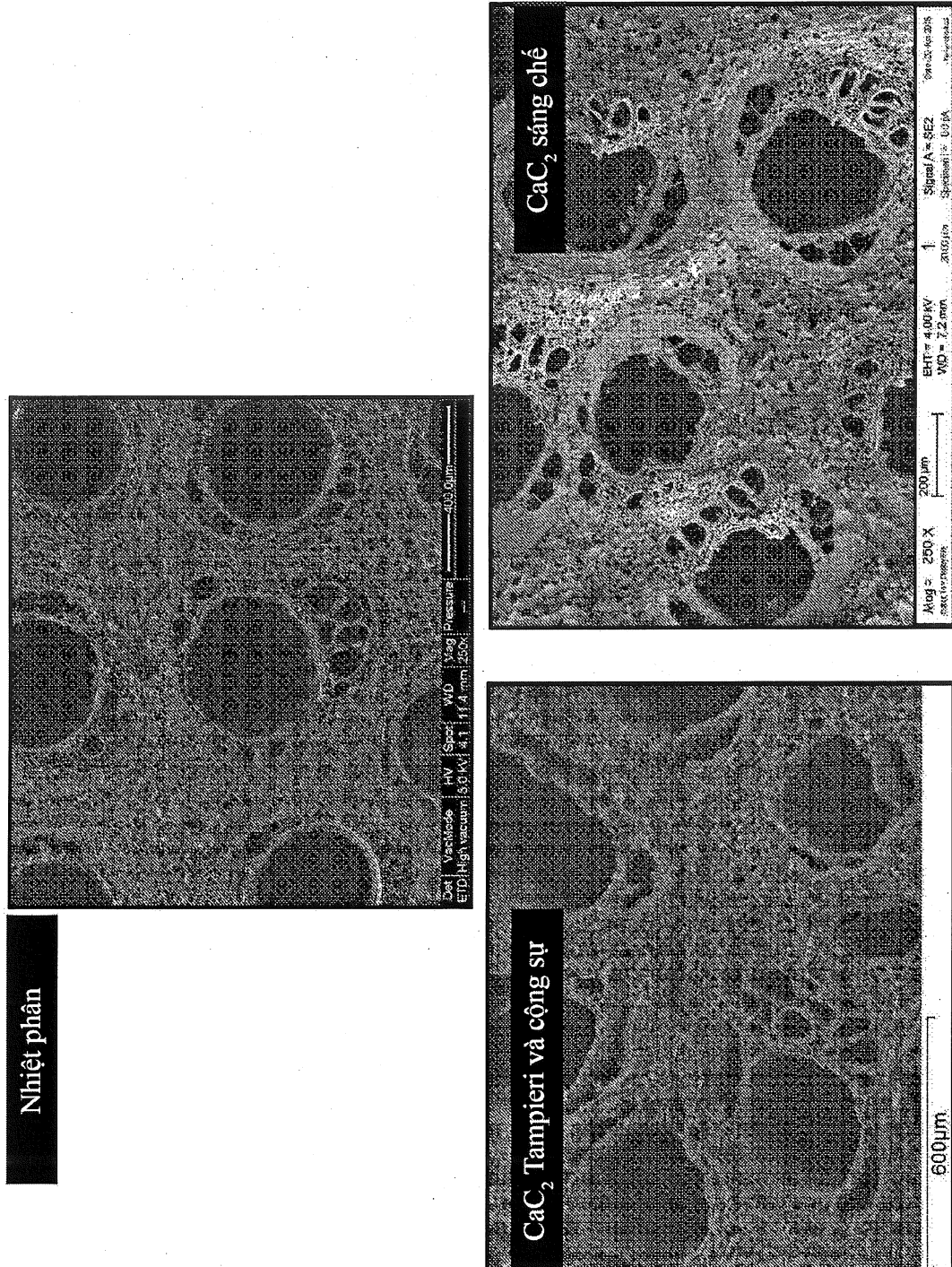


Fig.11

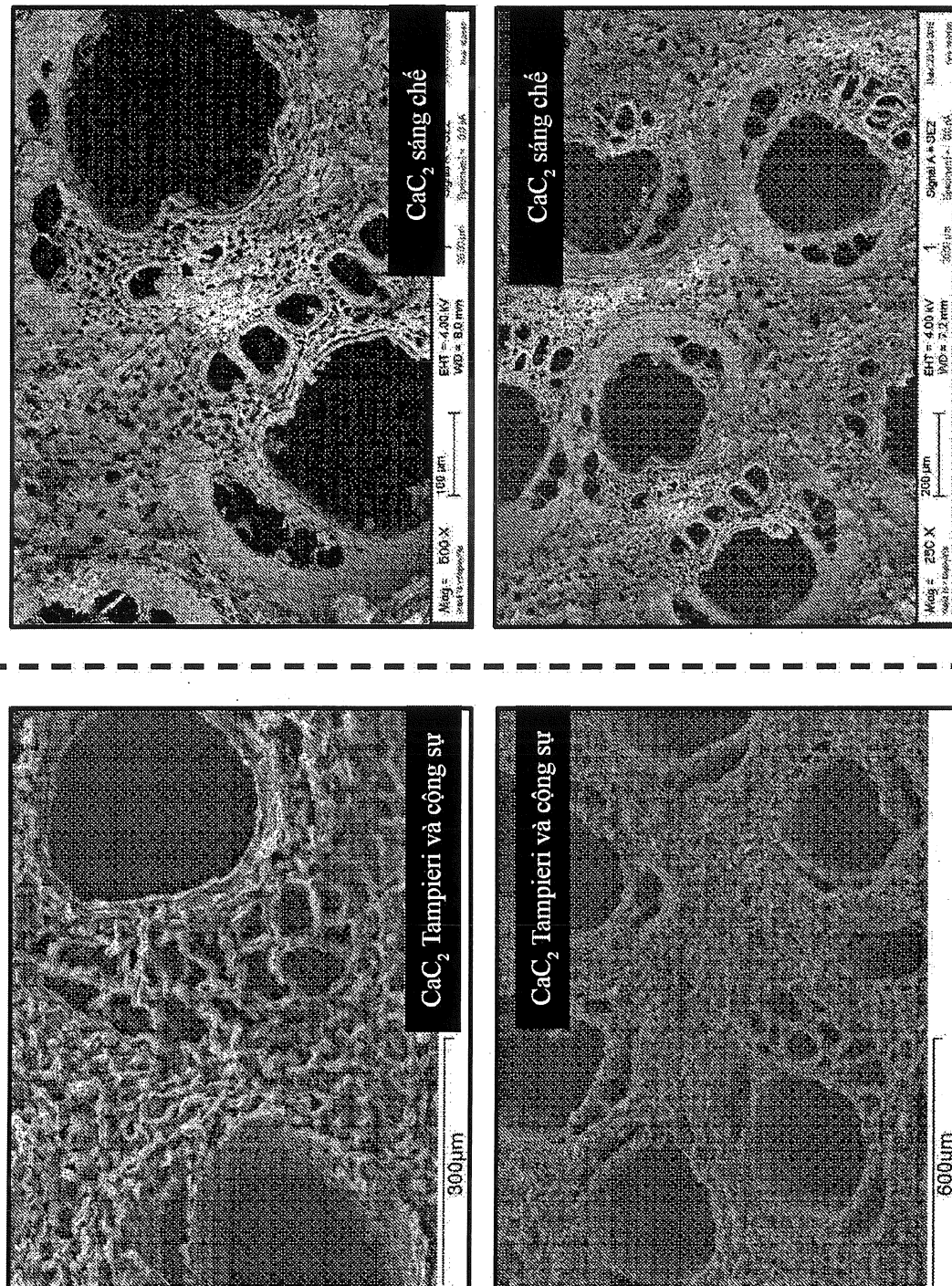


Fig.12

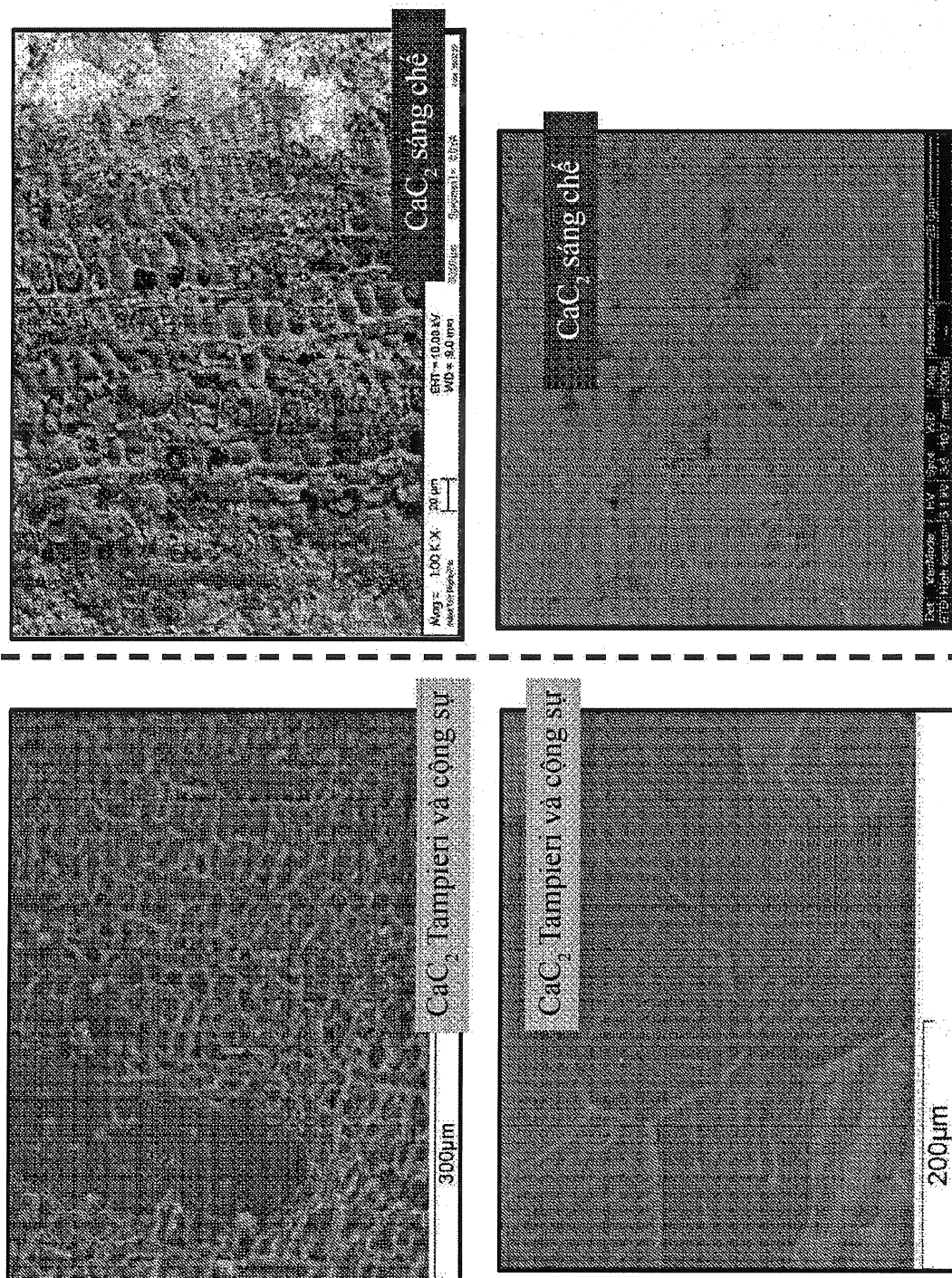


Fig.13

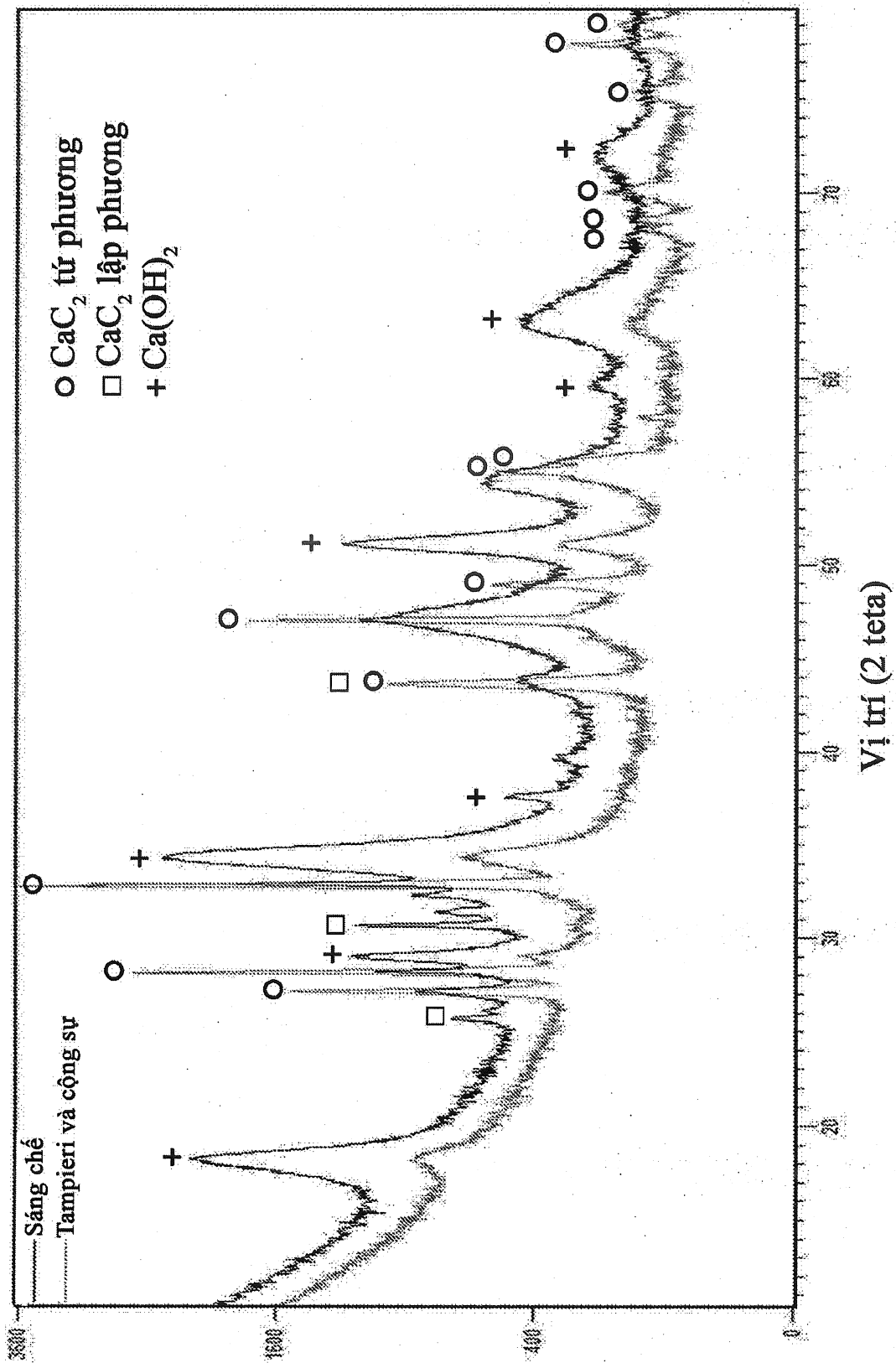


Fig.14

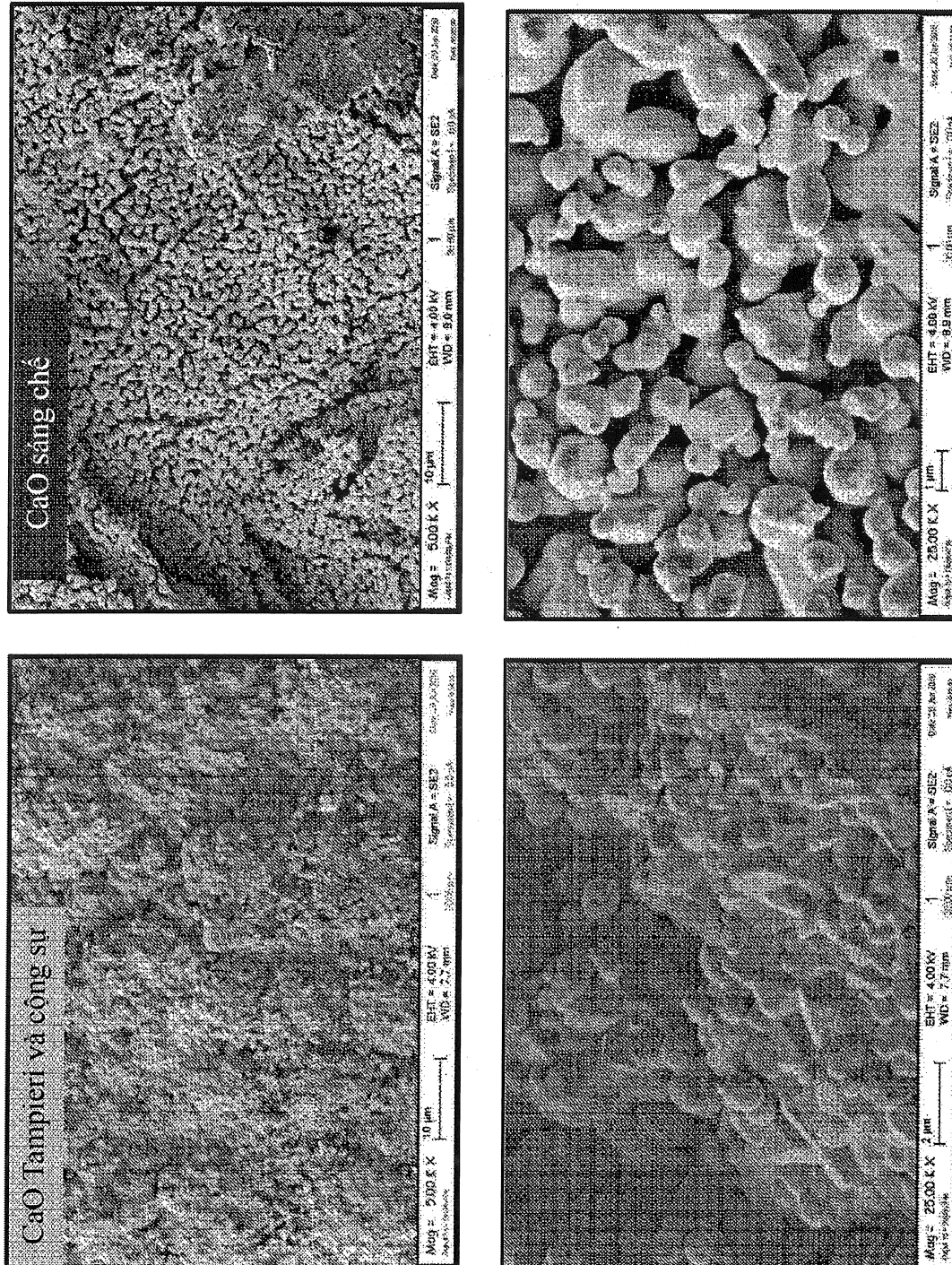


Fig.15

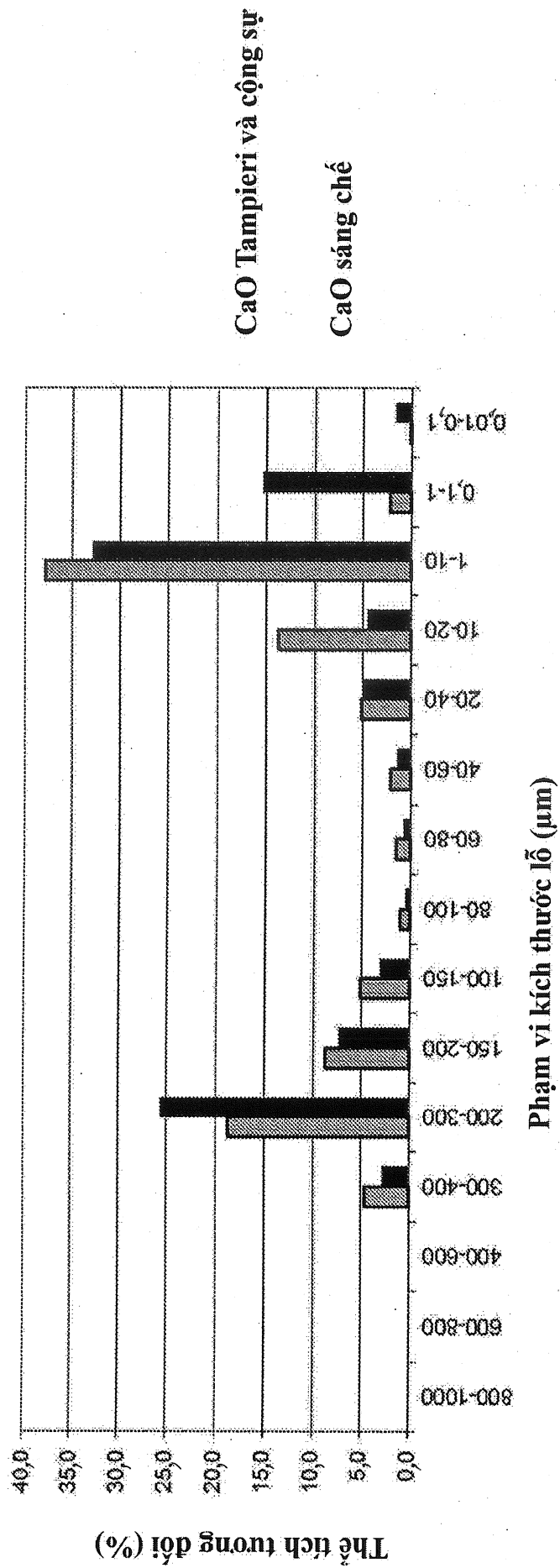


Fig.16

$\text{CaO} + \text{CO}_2 = \text{CaCO}_3$

CaCO_3 Tempieri và cộng sự

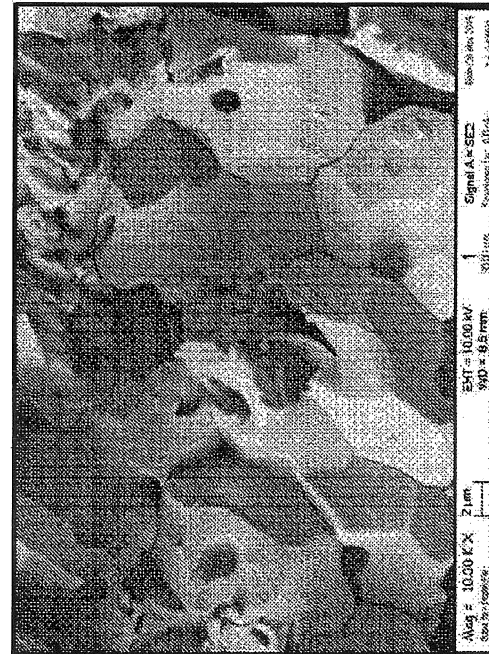
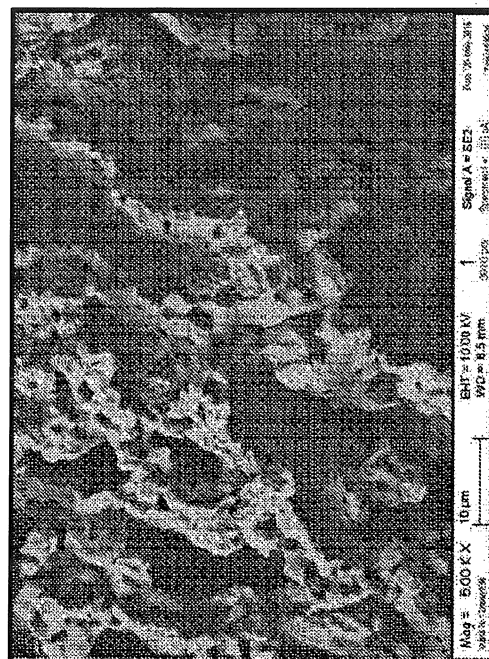
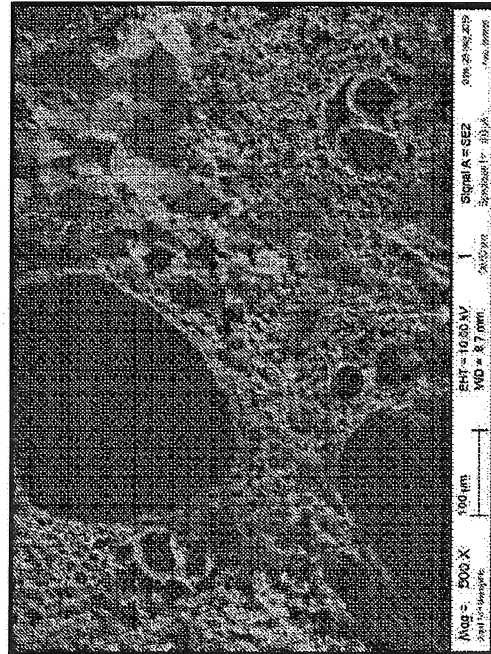
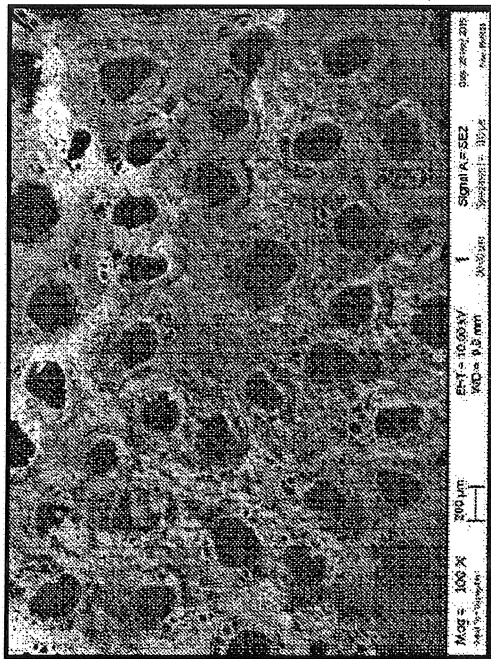


Fig.17

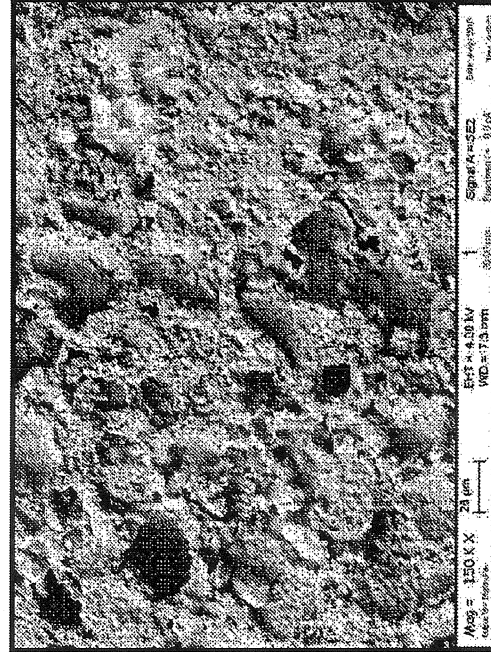
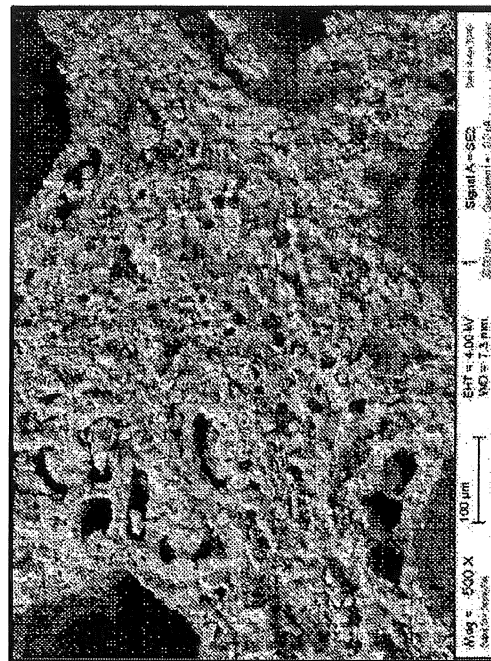
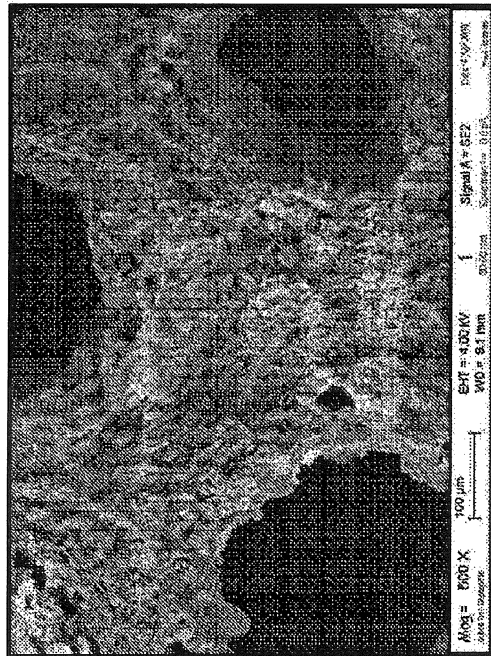
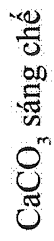
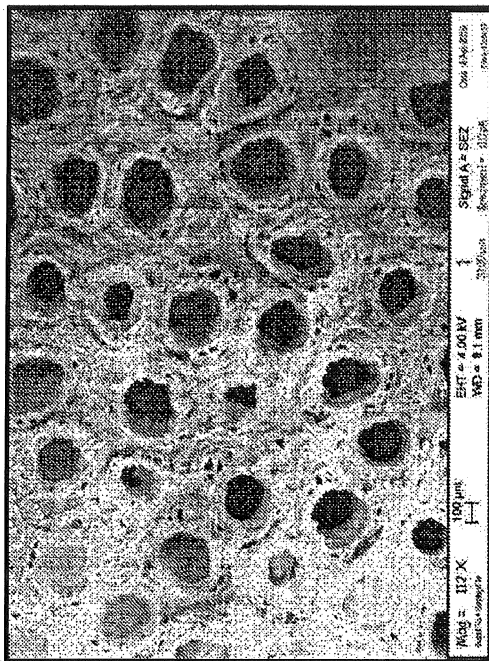
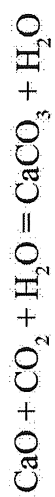
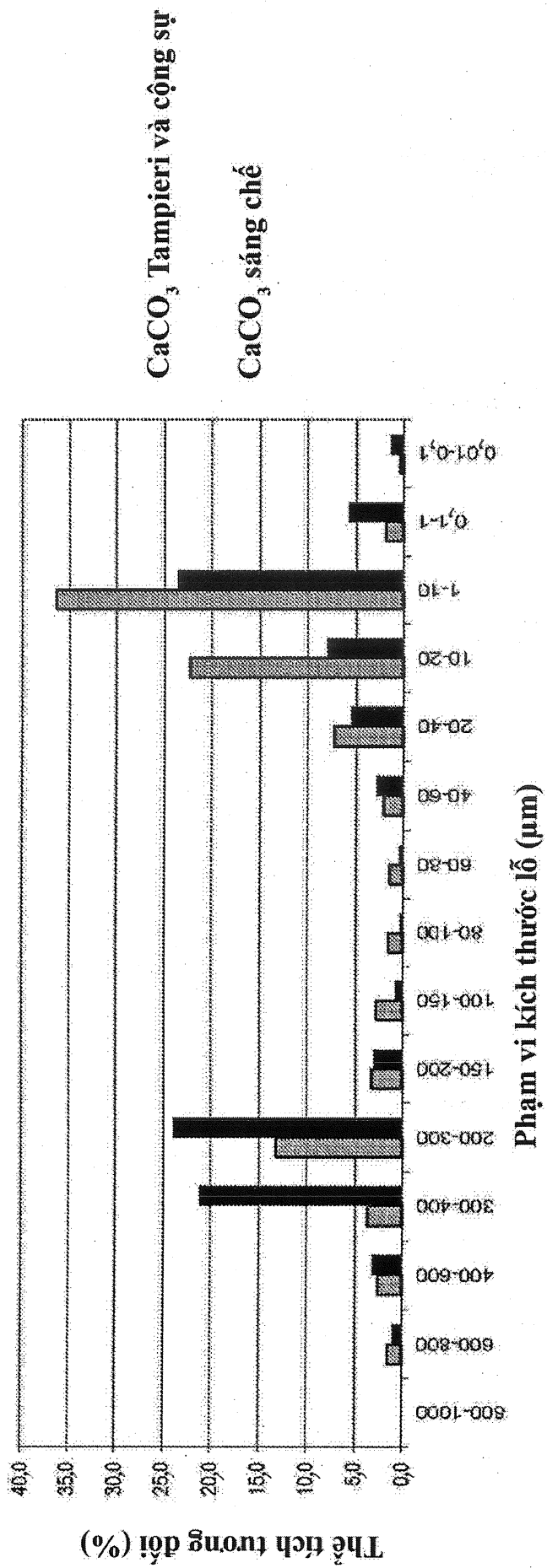


Fig.18

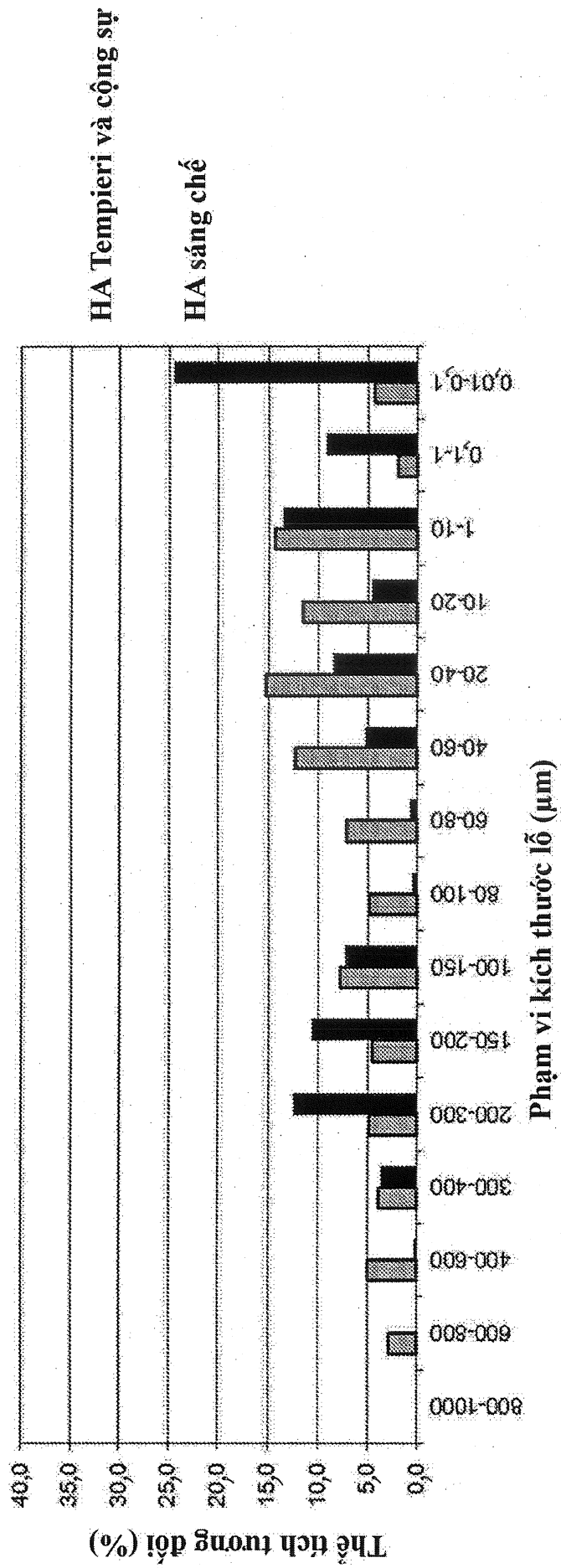


Diện tích bề mặt - SSA (m²/g)

Tampieri và cộng sự = 3,57

Sáng chế = 5,52

Fig.19



Diện tích bề mặt - SSA (m^2/g)

Tampieri và cộng sự = 6,28

Sáng chế = 9,60

Fig.20

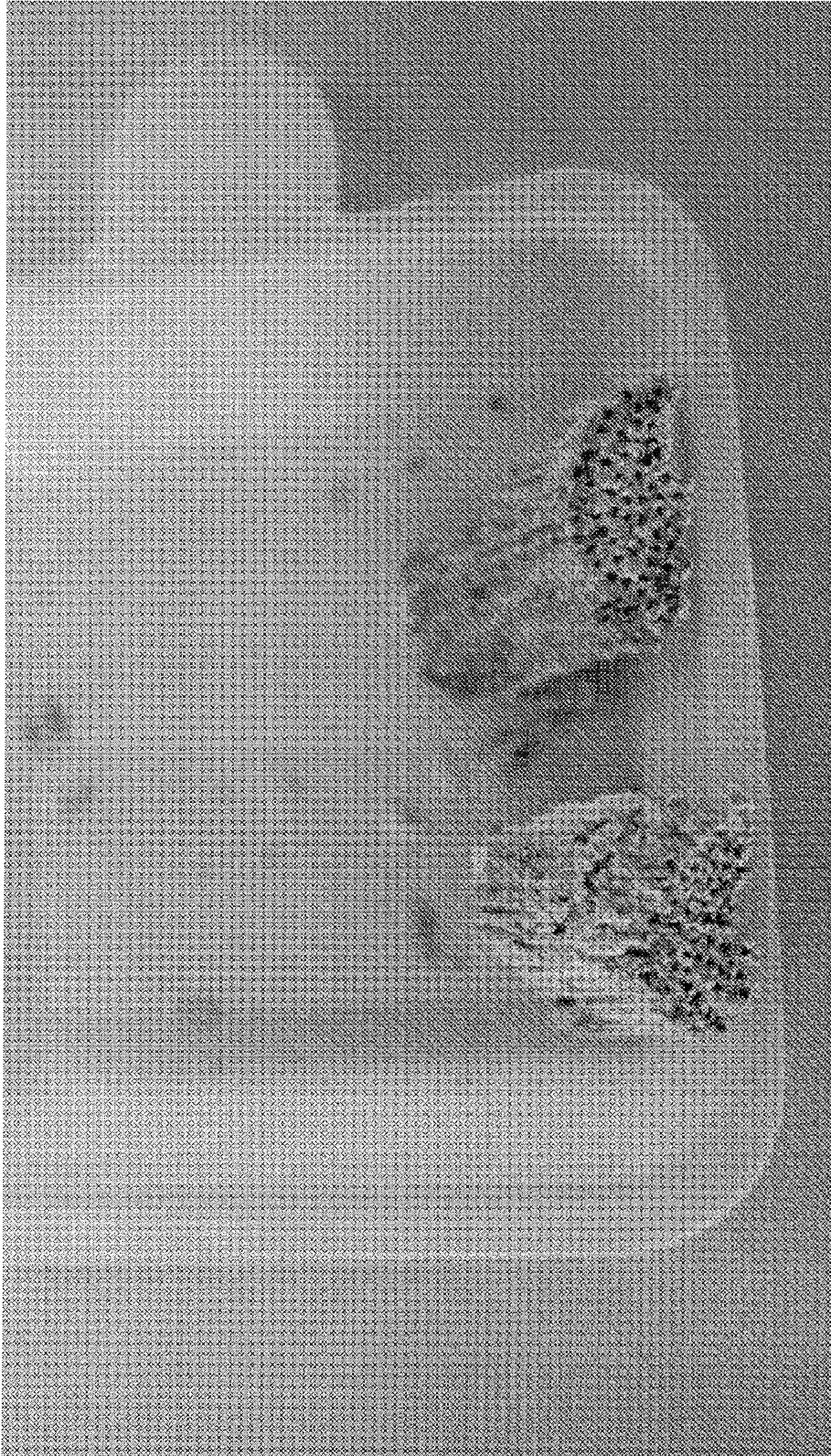
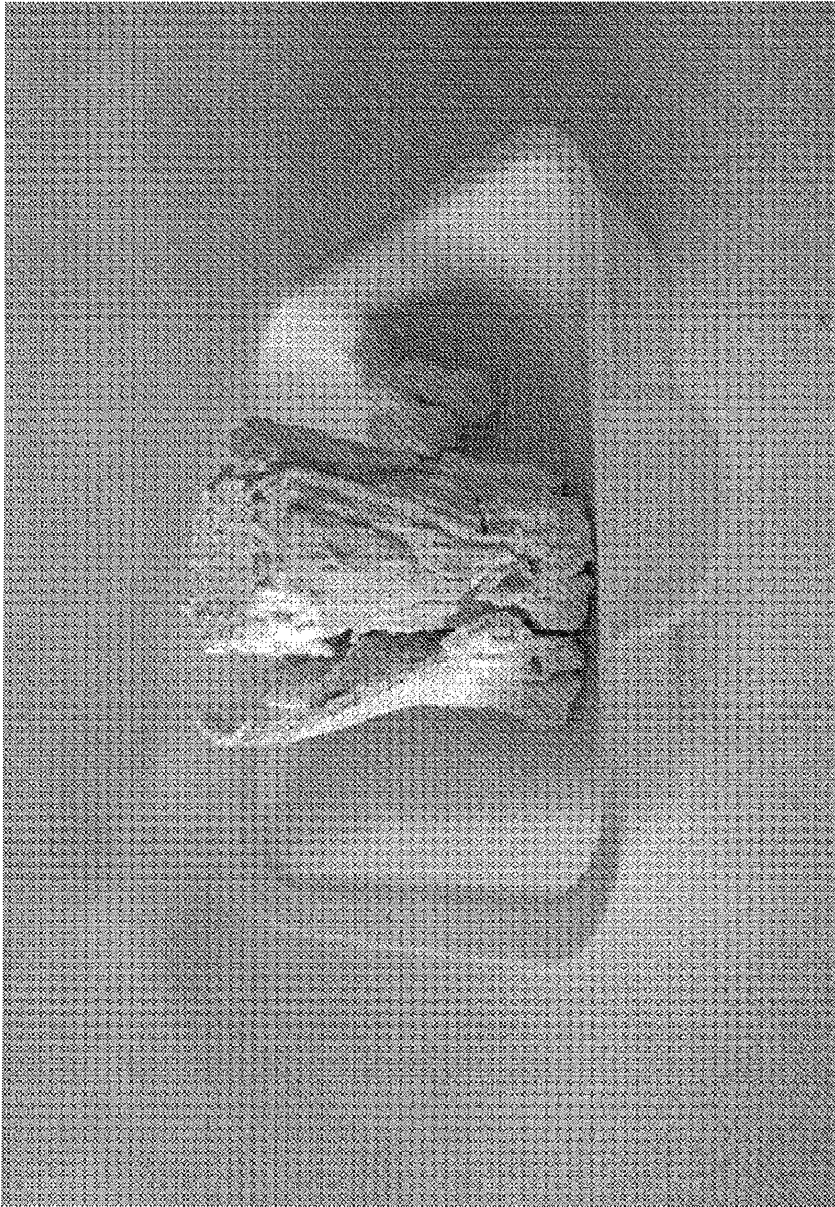


Fig.21

**Fig.22**

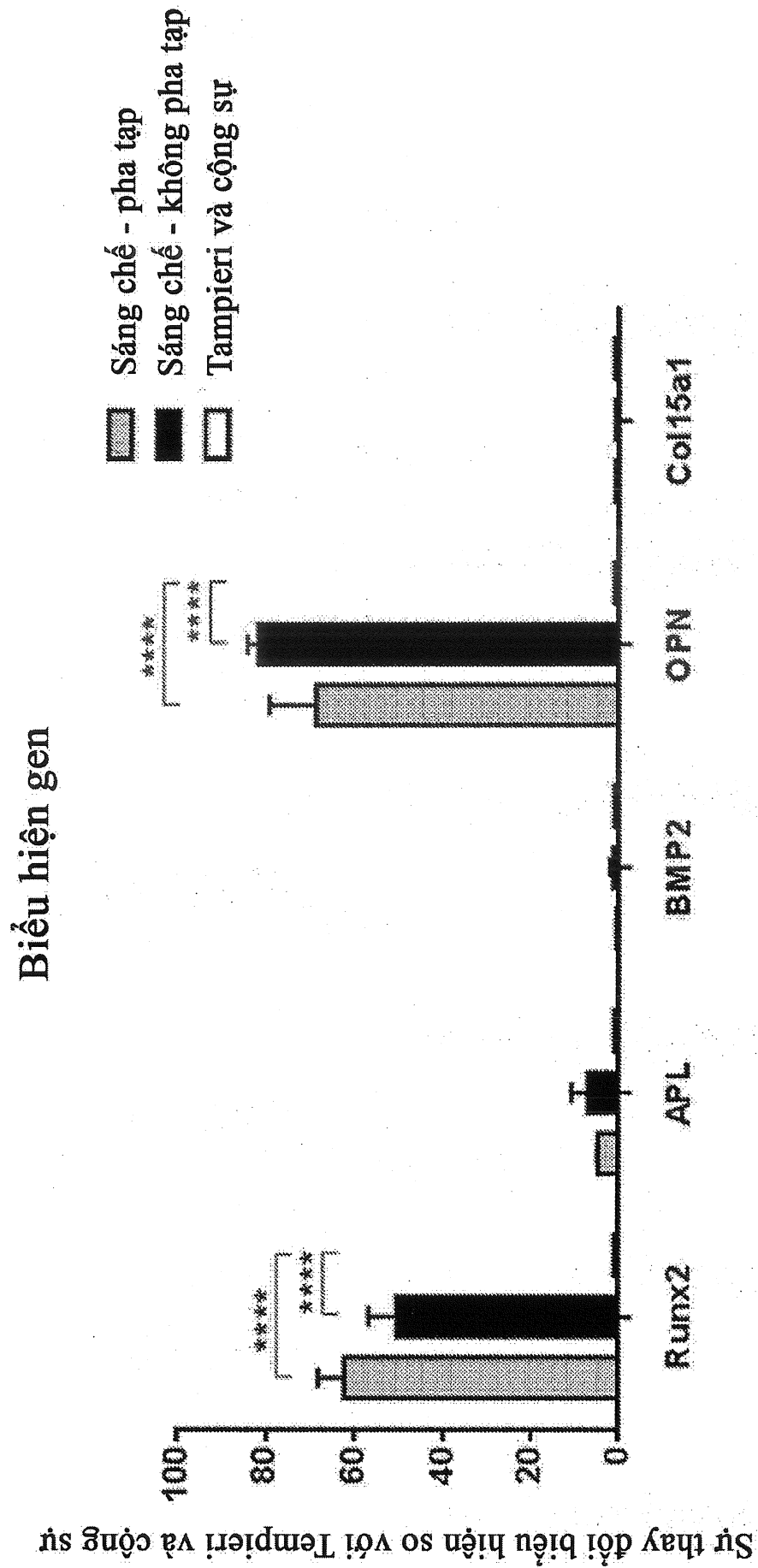


Fig.23

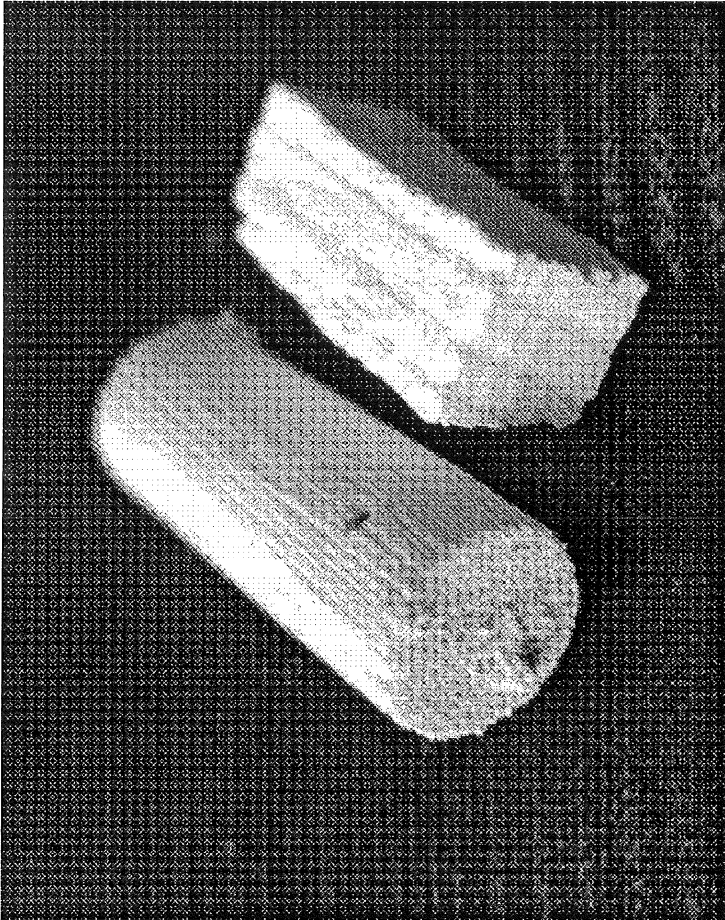


Fig.24

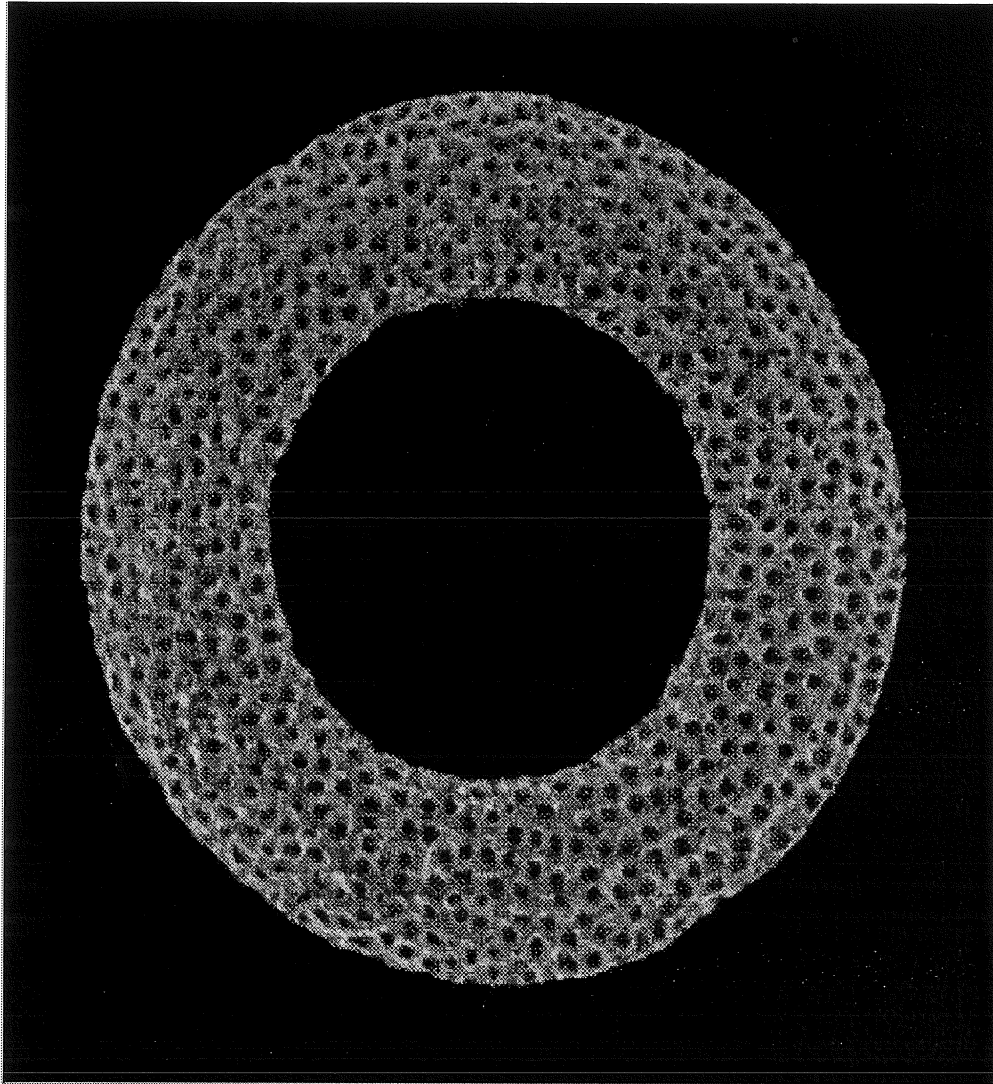


Fig.25

