



(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)



1-0038836

(51)⁷ A61F 2/28; A61L 27/56; D01D 5/00; (13) B
C03C 4/00; C08L 101/16; A61L 27/40;
B29C 64/106

(21) 1-2019-07322

(22) 24/12/2019

(30) 10-2019-0090063 25/07/2019 KR; 10-2019-0151855 25/11/2019 KR

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/02/2021 395

(73) 1. CG Bio Co., Ltd. (KR)

244, Galmachi-ro, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13211, Republic of Korea

2. BioAlpha Inc. (KR)

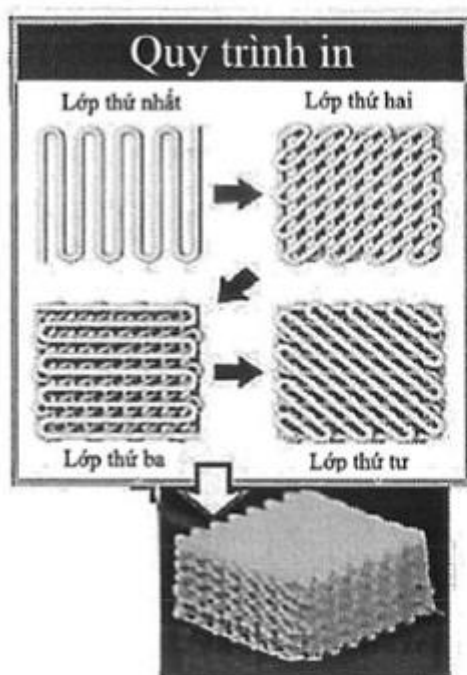
12, Bongeunsa-ro 114-gil, Gangnam-gu, Seoul, 06170, Republic of Korea

(72) LIM, Jun Young (KR); KIM, Yong Bok (KR); RYU, Hyun Seung (KR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) BỘ KHUNG DÙNG ĐỂ CẮY GHÉP TỪ ĐỐI TƯỢNG CHO SỐNG

(57) Sáng chế đề cập đến bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống, bao gồm kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học và có các đặc tính được cải thiện bằng cách sử dụng máy in 3D thông qua quy trình mô hình hóa bằng phương pháp nóng chảy lắng đọng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống (scaffold for living donor transplantation).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Máy in 3D là thiết bị để chế tạo sản phẩm định hình ba chiều giống như sản phẩm thực tế bằng cách làm nóng chảy vật liệu như polyme, kim loại, v.v. hoặc xếp chồng bột dựa trên bản vẽ 3D.

Máy in 3D có ưu điểm là giúp dễ dàng định hình và chế tạo sản phẩm có cấu trúc phức tạp theo thiết kế đã được dự định, và do đó việc áp dụng các phiên bản đầu tiên đang dần mở rộng và thị trường được dự kiến sẽ mở rộng hơn nữa.

Công nghệ in 3D trong lĩnh vực y tế và công nghệ sinh học được áp dụng cho in 3D sinh học, để sản xuất các cơ quan nhân tạo như gan, thận, tim, v.v. từ mực sinh học, kỹ thuật mô để tái tạo mô hoặc cơ quan nhân tạo và y học cá thể hóa.

Công nghệ in 3D về cơ bản được phân chia thành tổng 7 loại tùy thuộc vào mô hình kỹ thuật số 3D: quang trùng hợp (photopolymerization - PP), ép đùn vật liệu (material extrusion - ME), phun chất kết dính (binder jetting - BJ), phun vật liệu (material jetting - MJ), lắng đọng năng lượng trực tiếp (direct energy deposition - DED), thiêu kết và hợp nhất tầng bột (powder bed fusion - PBF) và cán màng (sheet lamination - SL).

Đặc biệt, quy trình nóng chảy lắng đọng trực tiếp (fused direct deposition) (sau đây được gọi là “FDM”), là quy trình phun vật liệu, được sử dụng rộng rãi.

FDM là quy trình in 3D trong đó một loại nhựa dạng sợi mỏng có thể phun được được làm nóng chảy trong vòi phun, được ép đùn và xếp chồng lên nhau theo từng lớp. Ở đây, vòi phun làm nóng chảy sợi chất dẻo ở nhiệt độ cao, và sợi đã được ép đùn được khôi phục ở nhiệt

độ trong phòng để tạo thành thanh chống.

Máy in 3D dạng FDM là công nghệ trong đó nhiều loại vật liệu khác nhau có thể áp dụng và có thể có độ chính xác và độ lặp lại cao, nhờ đó sản phẩm đã được chế tạo chắc chắn và có độ bền cao và độ ổn định kích thước rất tốt.

Khả năng ứng dụng công nghệ in 3D dạng FDM vào các lĩnh vực y tế và công nghệ sinh học là rất cao, và đặc biệt tiến hành nghiên cứu sâu rộng về bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống.

Bằng sáng chế Hàn Quốc số 10-1912839 đề cập đến chế phẩm in 3D FDM ở dạng bột nhão, chứa bột gồm có thành phần chủ yếu là CaO và SiO_2 và chất kết dính, do đó có thể nhanh chóng chế tạo được các sản phẩm định hình mà không cần quy trình làm nóng chảy và hiệu được chính xác cấu trúc hình học, nhờ đó hữu ích dùng làm dạng thay thế sinh học để dùng trong y tế.

Tuy nhiên, bột gồm có nhược điểm ở chỗ nó có thể dễ bị vỡ hoặc nứt ngay cả do áp lực hoặc tác động bên ngoài bởi độ giòn vốn có của chúng. Hơn nữa, polyme tự nhiên, được sử dụng làm chất kết dính, có khả năng tương hợp sinh học vượt trội và không gây độc tế bào, nhưng có độ bền cơ học yếu và khó gia công.

Đối với ứng dụng cho bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống, các vấn đề về đặc tính cơ học và tính tương hợp sinh học phải được giải quyết trước tiên, ngoài công nghệ xử lý chính xác cấu trúc hình học của bộ khung.

Danh mục tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế

Bằng sáng chế Hàn Quốc số 10-1912839

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Theo đó, sáng chế đã dẫn đến việc phát triển chế phẩm mới có khả năng khắc phục được các vấn đề về độ giòn, trong đó khi chế phẩm này được áp dụng cho quy trình in 3D FDM để tạo ra bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống, cả độ bền và độ cứng có thể gia tăng và đặc tính bề mặt có thể được cải thiện, do đó đồng thời đạt được các vật liệu cơ học và hoạt tính sinh học cần thiết của bộ khung.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống.

Giải pháp kỹ thuật để giải quyết vấn đề

Sáng chế đề xuất bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống, được cấu trúc sao cho các thanh chống, về cơ bản được bố trí chồng lên nhau và giao nhau theo hướng thẳng đứng để tạo thành các lỗ trong đó, được xếp chồng lên nhau theo từng lớp.

Ở đây, các thanh chống có thể bao gồm kính sinh học và polyme tương hợp sinh học, và có thể có cấu trúc xếp chồng gồm hai hoặc nhiều lớp.

Các thanh chống có thể được cung cấp dưới dạng liên kết hoặc rời ra trong cùng một lớp và có thể được tạo thành song song theo dạng đều đặn bao gồm dạng thẳng, dạng lượn sóng, dạng mạng tinh thể, dạng hình chữ chi hoặc dạng hình xoắn ốc hoặc theo dạng không đều đặn.

Ngoài ra, các thanh chống này có thể có đường kính nằm trong khoảng từ 300 μm đến 500 μm .

Ngoài ra, các thanh chống có thể có góc định hướng trung bình nằm trong khoảng từ 30° đến 60° giữa các lớp.

Bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể có sự phân bố kích thước các lỗ và độ xốp nằm trong khoảng từ 30% đến 60% và có thể đáp ứng các đặc tính sau:

(1) độ bền: 50 kPa/mm³ đến 850 kPa/mm³

(2) độ cứng: 1,5 N/mm đến 20 N/mm

(3) độ nhám (R_a): 130nm đến 260nm

(4) góc tiếp xúc nước sau 180 giây: 75° hoặc nhỏ hơn

(5) mức hấp thụ tăng sinh protein sau 24 giờ: 0,25 đến 0,6 O.D.

(6) hiệu quả gieo tế bào: 37% hoặc cao hơn

(7) mức hấp thụ tăng sinh tế bào sau khi nuôi cấy trong 7 ngày: 0,22 O.D. hoặc hơn

(8) tỷ lệ diện tích F-actin: 22% hoặc cao hơn

Kính thủy tinh cấu thành các thanh chống có thể là kính sinh học đã được thiêu kết.

Hơn nữa, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể được chế tạo bằng cách trộn hỗn hợp sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học và sau đó thực hiện ép phun.

Ở đây, việc ép phun có thể được thực hiện bằng máy in 3D thông qua quy trình mô hình hóa bằng phương pháp nóng chảy lắng đọng.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống được cấu trúc để bao gồm kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học ở tỷ lệ hàm lượng tối ưu, do đó có thể có độ bền và độ cứng tối ưu, nhờ đó các vấn đề thông thường như nứt và các vấn đề tương tự do độ giòn vốn có của kính sinh học có thể được giải quyết.

Ngoài ra, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có đặc tính bề mặt và đặc tính ưa nước được cải thiện và do đó có thể có khả năng hấp thụ protein cao khi cấy ghép từ đối tượng cho sống, và hơn nữa, có tác dụng hoạt hóa tăng sinh tế bào và hình thành xương, và do đó tốt hơn là có thể ứng dụng làm bộ khung theo yêu cầu trong lĩnh vực y tế và công nghệ sinh học.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện một ví dụ về sự xếp chồng thanh chống theo sáng chế;

Fig. 2 là các đồ thị thể hiện các thay đổi về đặc tính của các thanh chống tùy thuộc vào các thông số gia công trong các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2;

Fig. 3 thể hiện bộ khung và thanh chống chế tạo được trong các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2;

Fig. 4 là các đồ thị thể hiện kết quả phân tích nhiệt lượng và nhiễu xạ tia X của các chế phẩm để dùng trong chế tạo bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2;

Fig. 5 là các đồ thị thể hiện kết quả kiểm tra độ bền và độ nén của các chế phẩm để sử dụng trong chế tạo bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2;

Fig. 6 thể hiện hình ảnh địa hình bề mặt 3D của các bộ khung được chế tạo trong các Ví dụ 1 đến 3 và Ví dụ so sánh 1;

Fig. 7 là hình ảnh thể hiện nhân tế bào đã được nhuộm màu xanh và F-Actin đỏ 3 ngày sau khi nuôi cấy tế bào; và

Fig. 8 thể hiện kết quả đánh giá toàn diện các bộ khung của Ví dụ so sánh 1 và Ví dụ 1 đến 3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình xếp chồng từng lớp (layer-by-layer - LBL) được thực hiện để thu được sản phẩm 3D bằng cách xếp chồng một lớp lên lớp khác. Sáng chế đề xuất bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống được chế tạo bằng quy trình xếp chồng LBL.

Cụ thể, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống theo sáng chế được cấu trúc sao cho các thanh chống, về cơ bản được bố trí chồng lên nhau và giao nhau theo hướng thẳng đứng để tạo thành các lỗ trong đó, được xếp chồng lên nhau theo từng lớp.

Hình dạng và kích thước bên ngoài của bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể được chọn để phù hợp với các ứng dụng riêng lẻ và có thể đáp ứng mục đích cần

thiết trong lĩnh vực ứng dụng. Bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể có hình dạng bên ngoài được chọn trong số các hình dạng mở rộng, ví dụ, hình trụ, hình cột đa giác như hình lăng trụ, hình tam giác hoặc hình thoi, hình phẳng, hình đa giác, ví dụ, hình chữ nhật, hình khối, hình vuông, hình kim tự tháp, hình ngũ giác, hình 12 cạnh, hình 20 cạnh, hình thoi, hình lăng trụ, hình cầu, ví dụ, hình quả bóng, hình rỗng lõm, hình thấu kính lồi hoặc hình thấu kính trụ và hình đĩa hoặc hình khuyên. Hình dạng này có thể thu được bằng cách xếp chồng các thanh chống.

Fig. 1 minh họa sự xếp chồng thanh chống theo phương án của sáng chế. Để thuận tiện, sáng chế đề xuất bộ khung hình chữ nhật song song dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống.

Các thanh chống cấu thành bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống được đề xuất với nhiều lớp, bao gồm ít nhất hai lớp, ba hoặc nhiều lớp, bốn hoặc nhiều lớp và n hoặc nhiều lớp, và số lớp của chúng có thể thay đổi tùy thuộc vào mục đích sử dụng cuối của bộ khung. Tốt hơn là, khi các thanh chống được xếp chồng thành bốn hoặc nhiều lớp để tạo thành bộ khung, có lợi là đảm bảo được các đặc tính cần thiết của bộ khung này.

Một lớp thanh chống duy nhất được cấu trúc sao cho một sợi về cơ bản là một chế phẩm duy nhất được mở rộng và cũng bao gồm một cấu trúc ở dạng ngắt liên kết, như dạng mạng tinh thể. Các thanh chống có thể được tạo ra để mở rộng thành nhiều hình dạng khác nhau trong cùng một lớp và có thể được tạo ra dưới dạng đều đặn như dạng thẳng, dạng lượn sóng, dạng mạng tinh thể, dạng hình chữ chi hoặc dạng hình xoắn ốc hoặc dưới dạng không đều đặn, để tăng diện tích tiếp xúc với các tế bào và chất lỏng. Tốt hơn là, việc tạo ra dạng đều đặn, như dạng mạng tinh thể, là có lợi để kiểm soát các đặc tính và độ xốp của bộ khung.

Ngoài ra, để đáp ứng các đặc tính cần thiết của bộ khung, các thanh chống có thể có đường kính nằm trong khoảng từ $300\mu\text{m}$ đến $500\mu\text{m}$, nằm trong khoảng từ $350\mu\text{m}$ đến $470\mu\text{m}$, hoặc nằm trong khoảng từ $380\mu\text{m}$ đến $450\mu\text{m}$. Tốt hơn là, đường kính của chúng nằm trong khoảng từ $390\mu\text{m}$ đến $425\mu\text{m}$. Nếu đường kính của chúng nhỏ hơn giới hạn dưới nêu trên, khó có thể đảm bảo được các đặc tính như độ bền do độ dày của chúng thấp. Mặt khác, nếu đường

kính của chúng vượt quá giới hạn trên, các lỗ có kích thước tương đối nhỏ và không thể đạt được độ xốp đủ để phát triển tế bào hoặc dòng chất lỏng.

Các thanh chống được xếp chồng thành hai hoặc nhiều lớp được cấu trúc sao cho các lớp liên kề được sắp xếp để xoay được theo góc định trước để tạo thành một góc định hướng giữa các lớp này. Như sẽ được giải thích sau, các thanh chống được tạo ra thông qua quá trình ép phun, trong đó việc phun có thể được thực hiện bằng cách sử dụng vòi phun gắn trên cơ chế truyền 3D, vị trí của nó được điều chỉnh theo ba hướng, cụ thể là hướng XYZ. Do đó, “hướng” được đề cập dưới đây có nghĩa là hướng phun.

Ví dụ, trong trường hợp cấu trúc trong đó các thanh chống được xếp chồng thành bốn lớp, lớp đầu tiên được tạo ra song song với khoảng cách đều nhau theo hướng trục X và lớp thứ hai được tạo ra song song với khoảng cách đều nhau ở một góc đã được xác định trước so với trục X của lớp đầu tiên. Ở đây, lớp được tạo ra song song trong lớp thứ hai được đặt lại theo trục X, và lớp thứ ba được tạo ra song song ở một góc đã được xác định trước so với trục X. Hơn nữa, lớp được tạo ra song song trong lớp thứ ba được đặt lại theo trục X, và lớp thứ tư được tạo ra song song ở một góc đã được xác định trước so với trục X.

Góc định hướng như vậy có thể được gọi là góc quay, và góc định hướng trung bình giữa các lớp của thanh chống n lớp có thể nằm trong khoảng từ 5° đến 355° , nằm trong khoảng từ 10° đến 350° , nằm trong khoảng từ 15° đến 345° , hoặc nằm trong khoảng từ 20° đến 330° . Tốt hơn nữa là, góc này nằm trong khoảng từ 5° đến 180° , nằm trong khoảng từ 5° đến 160° , hoặc nằm trong khoảng từ 10° đến 150° . Góc định hướng trung bình là góc định hướng giữa các lớp, và khi cấu trúc 4 lớp được cấu trúc để các lớp được sắp xếp ở một lớp góc định hướng là 60° , góc định hướng giữa lớp thứ nhất và lớp thứ tư có thể là 180° . Góc định hướng là giá trị số trung bình và trong cấu trúc n lớp, góc định hướng giữa các lớp có thể được tạo ra bằng nhau hoặc không bằng nhau.

Đối với góc định hướng, dựa trên lớp thứ nhất, lớp thứ hai có thể có góc định hướng nằm trong khoảng từ 5° đến 180° so với lớp thứ nhất và lớp thứ ba có thể có góc định hướng

nằm trong khoảng từ 10° đến 340° so với lớp thứ nhất. Như vậy, góc định hướng giữa lớp đầu tiên và lớp thứ n có thể nằm trong khoảng từ 0° đến 360° .

Theo một phương án của sáng chế, trong cấu trúc của các thanh chống được xếp chồng thành bốn lớp, lớp thứ hai có thể được sắp xếp để xoay được từ 30° đến 60° so với lớp thứ nhất, lớp thứ ba có thể được sắp xếp để xoay được từ 75° đến 105° so với lớp thứ nhất, và lớp thứ tư có thể được sắp xếp để xoay được từ 120° đến 150° so với lớp thứ nhất.

Theo phương án khác theo sáng chế, trong cấu trúc của thanh chống được xếp chồng thành bốn lớp, lớp thứ hai có thể được sắp xếp để xoay được từ 40° đến 50° so với lớp thứ nhất, lớp thứ ba có thể được sắp xếp để xoay được từ 85° đến 95° so với lớp thứ nhất, và lớp thứ tư có thể được sắp xếp để xoay được từ 130° đến 140° so với lớp thứ nhất.

Do sự sắp xếp nói trên của các thanh chống, các thanh chống tạo thành các lớp riêng lẻ bắt chéo nhau, do đó tạo ra các các lỗ ở đó. Các lỗ này được phân loại chủ yếu thành hai hoặc nhiều loại, ví dụ, các lỗ được tạo ra bằng cách xếp các thanh chống theo hướng thẳng đứng và các lỗ được tạo ra bởi khoảng cách giữa các thanh chống được sắp xếp trong cùng một lớp thanh chống. Kích thước lỗ có thể thay đổi tùy thuộc vào cấu trúc xếp chồng và khoảng cách, và các lỗ có nhiều phân bố lỗ có kích thước lỗ giống nhau hoặc khác nhau, như phân phối hai một và ba một. Ngoài ra, các vùng liên lỗ có thể được tạo ra độc lập hoặc có thể ở dạng các kênh được nối theo chiều dọc (nghĩa là các cấu trúc lỗ liên kết với nhau) để cho phép chất lỏng di chuyển tự do.

Nếu các thanh chống được xếp chồng lên nhau ngoài khoảng góc nêu trên, các đặc tính cơ học của bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống thu được có thể bị suy giảm, và hơn nữa, có thể khó kiểm soát kích thước các lỗ và độ xốp của chúng, do đó không phù hợp để cấy ghép. Do đó, khi các thanh chống được sắp xếp thành nhiều lớp thông qua sự xoay tương đối như được mô tả trên đây, có thể chế tạo được bộ khung có cấu trúc xếp chồng hình học và đạt được các đặc tính cơ học và các hiệu quả như sinh trưởng tế bào và các hiệu quả tương tự từ kết quả của cấu trúc trên.

Theo một phương án của sáng chế, trong cấu trúc của thanh chống được xếp chồng thành bốn lớp, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có phân bố lỗ hai một có các lỗ đầu tiên có kích thước nằm trong khoảng từ $380\mu\text{m}$ đến $430\mu\text{m}$, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ $410\mu\text{m}$ đến $420\mu\text{m}$, và các lỗ thứ hai có kích thước nằm trong khoảng từ $200\mu\text{m}$ đến $250\mu\text{m}$. Ở đây, độ xốp của bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể khác nhau tùy thuộc vào dạng xếp chồng các thanh chống và đường kính của chúng, nhưng có thể nằm trong khoảng từ 30% đến 60%, nằm trong khoảng từ 35% đến 55%, nằm trong khoảng từ 40% đến 50%, hoặc nằm trong khoảng từ 40% đến 45%.

Kích thước lỗ và độ xốp của bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể nằm trong khoảng tạo điều kiện cho sự tăng sinh tế bào, biệt hóa tế bào và hình thành xương, và hơn nữa, có thể được điều chỉnh tự do trong khoảng nêu trên để cho phép di chuyển chất lỏng và gắn tế bào để tái tạo mô sau đó, để ngăn ngừa sự mất tế bào nhằm kiểm soát tốc độ tái tạo tế bào, và để đáp ứng các yêu cầu về đặc tính của bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống.

Bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống theo sáng chế có thể được áp dụng trong nhiều lĩnh vực. Bộ khung thông thường dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể được chế tạo thông qua nhiều phương pháp khác nhau, trong đó quy trình ép phun sử dụng máy in 3D dựa trên công nghệ FDM được thực hiện theo sáng chế.

Để đạt được các đặc tính cần thiết của bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống thông qua quy trình FDM, cần lưu ý hai vấn đề sau: áp dụng cho quy trình FDM, và các đặc tính (ví dụ, tính tương hợp sinh học, độ bền, v.v.) của bộ khung được chế tạo theo quy trình FDM phải vượt trội.

Theo sáng chế, việc sử dụng hỗn hợp kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học có khả năng giải quyết được vấn đề tương hợp sinh học, và cấu trúc xếp chồng của các thanh chống giúp có thể đạt được các đặc tính mong muốn, đặc biệt là độ cứng và độ bền.

Độ cứng dùng để chỉ đặc tính trong đó biến dạng không xảy ra để đáp ứng với ngoại lực, và độ bền dùng để chỉ đặc tính chống lại các tác động mạnh. Khi cả hai đặc tính này được cải thiện, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống không dễ bị nứt do khả năng chống chịu áp lực hoặc tác động tăng, có thể bù cho độ giòn của vật liệu gốm của kính sinh học.

Việc đo độ bền được thực hiện thông qua thử nghiệm uốn 3 điểm, và thu được ba thông số: độ bền, mômen uốn cực đại và ứng suất uốn cực đại.

Độ bền có thể nằm trong khoảng từ 50 kPa/mm³ đến 850 kPa/mm³, nằm trong khoảng từ 70 kPa/mm³ đến 800 kPa/mm³, hoặc nằm trong khoảng từ 100 kPa/mm³ đến 800 kPa/mm³, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 600 kPa/mm³ đến 800 kPa/mm³.

Ở đây, mômen uốn cực đại có thể nằm trong khoảng từ 25 N·mm đến 70 N·mm, nằm trong khoảng từ 30 N·mm đến 65 N·mm, hoặc nằm trong khoảng từ 35 N·mm đến 650 N·mm, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 45 N·mm đến 60 N·mm.

Hơn nữa, ứng suất uốn tối đa có thể nằm trong khoảng từ 3 MPa đến 9 MPa, nằm trong khoảng từ 3,5 MPa đến 8,5 MPa, hoặc nằm trong khoảng từ 4 MPa đến 8 MPa, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,5 MPa đến 7,5 MPa.

Độ cứng có thể được đo bằng cách sử dụng máy thử độ nén, và thu được ba thông số: độ cứng, thể tích chảy và giới hạn chảy.

Độ cứng có thể nằm trong khoảng từ 1,5 N/mm đến 20 N/mm, nằm trong khoảng từ 1,8 N/mm đến 15 N/mm, hoặc nằm trong khoảng từ 2,0 N/mm đến 10 N/mm, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2,0 N/mm đến 5 N/mm.

Thể tích chảy có thể nằm trong khoảng từ 0,3mm đến 0,8mm hoặc nằm trong khoảng từ 0,35mm đến 0,7mm, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,4mm đến 0,65mm.

Giới hạn chảy có thể nằm trong khoảng từ 3 MPa đến 20 MPa, nằm trong khoảng từ 4 MPa đến 15 MPa, hoặc nằm trong khoảng từ 4,5 MPa đến 10 MPa, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 MPa đến 10 MPa.

Ngoài các đặc tính nêu trên, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống theo sáng chế cũng có các đặc tính bề mặt và các hoạt tính khác nhau như hoạt tính sinh học và các hoạt tính tương tự được đề cập dưới đây.

Ví dụ, độ nhám (R_a) bề mặt của bộ khung được đo bằng cách sử dụng máy đo độ nhám bề mặt (Nanoview-m4151p, Hàn Quốc) có thể nằm trong khoảng từ 130nm đến 260nm, nằm trong khoảng từ 135nm đến 250nm, hoặc nằm trong khoảng từ 140nm đến 240nm.

Ngoài ra, góc tiếp xúc nước, kết hợp với tính kỵ nước, có giá trị bằng số sau đây. Góc tiếp xúc nước được đo bằng cách sử dụng quy trình giọt cố định (sessile drop) ở nhiệt độ trong phòng (25°C) bằng cách đặt 10 μ L một giọt nước trên bề mặt của bộ khung, và giá trị thấp hơn cho thấy tính kỵ nước cao hơn.

Sau 1 giây: 90° hoặc nhỏ hơn, từ 40° đến 90°, 70° hoặc nhỏ hơn, từ 43° đến 70°

Sau 30 giây: 80° hoặc nhỏ hơn, từ 0° đến 80°, 60° hoặc nhỏ hơn, từ 20° đến 60°

Sau 180 giây: 75° hoặc nhỏ hơn, từ 0° đến 75°, 30° hoặc nhỏ hơn, từ 10° đến 30°

Ngoài ra, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống theo sáng chế có mật độ quang học (OD) nằm trong khoảng từ 0,19 đến 0,6 O.D. theo quan điểm về độ hấp thụ kết hợp với khả năng hấp thụ protein bằng cách sử dụng thử nghiệm protein BCA (axit bixinchonic) (Pierce Kit, Thermo Science), và có mật độ quang học sau theo thời gian.

- Sau 1 giờ (O.D.): 0,19 hoặc cao hơn, từ 0,19 đến 0,27, từ 0,22 đến 0,25

- Sau 6 giờ (O.D.): 0,23 hoặc cao hơn, từ 0,23 đến 0,38, từ 0,26 đến 0,35

- Sau 12 giờ (O.D.): 0,24 hoặc cao hơn, từ 0,24 đến 0,43, từ 0,30 đến 0,39

- Sau 24 giờ (O.D.): 0,25 hoặc cao hơn, từ 0,25 đến 0,60, từ 0,40 đến 0,59

Hiệu quả gieo tế bào, một thông số liên quan đến hoạt tính của tế bào, có thể được biểu thị bằng giá trị số là 37% hoặc cao hơn, 40% hoặc cao hơn, hoặc 45% hoặc cao hơn. Giá trị số càng cao, độ bám dính, sự sinh trưởng và sự biệt hóa tế bào càng tốt, có nghĩa là hoạt tính của

tế bào tăng.

Ngoài ra, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể có mức hấp thụ tăng sinh tế bào trong khoảng dưới đây sau khi nuôi cấy 7 ngày so với tốc độ tăng sinh tế bào đo được bằng thử nghiệm tăng sinh tế bào (thử nghiệm MTT). Ở đây, giá trị số cao hơn có nghĩa là sự tăng sinh tế bào đang diễn ra hiệu quả.

Sau 1 ngày (%): 0,17 hoặc cao hơn, 0,19 hoặc cao hơn, từ 0,19 đến 0,3

Sau 3 ngày (%): 0,19 hoặc cao hơn, 0,21 hoặc cao hơn, từ 0,21 đến 0,3

Sau 7 ngày (%): 0,22 hoặc cao hơn, 0,25 hoặc cao hơn, từ 0,25 đến 0,4

Hơn nữa, tỷ lệ diện tích F-Actin của bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống theo sáng chế có thể nằm trong khoảng 22% hoặc cao hơn, 25% hoặc cao hơn, 28% hoặc cao hơn, từ 28% đến 60%, hoặc từ 30% đến 55%.

Ngoài ra, bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống theo sáng chế được chế tạo bằng cách a) trộn kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học và b) thực hiện ép phun.

Các bước này được mô tả chi tiết dưới đây.

a) Trộn

Các đặc tính của bộ khung được mô tả trên đây có thể đạt được thông qua việc trộn hỗn hợp kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học và kiểm soát tỷ lệ thành phần giữa chúng.

Kính thủy tinh, một trong những loại gốm sinh học, là loại gốm có hoạt tính sinh học được gắn vào cơ thể sống và tạo ra một liên kết hóa học mạnh bằng cách tiếp xúc trực tiếp với xương xung quanh mà không cần màng sợi.

Kính thủy tinh có thể được chọn từ nhóm bao gồm CaO, SiO₂, P₂O₅, B₂O₃ và hỗn hợp của chúng.

Kính sinh học theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm CaO , SiO_2 , P_2O_5 , B_2O_3 và hỗn hợp của chúng, và là không độc và có tác dụng tạo ra sự biệt hóa nguyên bào xương trong tế bào gốc trung mô của người tốt hơn so với hydroxyapatit, là khoáng chất cơ bản của xương. Nó cũng có độ bền nén gấp đôi hydroxyapatit và do đó có thể được sử dụng làm vật liệu tương hợp sinh học trong không gian đĩa đệm.

CaO là vật liệu dễ dàng hợp nhất với các thành phần gốm khác để góp phần vào tính lưu động, độ bền và khả năng chống nước của toàn bộ chế phẩm, và tốt hơn là lượng CaO nằm trong khoảng từ 20 đến 60% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40 đến 50% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của kính sinh học, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Nếu lượng CaO thấp hơn 20% khối lượng tính theo tổng khối lượng của kính sinh học, độ bền và khả năng chống nước của các sản phẩm in 3D có thể suy giảm. Mặt khác, nếu lượng CaO vượt quá 60% khối lượng tính theo tổng khối lượng của kính sinh học, độ giòn của các sản phẩm được in 3D có thể gia tăng hoặc tính lưu động của toàn bộ chế phẩm kém, do đó không đồng nhất với thành phần khi in 3D, đó là điều không mong muốn.

SiO_2 là vật liệu có độ trong suốt, độ nhót, độ bền và nhiệt độ hợp nhất thấp và góp phần ổn định toàn bộ chế phẩm, và tốt hơn là lượng SiO_2 nằm trong khoảng từ 15 đến 40% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 đến 40% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của kính sinh học, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Khi lượng SiO_2 nằm trong khoảng nêu trên, hoạt tính sinh học có thể được cải thiện và quá trình kết tinh thủy tinh có thể trở nên tốt.

P_2O_5 có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn như thể đột biến *Streptococcus* và do đó có thể làm tăng hoạt tính sinh học. Đặc biệt, P_2O_5 , được chứa với lượng lớn trong răng hoặc xương tự nhiên, có thể tạo thành nền thủy tinh và tăng tính thấm của chúng. Tốt hơn là, lượng P_2O_5 nằm trong khoảng từ 6 đến 20% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 12 đến 16% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của kính sinh học, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó. Nếu lượng P_2O_5 thấp hơn 6% khối lượng tính theo tổng khối lượng của kính sinh

học, hiệu quả ức chế sự nhân lên của vi khuẩn và sự tạo thành nền thủy tinh trở nên không đáng kể. Mặt khác, nếu lượng P_2O_5 vượt quá 20% khối lượng, độ giòn có thể gia tăng, điều này là không mong muốn.

B_2O_3 có thể cải thiện quá trình kết tinh của thủy tinh để tăng thêm độ bền cơ học và tốc độ giãn nở nhiệt. Tốt hơn, nếu lượng B_2O_3 là 1% khối lượng, và tốt hơn nữa nếu là 0,5% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của kính sinh học, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Đặc biệt, kính sinh học theo sáng chế sử dụng vật liệu đã kết tinh thông qua quá trình thiêu kết, thay vì sử dụng vật liệu có thành phần như trên.

Cụ thể, kính sinh học được kết tinh thông qua quá trình thiêu kết, do đó có thể tăng cường độ bền bên trong và độ cứng của sản phẩm in 3D được chế tạo.

Nhiệt độ thiêu kết có thể thay đổi khác nhau khi xét theo nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh bên trong của kính sinh học. Ví dụ, trong quá trình thiêu kết, bước gia nhiệt có thể được thực hiện theo cách nhiệt độ được tăng dần ở tốc độ gia nhiệt nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,8°C/phút để đạt đến nhiệt độ cao nhất nằm trong khoảng từ 800 đến 1200°C, sau đó việc thiêu kết có thể được thực hiện trong khoảng thời gian từ 160 đến 200 phút ở nhiệt độ cao nhất. Sự thay đổi mạnh về nhiệt độ làm cho việc duy trì được hình dạng của kính sinh học đã được thiêu kết được phun bằng máy in 3D là rất khó khăn, do đó gây ra các vết nứt và lỗ và giảm đáng kể độ bền.

Trong quá trình thiêu kết, bước làm mát có thể được thực hiện theo cách mà nhiệt độ của sản phẩm định hình giảm dần từ nhiệt độ đỉnh xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 35°C với tốc độ làm mát nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,8°C/phút. Nếu nhiệt độ được hạ xuống ở tốc độ làm mát vượt quá 0,8°C/phút, có thể tạo ra vết nứt hoặc lỗ, do đó làm giảm đáng kể độ bền.

Nhiệt độ cao nhất của quá trình thiêu kết ảnh hưởng đến độ bền của bộ khung thành phẩm, và tốt hơn là quá trình thiêu kết được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 800 đến

1200 °C để nhận biết chất thay thế cho mô sinh học cứng. Nếu nhiệt độ cao nhất là thấp hơn 800°C, độ bền nén có thể giảm, điều này làm cho bộ khung không có khả năng hoạt động thay thế cho mô sinh học cứng. Mặt khác, nếu nhiệt độ cao hơn 1200°C, có thể xảy ra nứt.

Quy trình thiêu kết được thực hiện sau quy trình đúc phun trong chế tạo bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống, và do đó, trong trường hợp sử dụng kính sinh học không thiêu kết, thay vì sử dụng kính sinh học đã được thiêu kết, bộ khung thu được được cấu trúc để chỉ một mình kính sinh học đã được thiêu kết được bỏ lại mà không có polyme tương hợp sinh học. Trong trường hợp này, do độ giòn cao của chúng, các vết nứt dễ dàng được tạo ra dưới tác động hoặc áp lực bên ngoài, điều này khiến cho nó không phù hợp để sử dụng làm bộ khung.

Ngoài ra, polyme tương hợp sinh học, được trộn với kính sinh học đã được thiêu kết, có chức năng như một chất kết dính. Chất kết dính này chịu trách nhiệm để liên kết các hạt mịn của kính sinh học đã được thiêu kết với nhau để làm cho chúng kết dính và nhót, và cho phép kính sinh học có độ bền rất tốt để khắc phục được vấn đề về độ giòn vốn có. Ngoài ra, khi chế phẩm chứa kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học hoạt động như chất kết dính, được trộn với nhau, được nóng chảy, chế phẩm được tạo ra có tính lưu động và khả năng chảy để tạo điều kiện cho việc phun.

Một ví dụ đại diện về polyme tương hợp sinh học có thể được chọn từ nhóm bao gồm poly(ϵ -caprolacton) (PCL), polyetylen (PE), poly(metyl metacrylat) (PMMA), axit polylactic (PLA), axit poly-L-lactic (PLLA), polyglycolit (PGA), axit polylactic-co-glycolic (PLGA), polyvinyl clorua (PVC), polytetrafloroetylen (PTFE), polyetylen terephthalat (PET), polyuretan, polyaxetal, polyamit, chất đàn hồi polyamit, polyeste, chất đàn hồi polyeste, polypropylen, polyacrylonitril, polysulfon, polyorthoeste, polyanhydrua, chitosan, gelatin, collagen và hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn, nếu polyme tương hợp sinh học theo sáng chế là polyme dễ suy biến sinh học. Polyme dễ suy biến sinh học cho phép kiểm soát độ bền cơ học của nó, dễ xử lý và cho phép điều chỉnh tốc độ phân hủy sinh học tùy thuộc vào các điều kiện tổng hợp, do đó vật liệu có thể

được sử dụng một cách hiệu quả. Tốt hơn, nếu polyme dễ suy biến sinh học là polyme bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm poly (ϵ -caprolacton), axit polylactic, axit poly-L-lactic, polyglycolit, axit polylactic-co-glycolic và hỗn hợp của chúng, và tốt hơn nữa nếu poly(ϵ -caprolacton) được sử dụng.

Đặc biệt, số lượng của kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học được kiểm soát để đáp ứng không chỉ độ bền và độ cứng của bộ khung mà còn cả các đặc tính như độ nhám bề mặt, tính ưa nước, khả năng hấp thụ protein, và các đặc tính tương tự.

Cụ thể, lượng kính sinh học đã được thiêu kết nằm trong khoảng từ 10 đến 70% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 đến 50% khối lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 35 đến 45% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Nếu lượng kính sinh học đã được thiêu kết thấp hơn giới hạn dưới nêu trên, các đặc tính cơ học bên trong của kính sinh học, như độ bền nén, v.v., có thể suy giảm. Mặt khác, nếu lượng của chúng vượt quá giới hạn trên nêu trên, khó có thể phun được chế phẩm thu được do độ nhớt cao của chúng.

Ngoài ra, lượng polyme tương hợp sinh học có thể nằm trong khoảng từ 30 đến 90% khối lượng, nằm trong khoảng từ 50 đến 70% khối lượng, hoặc nằm trong khoảng từ 55 đến 65% khối lượng, tính theo tổng khối lượng của chế phẩm. Nếu lượng polyme tương hợp sinh học thấp hơn giới hạn dưới nêu trên, lực liên kết không đủ giữa các hạt kính sinh học đã được thiêu kết có thể dẫn đến, hoặc có thể khó giải quyết, vấn đề về độ giòn của kính sinh học đã được thiêu kết. Mặt khác, nếu lượng này vượt quá giới hạn trên nêu trên, lượng tương đối của kính sinh học đã được thiêu kết thấp, và do đó có mối lo ngại là các đặc tính của bộ khung thành phẩm được chế tạo có thể suy giảm.

Ngoài ra, tỷ lệ thành phần của kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học có liên quan đến độ nhớt (η^* , độ nhớt phức) trong chế tạo bộ khung bằng máy in 3D FDM. Cụ thể, kính sinh học đã được thiêu kết có đặc điểm không nhớt, và độ nhớt của chất nóng chảy khi ép phun tăng lên cùng với sự gia tăng lượng của chúng. Chất nóng chảy ở độ nhớt cao có thể ảnh hưởng đến hình dạng và chất lượng xử lý các thanh chống sau khi ép phun,

gây khó khăn cho việc đảm bảo độ đồng đều về đường kính hoặc độ dày của các thanh chống, và vòi phun có thể bị tắc. Khoảng độ nhớt thích hợp có thể đạt được thông qua tỷ lệ thành phần nêu trên của kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học, và tốt hơn là độ nhớt nằm trong khoảng từ 110 đến 800 Pa • s, nằm trong khoảng từ 120 đến 700 Pa • s, hoặc nằm trong khoảng từ 150 đến 500 Pa • s.

Kính thủy tinh đã được thiêu kết có thể được nghiền thành bột trước khi hoặc sau khi thiêu kết. Cụ thể, kích thước hạt trung bình của kính sinh học đã được thiêu kết sau khi nghiền thành bột được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2,5 μm . Ở đây, kích thước hạt trung bình được tính từ giá trị đo được bằng máy phân tích kích thước hạt (APA2000, MALVERN) (điểm tích tụ 50% trong phân bố đường kính trung bình của các hạt).

Quá trình nghiền mịn có thể được thực hiện bằng cách sử dụng máy nghiền mịn bất kỳ đã biết, ví dụ, máy nghiền đông lạnh.

Để trộn đều hỗn hợp kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học, polyme tương hợp sinh học có thể được sử dụng sau lần đầu tiên được nghiền đến khoảng kích thước hạt tương tự như của kính sinh học đã được thiêu kết, hoặc quá trình nghiền mịn có thể được thực hiện trong quá trình trộn.

b) Đúc phun

Tiếp theo, chế phẩm đã được nghiền mịn được đúc để chế tạo bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống.

Quá trình đúc phun có thể được thực hiện thông qua quy trình in 3D FDM.

Máy in 3D FDM (mô hình hợp nhất lắng đọng) là loại máy in 3D chế tạo sản phẩm định hình ba chiều bằng cách phun và xếp chồng vật liệu có tính lưu động và khả năng chảy trong quy trình làm nóng chảy, và bao gồm cả máy in 3D FDM hiện có bán trên thị trường và máy in 3D FFF (chế tạo sợi hợp nhất).

Chế phẩm dùng cho máy in 3D FDM theo sáng chế ở dạng bột nhão có tính lưu động,

độ chảy và độ nhót. Cụ thể, chế phẩm dùng cho máy in 3D FDM theo sáng chế có thể được áp dụng cho tất cả các máy in 3D, bất kể loại nào, miễn là máy in 3D là thiết bị in 3D bất kỳ có khả năng phun, ngoài việc áp dụng cho FDM có bán trên thị trường và máy in 3D FFF.

Bộ gia nhiệt được cung cấp cho máy in 3D hoạt động trong khoảng nhiệt độ từ 25 đến 250°C và hoạt động chức năng để làm nóng chảy chế phẩm đã được nghiền. Khi kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học, là chất rắn, được làm nóng chảy và tạo thành dạng sệt, chế phẩm này có thể được truyền với tính lưu động và khả năng chảy để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phun.

Để tăng tính đồng nhất hoặc độ tương tự về kích thước hình học của các thanh chống thông qua quá trình đúc phun, cần tối ưu hóa các thông số xử lý như tốc độ vòi phun, áp suất khí nén và nhiệt độ gia nhiệt.

Khi tốc độ vòi phun (mm/giây) tăng, kích thước thanh chống (μm) của mỗi bộ khung có thể giảm. Ví dụ, như được thể hiện trên Fig.2 (a), cho thấy kết quả thử nghiệm ở nhiệt độ 120°C và áp suất khí nén 400 kPa, kích thước thanh chống có thể giảm khi tăng tốc độ vòi phun. Ngoài ra, để tạo ra các thanh chống có cùng kích thước, tốc độ vòi phun có thể giảm khi tăng lượng kính sinh học đã được thiêu kết.

Ngoài ra, khi áp suất khí nén (kPa) tăng, kích thước thanh chống (μm) của mỗi bộ khung có thể tăng. Ví dụ, như được thể hiện trên Fig.2 (b), cho thấy kết quả thử nghiệm ở nhiệt độ 120°C và tốc độ vòi phun là 5 mm/giây, kích thước thanh chống có thể tăng khi áp suất khí nén tăng do tốc độ dòng chảy cao và độ nhót của chế phẩm thấp. Ngoài ra, để tạo ra các thanh chống có cùng kích thước, áp suất khí nén có thể tăng lên cùng với sự gia tăng lượng kính sinh học đã được thiêu kết.

Khi nhiệt độ (°C) tăng, kích thước thanh chống (μm) của mỗi bộ khung có thể tăng. Ví dụ, như được thể hiện trên Fig.2 (c), cho thấy kết quả thử nghiệm ở tốc độ vòi phun 5 mm/giây và áp suất khí nén 400 kPa, kích thước thanh chống có thể tăng khi nhiệt độ tăng do tốc độ dòng chảy cao và độ nhót thấp của chế phẩm. Ngoài ra, để tạo ra các thanh chống có cùng kích thước,

nhệt độ có thể tăng lên cùng với sự gia tăng lượng kính sinh học đã được thiêu kết.

Trong chế tạo thông thường bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống, quá trình thiêu kết được thực hiện sau khi đúc phun, nhưng có thể được loại trừ trong sáng chế vì sử dụng polyme sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học. Theo đó, quá trình chế tạo có thể được đơn giản hóa và chi phí có thể được giảm.

Bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống có thể được sử dụng cho xương nhân tạo, khớp nhân tạo, xương hàm trên, hộp sọ hoặc chân răng nhân tạo nha khoa, và có thể được sử dụng làm xương nhân tạo hình đĩa để sử dụng trong hợp nhất cột sống hoặc xương nhân tạo để sử dụng trong việc tái tạo khuôn mặt.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn thông qua các ví dụ sau, các ví dụ này chỉ được đưa ra nhằm minh họa sáng chế chứ không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ điều chế 1: Tạo ra kính sinh học đã được thiêu kết

139,8g CaO, 113,7g SiO₂, 45,6g P₂O₅, và 0,9g B₂O₃, đều là bột khô, được đặt trong bình và trộn để thu được 300g kính sinh học.

Kính sinh học thu được như vậy được thiêu kết trong các điều kiện sau, nhờ đó thu được kính sinh học đã được thiêu kết.

(Điều kiện thiêu kết)

0 → 600°C: 720 phút

600°C (Giữ): 60 phút

600 → 1000°C: 800 phút

1000°C (Giữ): 180 phút

1000 → 600°C và 600°C (Giữ): 800 phút

600 → 20°C: 720 phút

Ví dụ và các Ví dụ so sánh: Chế tạo bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống

(1) Trộn

Kính sinh học thu được trong Ví dụ điều chế 1 được đặt trong máy nghiền bi (Máy nghiền bi năng lượng cao, FRITSCH) và được nghiền mịn để thu được kích thước hạt trung bình là 2,1 μ m. Kính sinh học được nghiền mịn như vậy được trộn với poly(ϵ -caprolacton) (PURASORB PC12, Corbion Purac, sau đây được gọi là “PCL”) với tỷ lệ thành phần được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây, do đó điều chế được 100g chế phẩm.

Chế phẩm điều chế được như vậy được đặt vào máy nghiền lạnh (6875D, SPEX Sampleprep) và được nghiền mịn để thu được kích thước hạt trung bình là 2,1 μ m.

(2) Đúc phun

Chế phẩm được nghiền mịn như vậy được làm nóng chảy bằng cách sử dụng bộ gia nhiệt được cung cấp cho máy in 3D FDM (DTR3-331S-EX, Dasa Robot System). Tiếp theo, chế phẩm ở pha bột nhão được nạp vào đầu phun của máy in (đường kính: 500 μ m), sau đó chế phẩm được phun vào kích thước 6 x 6 x 2 mm³ thông qua cổng phun và xếp chồng lên nhau theo từng lớp trên bàn làm việc.

Ở đây, bộ khung gồm các thanh chống xếp chồng lên nhau theo bốn hướng, như được thể hiện trên Fig.1, được chế tạo bằng cách vượt qua lớp thứ hai ở hướng phun 45°, lớp thứ ba ở hướng phun 90° và lớp thứ tư ở hướng phun 135°, trên cơ sở hướng phun của lớp thứ nhất khi đúc phun chế phẩm theo cách từng lớp.

Bảng 1

	Kính sinh học đã được thiêu kết (% khối lượng)	PCL (% khối lượng)	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Thời gian xử lý (phút)	Tốc độ vòi (mm/giây)	Áp suất khí nén (kPa)
Ví dụ 1	20	80	120	2	5	320
Ví dụ 2	40	60	120	2	5	450
Ví dụ 3	60	40	140	2	5	500
Ví dụ so sánh 1	100	0	25	2	5	430
Ví dụ so sánh 2	0	100	100	2	5	480

Ví dụ thử nghiệm 1: Xác định thông số xử lý

Các thông số xử lý tối ưu được xác định bằng cách kiểm tra tốc độ, áp suất khí nén, nhiệt độ và độ nhót trong suốt quy trình đúc phun bằng cách sử dụng các chế phẩm của các Ví dụ 1 đến 3.

Fig.2 là các biểu đồ thể hiện các thay đổi về đặc tính của thanh chống tùy thuộc vào các thông số xử lý trong Ví dụ 1 đến 3 và Ví dụ so sánh 1 và 2.

Như được thể hiện trên các Fig.2(a) đến 2(c), đường kính của thanh chống bị ảnh hưởng bởi tốc độ vòi phun, lượng kính sinh học đã được thiêu kết, và nhiệt độ nóng chảy. Ví dụ, khi lượng kính sinh học đã được thiêu kết tăng, đường kính của các thanh chống nhỏ hơn, và khi áp suất khí nén và lượng kính sinh học tăng, đường kính của các thanh chống lớn hơn.

Độ nhót của thanh chống trên Fig.2 (d) được đo bằng cách sử dụng máy đo lưu biến quay được cung cấp dưới dạng một tấm song song có đường kính 20mm và khoảng cách là 2mm (Bohlin Gemini HR Nano, Malvern Instruments, Surrey, Anh), và việc quét tần số được thực hiện ở mức biến dạng 1% và 140°C. Dựa vào Fig.2 (d), cho thấy độ nhót tăng lên cùng với sự gia tăng lượng kính sinh học đã được thiêu kết.

Dựa trên kết quả của Fig.2, điều kiện xử lý phù hợp với đường kính thanh chống tối ưu (390 đến 425) để sử dụng trong bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống được thiết lập bằng cách điều chỉnh lượng kính sinh học đã được thiêu kết/PCL, và đã được áp dụng cho các điều kiện xử lý của các ví dụ.

Ví dụ thử nghiệm 2: Phân tích cấu trúc thanh chống

(1) Đặc điểm lỗ

Các bộ khung được chế tạo trong các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2 được đo về đường kính thanh chống, kích thước lỗ và độ xốp. Kết quả đo được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây. Kích thước lỗ được đo bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử quét (SEM, SNE-3000M, SEC Inc., Hàn Quốc), và độ xốp được tính toán bằng cách sử dụng phương trình sau

và mật độ khối (ρ) (PCL (1,135 g/cm³)/kính thủy tinh (3,05 g/cm³)).

Phương trình 1

$$\text{Độ xốp (\%)} = (1 - (1/\rho_s) \times (W_s/V_a)) \times 100$$

(ρ : mật độ khối, W_s : khối lượng của cấu trúc, V_a : thể tích của cấu trúc)

Bảng 2

	Đường kính thanh chống (μm)	Kích thước lỗ thứ nhất (μm)	Kích thước lỗ thứ hai (μm)	Độ xốp (%)
Ví dụ 1	424,3 $\pm$ 7,7	400,7 $\pm$ 10,2	214,3 $\pm$ 14,1	42,5 $\pm$ 2,1
Ví dụ 2	401,4 $\pm$ 16,3	415,7 $\pm$ 14,4	222,9 $\pm$ 16,7	43,1 $\pm$ 1,0
Ví dụ 3	420,7 $\pm$ 9,2	412,1 $\pm$ 7,0	216,4 $\pm$ 20,5	42,3 $\pm$ 1,2
Ví dụ so sánh 1	392,5 $\pm$ 20,1	391,5 $\pm$ 9,1	207,7 $\pm$ 20,7	46,8 $\pm$ 3,0
Ví dụ so sánh 2	400,7 $\pm$ 4,7	439,3 $\pm$ 14,3	221,4 $\pm$ 13,6	43,1 $\pm$ 1,5

Như đã thấy trong Bảng 2, thanh chống có đường kính nằm trong khoảng từ 390 đến 425 μm , phân bố kích thước lỗ hai một, và độ xốp nằm trong khoảng từ 42 đến 47%.

(2) Phân tích bằng kính hiển vi

Fig.3 thể hiện bộ khung và thanh chống được chế tạo trong các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2.

Dòng thứ nhất của Fig.3 thể hiện hình ảnh kính hiển vi tối ưu (BX FM-32, Olympus, Tokyo, Nhật Bản), trong đó bộ khung được cấu trúc để bao gồm thanh chống được xếp chồng thành bốn lớp.

Dòng thứ hai đến dòng thứ tư của Fig.3 thể hiện hình ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM, SNE-3000M, SEC Inc., Hàn Quốc), trong đó thanh chống nhiều lớp được xử lý ở các góc quay định trước và lỗ được tạo ra trên bề mặt của chúng. Các lỗ trong bề mặt của thanh chống cung cấp một bề mặt nhám có thể thúc đẩy sự kết dính của tế bào và biệt hóa mô xương khi tái tạo mô.

Dòng thứ năm và dòng thứ sáu của Fig.3 thể hiện kết quả của quang phổ tán sắc năng lượng (energy dispersive spectroscopy - EDS) với kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường

(JSM7500F, JEOL LTD.) và lập bản đồ phân bố của Ca và Si. Rõ ràng từ những hình ảnh này có thể khẳng định rằng thanh chống chứa Ca và Si và nồng độ của Ca và Si trong thanh chống tăng khi lượng kính sinh học tăng.

Ví dụ thử nghiệm 3: Phân tích chế phẩm

Chế phẩm (sau khi nghiền mịn) được sử dụng để chế tạo bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2 được đưa vào phân tích nhiệt trọng và nhiễu xạ tia X. Kết quả của chúng được thể hiện trên Fig.4.

(1) Phân tích nhiệt trọng (TGA)

10 mg mỗi chế phẩm được gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 800°C ở tốc độ gia nhiệt là 20°C/phút, và sau đó được đưa vào TGA bằng cách sử dụng máy phân tích nhiệt trọng (TGA-2050, TA-Instruments) trong khí quyển nitơ.

Fig.4(a) là đồ thị TGA về chế phẩm được sử dụng để chế tạo bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2. Như được thể hiện trên Fig.4(a), trong Ví dụ so sánh 1, bằng cách chỉ sử dụng kính sinh học đã được thiêu kết, không có sự thay đổi về khối lượng do không có mặt của PCL, và trong Ví dụ so sánh 2, bằng cách chỉ sử dụng PCL, quá trình nhiệt phân hoàn toàn xảy ra ở 500°C. Ngược lại, trong chế phẩm của các Ví dụ 1 đến 3, đã xác nhận rằng kính sinh học đã được thiêu kết được trộn đã được bỏ lại với lượng tương ứng với khối lượng của chúng.

(2) Nhiễu xạ tia X (XRD)

Để đo kích thước tinh thể, máy đo nhiễu xạ tia X (Siemens D500 WAXD, Siemens) bằng cách sử dụng các tia phóng xạ CuK α trong điều kiện chùm tia 40 kV và 20 mA được sử dụng. Thử nghiệm nhiễu xạ tia X được thực hiện trong các điều kiện $2\theta = 15-35^\circ$ và kích thước bước là $0,1^\circ$.

Fig.4(b) thể hiện phổ XRD của chế phẩm được sử dụng để chế tạo bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2. Như được thể hiện trên Fig.4(b), các đỉnh mạnh nhất

được quan sát tại $2\theta = 21,3^\circ$ và $23,7^\circ$, tương ứng với các mặt phẳng tinh thể (110) và (200) của PCL của Ví dụ so sánh 2. Trong Ví dụ so sánh 1, đỉnh được quan sát tại $2\theta = 31,8^\circ$, tương ứng với mặt phẳng tinh thể (211) của cấu trúc hydroxyapatit ở kính sinh học đã được thiêu kết.

Ngược lại, trong chế phẩm của các Ví dụ 1 đến 3, bao gồm các đỉnh nêu trên, chỉ ra rằng kính sinh học đã được thiêu kết và PCL được trộn thích hợp trong chế phẩm.

Ví dụ thử nghiệm 4: Phân tích đặc tính của bộ khung

Để đánh giá các đặc tính liên quan đến độ bền của bộ khung được chế tạo trong các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2, các thử nghiệm về độ bền và độ cứng sau đây được thực hiện. Kết quả của chúng được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây và trên Fig.5.

- Mômen uốn cực đại, ứng suất uốn cực đại và độ bền: Thử nghiệm uốn được thực hiện bằng cách sử dụng máy thử uốn 3 điểm với tốc độ 0,5 mm/phút (MTS Bionix Tabletop Test System, MTS System Corp., MN, Mỹ), mẫu vật (kích thước 30 x 4 x 3 mm³)

- Độ cứng, thể tích chảy và giới hạn chảy: Các phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng máy đo cường độ nén với tốc độ nén là 0,5 mm/phút (MTS Bionix Tabletop Test System, MTS System Corp., MN, Mỹ), mẫu vật (kích thước 10 x 10 x 5 mm³)

Bảng 3

		Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ 3	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2
Thử nghiệm uốn 3 điểm	Mômen uốn cực đại (N/mm)	$55,8 \pm 0,5$	$47,6 \pm 0,9$	$38,1 \pm 0,5$	$74,7 \pm 6,8$	$37,3 \pm 1,8$
	Ứng suất uốn cực đại (MPa)	$6,3 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,2$
	Độ bền (kPa/mm ³)	$760 \pm 41,7$	$710 \pm 5,48$	$100 \pm 22,7$	$5,9 \pm 0,9$	$480 \pm 46,2$
Thử nghiệm nén	Độ cứng (N/mm)	$2,5 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,2$	$25,9 \pm 6,3$	$1,1 \pm 0,1$
	Thể tích chảy (mm)	$0,6 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,06$	$0,2 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,02$
	Giới hạn chảy (MPa)	$6,1 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,6$	$21,2 \pm 5,8$	$2,6 \pm 0,2$

Như đã thấy trong Bảng 3 và Fig.5, trong bộ khung của Ví dụ so sánh 1 bằng cách sử

dụng kính sinh học đã được thiêu kết một mình, độ cứng rất cao nhưng độ bền lại rất thấp. Ngoài ra, trong bộ khung của Ví dụ so sánh 2 sử dụng một mình PCL, độ cứng thấp và độ bền cao, trái ngược với Ví dụ so sánh 1.

Để đáp ứng cho bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống, các giá trị độ cứng và độ bền phải được cân bằng một cách thích hợp, thay vì mất cân bằng, như trong các Ví dụ so sánh 1 và 2. Do đó, có thể kết luận được rằng bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 thỏa mãn đồng thời độ bền là khoảng 50 đến 850 (kPa/mm³) và độ cứng nằm trong khoảng từ 2 đến 3 N/m.

Ví dụ thử nghiệm 5: Phân tích các đặc tính bề mặt của bộ khung

(1) Đo độ nhám bề mặt/hình ảnh địa hình bề mặt 3D

Các hình ảnh địa hình bề mặt 3D thu được bằng cách sử dụng một giao thoa kế dịch chuyển pha, và do đó phân tích được độ nhám bề mặt của bộ khung. Như được thể hiện trên Fig.6, bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 và Ví dụ so sánh 1 có bề mặt cứng hơn.

Để phân tích định tính độ nhám như vậy, thu được độ nhám bề mặt (R_a) dựa trên phương trình sau bằng cách sử dụng máy đo độ nhám bề mặt (Nanoview-m4151p, Hàn Quốc).

Phương trình 2

$$R_a = [\int |Z(x)| dx] / L \quad (Z \text{ và } L \text{ của Fig.6 là chiều cao và chiều dài của cấu trúc thô})$$

Bảng 4

	Độ nhám bề mặt (R_a) (đơn vị: nm)
Ví dụ 1	$144,7 \pm 31,9$
Ví dụ 2	$168,1 \pm 26,3$
Ví dụ 3	$234,3 \pm 41,7$
Ví dụ so sánh 1	$284,6 \pm 55,4$
Ví dụ so sánh 2	$118,5 \pm 14,9$

Như đã thấy trong Bảng 4, so sánh với Ví dụ so sánh 2 bằng cách sử dụng polyme tương hợp sinh học một mình, khi lượng kính sinh học được chứa nhiều hơn, độ nhám bề mặt tăng, chỉ ra rằng độ nhám bề mặt có thể được điều chỉnh tùy thuộc vào tỷ lệ thành phần của kính sinh học đã được thiêu kết/PCL.

(2) Đo góc tiếp xúc nước

Tính ưa nước của bộ khung được chế tạo trong các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2 được đánh giá bằng cách sử dụng máy đo góc tiếp xúc nước. Kết quả của chúng được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Đánh giá tính kỵ nước được thực hiện bằng cách đặt 10 μL giọt nước trên mỗi bề mặt của bộ khung và đo góc tiếp xúc nước bằng cách sử dụng quy trình giọt cố định ở nhiệt độ trong phòng (25°C).

Bảng 5

Góc tiếp xúc nước	1 giây	30 giây	180 giây
Ví dụ 1	$67 \pm 2^{\circ}$	$58 \pm 5^{\circ}$	$26 \pm 3^{\circ}$
Ví dụ 2	$46 \pm 3^{\circ}$	$34 \pm 4^{\circ}$	$20 \pm 3^{\circ}$
Ví dụ 3	$45 \pm 2^{\circ}$	$26 \pm 3^{\circ}$	$14 \pm 3^{\circ}$
Ví dụ so sánh 1	$39 \pm 3^{\circ}$	0°	0°
Ví dụ so sánh 2	$93 \pm 4^{\circ}$	$82 \pm 4^{\circ}$	$78 \pm 3^{\circ}$

Như đã thấy trong Bảng 5, so sánh với Ví dụ so sánh 2 ($78 \pm 3^{\circ}$) bằng cách sử dụng PCL một mình, góc tiếp xúc đã giảm khi lượng kính sinh học đã được thiêu kết tăng. Bộ khung của Ví dụ 1, chứa 20% khối lượng của kính sinh học đã được thiêu kết, có góc tiếp xúc nước là $26 \pm 3^{\circ}$, chỉ ra rằng góc tiếp xúc nước, tức là tính ưa nước của bộ khung, có thể được điều chỉnh tùy thuộc vào tỷ lệ thành phần của kính sinh học đã được thiêu kết/PCL.

Ví dụ thử nghiệm 6: Khả năng tái tạo mô của bộ khung

Để đánh giá ứng dụng sinh học của bộ khung được chế tạo trong các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2, phân tích được thực hiện như sau, và kết quả của chúng được thể hiện dưới đây.

(1) Đo khả năng hấp thụ protein

Để đo khả năng hấp thụ protein, thử nghiệm protein BCA (axit bicinchoninic) (Pierce Kit, Thermo Scientific) được dùng. Mỗi bộ khung được đặt trong đĩa 24 giếng bao gồm môi

trường cần thiết tối thiểu α (Life Sciences, Mỹ) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (Gemini Bio-Products, Mỹ) và 1% chất kháng sinh (Antimycotic, Cellgro, Mỹ). Tiếp theo, bộ khung được nuôi cấy ở 37°C trong 1, 6, 12, và 24 giờ. Trước khi đo độ hấp thụ, bộ khung được làm sạch bằng PBS (dung dịch muối đệm phosphat) và ly giải trong triton X-100 0,1%. Tiếp theo, 25 μ L sản phẩm ly giải được bổ sung vào 200 μ L chất phản ứng BCA. Cuối cùng, hỗn hợp được nuôi cấy ở 37°C trong 30 phút. Độ hấp thụ được đo ở 562nm bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa (EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT).

Kết quả phép đo khả năng hấp thụ protein của các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2 sau 1, 6, 12 và 24 giờ được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Mức hấp thụ (O.D.)	1 giờ	6 giờ	12 giờ	24 giờ
Ví dụ 1	0,2215 $\pm$ 0,03339	0,274 $\pm$ 0,00726	0,31167 $\pm$ 0,05856	0,41133 $\pm$ 0,04027
Ví dụ 2	0,22733 $\pm$ 0,0344	0,2945 $\pm$ 0,000866	0,36433 $\pm$ 0,01872	0,48367 $\pm$ 0,05622
Ví dụ 3	0,24717 $\pm$ 0,02434	0,3425 $\pm$ 0,03339	0,389 $\pm$ 0,03205	0,57733 $\pm$ 0,03921
Ví dụ so sánh 1	0,28033 $\pm$ 0,01892	0,38967 $\pm$ 0,04119	0,44533 $\pm$ 0,8969	0,62867 $\pm$ 0,04027
Ví dụ so sánh 2	0,179 $\pm$ 0,02498	0,22327 $\pm$ 0,02839	0,23383 $\pm$ 0,04221	0,24183 $\pm$ 0,02811

Như đã thấy trong Bảng 6, so sánh với Ví dụ so sánh 2 bằng cách sử dụng PCL một mình, bộ khung của Ví dụ so sánh 1 và các Ví dụ 1 đến 3 bao gồm kính sinh học đã được thiêu kết có khả năng hấp thụ protein tăng theo thời gian. Đặc biệt, khả năng hấp thụ protein tăng khi lượng kính sinh học đã được thiêu kết tăng. Điều này được coi là do tương tác tĩnh điện không thể đảo ngược giữa nhóm amin của protein và thành phần kính sinh học đã được thiêu kết tích điện âm trong bộ khung.

(2) Hoạt tính tế bào trong bộ khung *in vitro*

Hiệu quả gieo tế bào

Bộ khung ($6 \times 6 \times 2 \text{ mm}^3$) của mỗi ví dụ trong các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2 được khử trùng bằng etanol 70% trong điều kiện ánh sáng tia cực tím. Mô tiên tạo cốt bào của chuột (MC3T3-E1) được gieo mầm với mật độ 1×10^5 tế bào/mL vào bộ khung, sau đó bộ khung được đặt trong đĩa 24 giếng chứa môi trường cần thiết tối thiểu α (Life Sciences, Mỹ) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (Gemini Bio-Products, Mỹ) và 1% chất kháng sinh (Antimycotic, Cellgro, Mỹ). Mẫu thử được nuôi cấy trong điều kiện CO_2 5% và 37°C , và môi trường được thay thế mỗi ngày.

Bảng 7

	Hiệu quả gieo tế bào (%)
Ví dụ so sánh 2	$36,97689 \pm 3,32317$
Ví dụ 1	$45,75389 \pm 2,59645$
Ví dụ 2	$57,15178 \pm 6,38773$
Ví dụ 3	$62,14866 \pm 5,10196$

Như đã thấy trong Bảng 7, hiệu quả gieo tế bào của bộ khung tăng khi lượng kính sinh học đã được thiêu kết tăng. Điều này được coi là do khả năng hấp thụ protein và đặc tính sinh hóa bằng cách làm tăng độ nhám bề mặt và tính kỵ nước của bộ khung nhờ kính sinh học đã được thiêu kết, đã chỉ ra rằng, tùy thuộc vào tỷ lệ thành phần của kính sinh học đã được thiêu kết/PCL, khả năng hấp thụ protein có thể được cải thiện và các hoạt tính tế bào khác nhau như sự kết dính tế bào ban đầu, sự sinh trưởng và sự biệt hóa, được tăng lên, do đó cho phép kiểm soát khả năng bám dính của tế bào.

Hiệu quả tăng sinh tế bào

Số lượng tế bào sống sót được xác định thông qua thử nghiệm tăng sinh tế bào (Thử nghiệm MTT) (Cell Proliferation Kit I, Boehringer Mannheim). Mẫu được bổ sung 0,5 mg/mL MTT và được nuôi cấy ở 37°C trong 4 giờ. Sau đó, độ hấp thụ được đo ở 570nm bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa (EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT).

Bảng 8

Độ hấp thụ (O.D.)	Sau 1 ngày	Sau 3 ngày	Sau 7 ngày
Ví dụ so sánh 2	$0,16675 \pm 0,00768$	$0,1845 \pm 0,0058$	$0,21375 \pm 0,01053$
Ví dụ 1	$0,19175 \pm 0,0075$	$0,21725 \pm 0,00806$	$0,25025 \pm 0,01415$
Ví dụ 2	$0,243 \pm 0,02574$	$0,26775 \pm 0,01276$	$0,334 \pm 0,02099$
Ví dụ 3	$0,265 \pm 0,03238$	$0,2885 \pm 0,02927$	$0,368 \pm 0,03735$

Như thấy rõ từ kết quả phân tích MTT được hiển thị trong Bảng 8, sự tăng sinh tế bào cũng tăng khi lượng kính sinh học đã được thiêu kết tăng, tương tự với hiệu quả gieo tế bào của Bảng 6. Qua đó, có thể kết luận được rằng trạng thái tăng sinh tế bào có thể được điều chỉnh tùy thuộc vào tỷ lệ thành phần của kính sinh học đã được thiêu kết/PCL.

F-Actin

Để phát hiện nhân tế bào, bộ khung được nhuộm huỳnh quang diamidino-2-phenylindol (DAPI, Invitrogen, Carlsbad, CA). Hơn nữa, để hiển thị khung tế bào actin, việc nhuộm Phalloidin (Alexa Fluor 594; Invitrogen, Carlsbad, CA) được thực hiện, và các tế bào đã được nhuộm màu được quan sát bằng cách sử dụng kính hiển vi đồng tiêu (LSM 700; Carl Zeiss, Đức).

Fig.7 thể hiện nhân tế bào đã được nhuộm màu xanh và F-actin màu đỏ 3 ngày sau khi nuôi cấy tế bào, và Bảng 9 dưới đây thể hiện tỷ lệ diện tích F-actin.

Bảng 9

	Tỷ lệ diện tích F-actin (%)
Ví dụ so sánh 2	$21,52767 \pm 2,47724$
Ví dụ 1	$30,97167 \pm 6,79412$
Ví dụ 2	$43,029 \pm 3,09069$
Ví dụ 3	$53,644 \pm 5,98447$

Như thấy rõ từ Fig.7 và Bảng 9, diện tích của F-actin tăng từ từ khi lượng kính sinh học đã được thiêu kết tăng.

(3) Đo mức biểu hiện gen

Để đo mức biểu hiện tương đối của Collagen loại I (Col-I), yếu tố phiên mã liên quan đến Runt (Runx2), phosphatase kiềm (ALP), osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), và protein hình thái xương 2 (BMP2), phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực của các tế bào MC3T3-E1 được nuôi cấy trong 7 ngày trong môi trường nuôi cấy được thực hiện.

ARN tổng được phân lập từ bộ khung đã được nuôi cấy bằng cách sử dụng chất phản ứng TRIzol (Sigma-Aldrich), và ADN bổ thể sau đó được tổng hợp từ đó. Để sao chép ngược, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo, Nhật) được sử dụng. Hơn thế nữa, ADN bổ thể được khuếch đại bằng cách sử dụng THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Nhật) và ABI StepOnePlus. Để khuếch đại ADN bổ thể, biến tính ở 95°C trong 1 phút được thực hiện, sau đó chu kỳ 15 giây ở 95°C, 60 giây ở 60°C, và 15 giây ở 72°C được lặp lại 40 lần và cuối cùng, ADN bổ thể được mở rộng ở 72°C trong 5 phút.

Các đoạn mồi đặc hiệu cho gen như sau: runx2 (xuôi chiều: 5'-ACATCCCCATCCATCCAT-3', ngược chiều: 5'-GGTGCTGGGTTCTGAATCTG-3'), OPN (xuôi chiều: 5'-GGAGGAAACCAGCCAAGG-3', ngược chiều: 5'-TGCCAGAATCAGTCACTTTCAC-3'), OCN (xuôi chiều: 5'-CCCTCCTGAAGGTCTCACAA-3', ngược chiều: 5'-GCTGTCTCCCTCATGTGTTG-3'), Col-I (xuôi chiều: 5'-ACTCAGCCGTCTGTGCCTCA-3', ngược chiều: 5'-GGAGGCCTCGGTGGACATTA-3'), ALP (xuôi chiều: 5'-GCCCAGTGCCTTCTGATTT-3', ngược chiều: 5'-GGGCAGCGTCAGATGTTAAT-3'), BMP2 (xuôi chiều: 5'-AGA TCT GTA CCG CAG GCACT-3', ngược chiều: 5'-GTTCTCCACGGCTTCTTC-3'), và gen giữ nhà của chuột GAPDH (xuôi chiều: 5'-CCTTGAGATCAACACGTACCAG-3', ngược chiều: 5'-CGCCTGTACACTCCACCAC-3').

Bảng 10

	Số	Mức biểu hiện tương đối
ALP/GAPDH	Ví dụ so sánh 2	$1 \pm 0,22087$
	Ví dụ 1	$1,33828 \pm 0,38901$
	Ví dụ 2	$2,77655 \pm 0,09479$
	Ví dụ 3	$3,58484 \pm 0,40055$
BMP-2/GAPDH	Ví dụ so sánh 2	$1 \pm 0,35537$
	Ví dụ 1	$2,9804 \pm 0,58307$
	Ví dụ 2	$4,81805 \pm 0,66508$
	Ví dụ 3	$6,10637 \pm 0,86176$
Col/GAPDH	Ví dụ so sánh 2	$1 \pm 0,06532$
	Ví dụ 1	$13,14175 \pm 0,60236$
	Ví dụ 2	$18,40076 \pm 0,88642$
	Ví dụ 3	$21,20035 \pm 1,86857$
OPN/GAPDH	Ví dụ so sánh 2	$1 \pm 0,04191$
	Ví dụ 1	$3,93551 \pm 0,31252$
	Ví dụ 2	$10,18773 \pm 0,5399$
	Ví dụ 3	$13,43262 \pm 3,01044$
RUNX-2/GAPDH	Ví dụ so sánh 2	$1 \pm 0,13509$
	Ví dụ 1	$18,59516 \pm 0,55741$
	Ví dụ 2	$40,86318 \pm 5,59465$
	Ví dụ 3	$48,70381 \pm 10,47568$
OCN/GAPDH	Ví dụ so sánh 2	$1 \pm 0,02964$
	Ví dụ 1	$1,27795 \pm 0,06102$
	Ví dụ 2	$2,40561 \pm 0,24953$
	Ví dụ 3	$3,0789 \pm 0,22572$

Như đã thấy trong Bảng 10, trong bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 và các Ví dụ so sánh 1 và 2, mức biểu hiện gen cũng tăng khi lượng kính sinh học đã được thiêu kết tăng. Do đó, có thể kết luận được rằng kính sinh học ảnh hưởng đến sự hình thành xương, sự biệt hóa và hoạt tính sinh học và cần kiểm soát tỷ lệ hàm lượng của kính sinh học đã được thiêu kết/PCL để đảm bảo mức biểu hiện gen cao.

Ví dụ thử nghiệm 7: Tỷ lệ thành phần tối ưu của kính sinh học đã được thiêu kết/PCL

Độ bền, hiệu quả gieo tế bào, tỷ lệ tăng sinh tế bào, và yếu tố phiên mã liên quan đến Runt của bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống được chế tạo trong các Ví dụ và các Ví dụ so sánh được đánh giá và vẽ đồ thị, và hình ảnh quang học tương ứng của chúng được thể hiện

Fig.8 thể hiện kết quả đánh giá toàn diện về bộ khung của Ví dụ so sánh 2 và các Ví dụ 1 đến 3. Như được thể hiện trên Fig.8, bộ khung của các Ví dụ 1 đến 3 chứa cả kính sinh học đã được thiêu kết và PCL có các đặc tính vượt trội so với bộ khung của Ví dụ so sánh 2. Đặc biệt, bộ khung của các Ví dụ 1 và 2, đặc biệt bộ khung của Ví dụ 2, có các kết quả mong muốn nhất trong đánh giá tổng thể.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Bộ khung dùng để cấy ghép từ đối tượng cho sống, được cấu trúc sao cho các thanh chống, được bố trí chồng lên nhau và giao nhau theo hướng thẳng đứng để tạo thành các lỗ trong đó, được xếp chồng lên nhau theo từng lớp,

trong đó thanh chống chứa 10 đến 70% khối lượng kính sinh học đã được thiêu kết và 30 đến 90% khối lượng polyme tương hợp sinh học,

trong đó thanh chống được cấu trúc để các hạt kính sinh học đã được thiêu kết được phân tán trong nền polyme tương hợp sinh học,

trong đó bộ khung được chế tạo bằng cách trộn kính sinh học đã được thiêu kết và polyme tương hợp sinh học và sau đó thực hiện đúc phun, và

trong đó bộ khung có độ bền nằm trong khoảng từ 50 kPa/mm³ đến 850 kPa/mm³ và độ cứng nằm trong khoảng từ 1,5 N/mm đến 20 N/mm.

2. Bộ khung theo điểm 1, trong đó các hạt kính sinh học đã được thiêu kết có kích thước hạt trung bình nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2,5μm.

3. Bộ khung theo điểm 1, trong đó thanh chống có đường kính nằm trong khoảng từ 300μm đến 500μm.

4. Bộ khung theo điểm 1, trong đó thanh chống có cấu trúc xếp chồng gồm hai hoặc nhiều hơn hai lớp.

5. Bộ khung theo điểm 1, trong đó thanh chống được cung cấp dưới dạng liên kết hoặc rời ra trong cùng một lớp và được tạo thành song song theo dạng đều đặn bao gồm dạng thẳng, dạng lượn sóng, dạng mạng tinh thể, hình chữ chi hoặc hình xoắn ốc, hoặc theo dạng không đều đặn.

6. Bộ khung theo điểm 1, trong đó thanh chống có góc định hướng trung bình nằm trong khoảng từ 30° đến 60° giữa các lớp.

7. Bộ khung theo điểm 1, trong đó bộ khung có phân bố kích thước lỗ hai một và độ xốp nằm

trong khoảng từ 30% đến 60%.

8. Bộ khung theo điểm 1, trong đó bộ khung có độ nhám (R_a) nằm trong khoảng từ 130nm đến 260nm và góc tiếp xúc nước là 75° hoặc nhỏ hơn sau 180 giây.

9. Bộ khung theo điểm 1, trong đó mức hấp thụ tăng sinh protein sau 24 giờ là 0,25 O.D. (mật độ quang học) hoặc cao hơn, hiệu quả gieo tế bào là 37% hoặc cao hơn, mức hấp thụ tăng sinh tế bào sau 7 ngày nuôi cấy là 0,22 O.D. hoặc cao hơn, và tỷ lệ diện tích F-actin là 22% hoặc cao hơn.

10. Bộ khung theo điểm 1, trong đó việc đúc phun được thực hiện bằng cách sử dụng máy in 3D thông qua quy trình mô hình hóa bằng phương pháp nóng chảy lắng đọng.

FIG.1

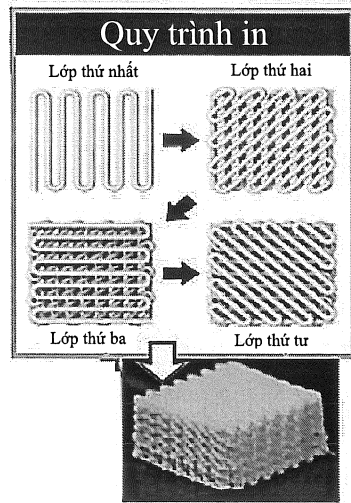


FIG.2

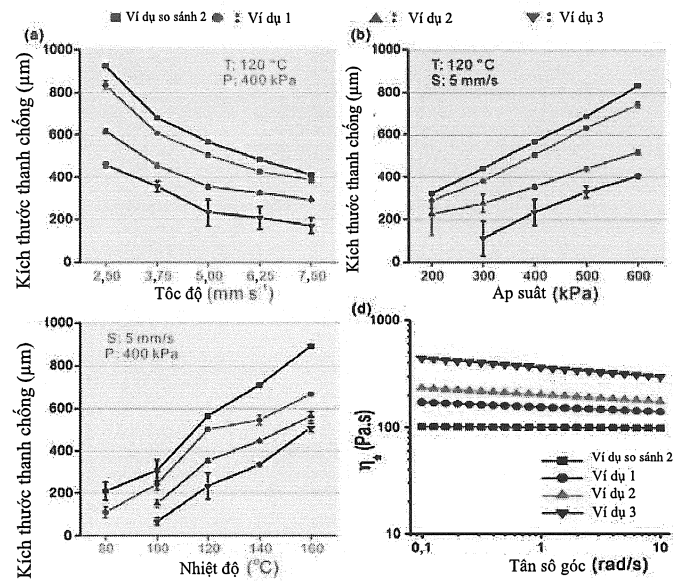


FIG. 3

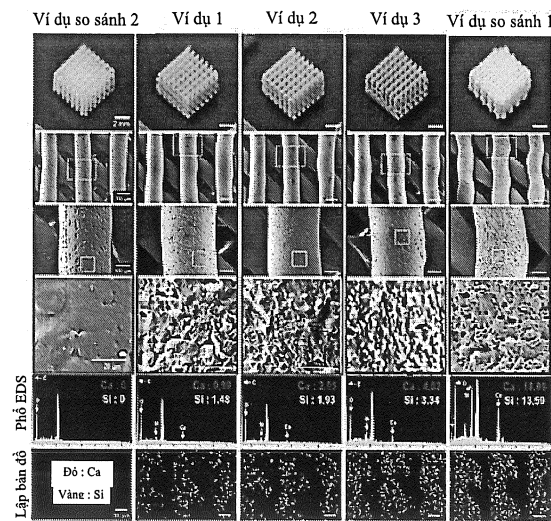


FIG. 4

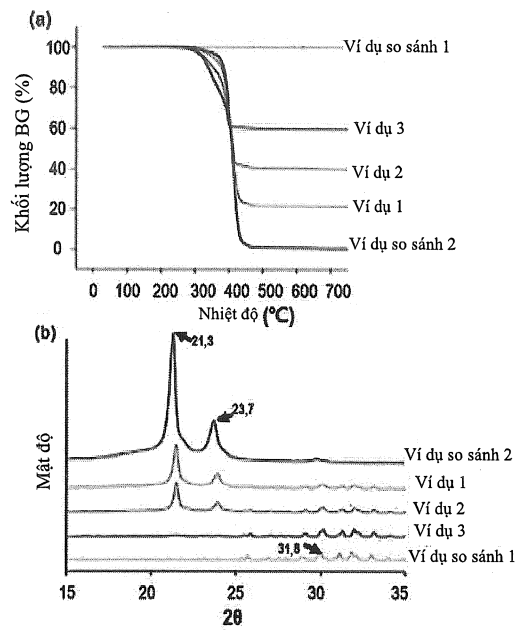


FIG. 5

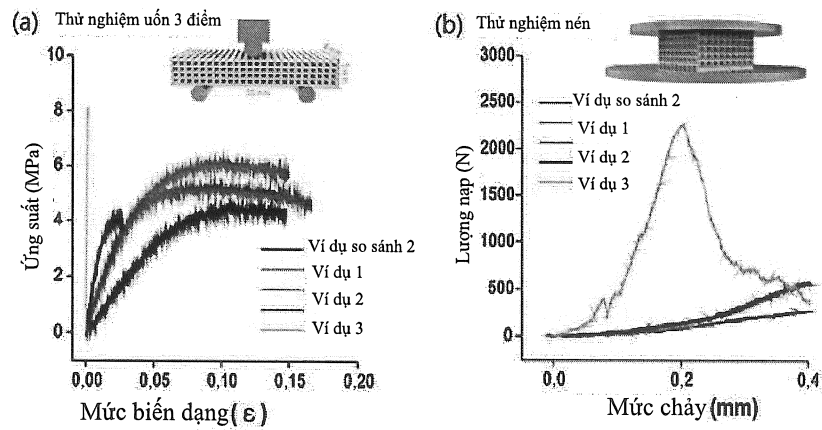


FIG. 6

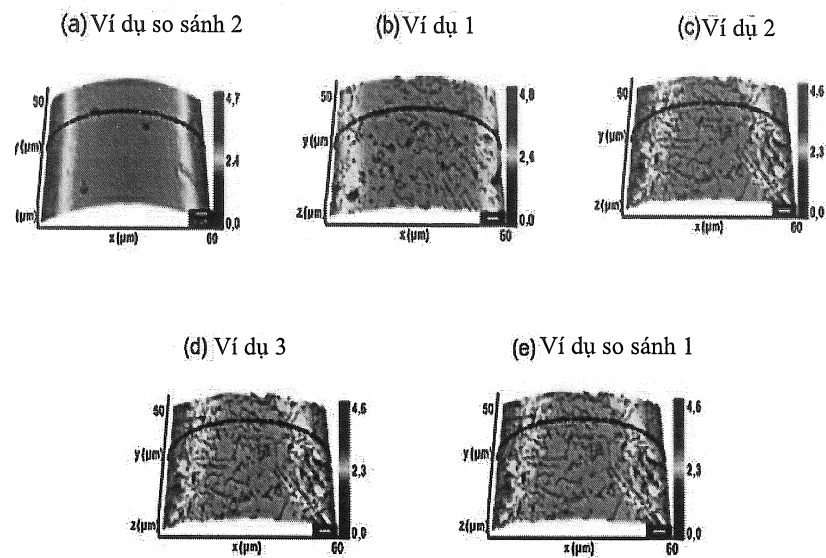


FIG. 7

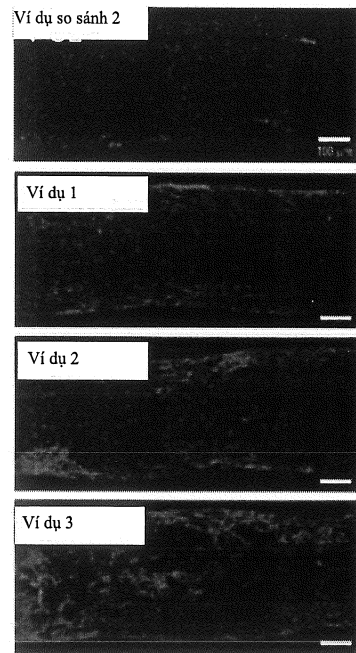


FIG. 8

