

Nghiên cứu khả năng tái tạo xương ổ răng bằng bột xương nhân tạo *in vivo*

Nguyễn Thị Thùy Dương¹, Lê Mỹ Hương¹, Nguyễn Mai Anh²,
Hoàng Minh Phương¹, Lê Văn Trí^{1,3}, Nguyễn Thanh Tùng^{4,5}

(1) Khoa Răng Hàm Mặt, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

(2) Khoa Kỹ thuật và Công nghệ, Đại học Huế

(3) Nha Khoa Cheese, thành phố Huế

(4) Khoa Cơ bản, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

(5) Viện Y sinh học, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Xương ổ răng có thể bị phá hủy bởi nhiều nguyên nhân như chấn thương, u và nang xương hàm, nhiễm trùng và mất răng, ảnh hưởng đến chức năng, thẩm mỹ, sự thoải mái và tự tin ở bệnh nhân. Nhằm tái tạo lại phần khuyết hổng xương ổ răng, bên cạnh xương tự thân, các loại vật liệu sinh học vô cơ và có tế bào đang được phát triển và ứng dụng rộng rãi trong đó có Biphasic Calcium Photphat (BCP). Do đó, việc nghiên cứu một mô hình khuyết hổng xương ổ răng trên động vật nhằm đánh giá quá trình tạo xương và tiềm năng của vật liệu trước khi ứng dụng trên lâm sàng là rất cần thiết. **Mục tiêu:** Đánh giá đặc điểm lành thương sau tái tạo khuyết hổng xương ổ răng và kết quả tái tạo khuyết hổng xương ổ răng bằng Xquang và phân tích mô học. Qua đó tạo ra một mô hình thử nghiệm đánh giá tiềm năng của các loại vật liệu trước khi ứng dụng trên lâm sàng. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu được thực hiện trên 18 con thỏ trắng, đực, thuần chủng, khỏe mạnh trọng lượng trọng lượng $2,5 \pm 0,2\text{kg}$, 8-10 tuần tuổi, được chia làm 2 nhóm: nhóm chứng, nhóm bột xương. Tiến hành tạo khuyết hổng xương ổ răng ở 2 nhóm sau đó thực hiện tái tạo ở nhóm bột xương (bằng bột xương nhân tạo BCP). Đánh giá đặc điểm lành thương ở 2 nhóm sau 1, 3, 5, 7, 14 ngày sau phẫu thuật và đánh giá tái tạo xương ổ răng bằng Xquang và phân tích mô học sau 2, 4, 6 tuần. **Kết quả:** Điểm lành thương ở mỗi nhóm tăng dần từ ngày 1 đến ngày 14, có ý nghĩa thống kê kể từ ngày 5. Điểm lành thương của nhóm bột xương cao hơn nhóm chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Điểm Xquang ở mỗi nhóm tăng dần từ tuần 2 đến tuần 6, có ý nghĩa thống kê ở tuần thứ 6 ($p<0,05$). Điểm Xquang của nhóm bột xương cao hơn nhóm chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Mô liên kết mới hình thành nhóm chứng đạt cao nhất ở 4 tuần và giảm sau 6 tuần ($p<0,05$). Tuy nhiên, nhóm bột xương đạt lượng mô liên kết mới cao nhất ở 2 tuần và giảm dần sau 4 tuần và 6 tuần. ($p<0,05$). Lượng xương mới hình thành ở mỗi nhóm tăng có ý nghĩa thống kê từ 2 tuần đến 6 tuần. Lượng xương mới hình thành ở nhóm bột xương cao hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). **Kết luận:** Mô hình trên cho phép chúng ta đánh giá khả năng tái tạo xương của các vật liệu khác nhau. Đồng thời, bột xương nhân tạo BCP là một vật liệu tiềm năng để tái tạo những khuyết hổng xương ổ răng trên lâm sàng.

Từ khóa: Xương ổ răng, biphasic calcium phosphate, thỏ, tái tạo xương.

Abstract

In vivo evaluation of the ability of biphasic calcium phosphate in alveolar bone regeneration

Nguyen Thi Thuy Duong¹, Le My Huong¹, Nguyen Mai Anh², Hoang Minh Phuong¹, Le Van Tri^{1,3}, Nguyen Thanh Tung^{4,5}

(1) Odonto-stomatology Faculty, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) School of Engineering and Technology, Hue University

(3) Cheese Dental clinic, Hue city

(4) Faculty of Basic Science, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(5) Institute of Biomedicine, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Background: The alveolar bone can be damaged by a variety of causes such as trauma, bone tumors and cysts, infection and tooth loss, affecting function, aesthetics, comfort and confidence of the patient. In order to reconstruct the alveolar bone defect, besides autologous bone, cellular and inorganic biological materials

are being developed and widely applied including Biphasic Calcium Phosphate (BCP). Therefore, it is very essential to establish an animal model of alveolar bone defect to evaluate the progress of bone formation and the potential of materials before clinical application. **Materials and Methods:** The study was performed on 18 white, male, healthy rabbits weighing 2.5 ± 0.2 kg, 8-to-10-week aged, divided into 2 groups: group 1 (control), group 2 (BCP). The alveolar bone defect formation was performed in 2 groups, then reconstructed with BCP (group 2). Evaluation of soft tissue healing characteristics in 2 groups after 1, 3, 5, 7, 14 days after surgery and assessment of alveolar bone regeneration by X-ray and histological analysis after 2, 4, 6 weeks. **Results:** Healing score in each group increased gradually from day 1 to day 14, having statistical significance from day 5. Healing score of 2 groups tended to increase gradually in order: control group < BCP group ($p > 0.05$). X-ray scores in each group increased from week 2 to week 6, with statistical significance at week 6 ($p < 0.05$). X-ray scores of 2 groups tended to increase in order: the control group < BCP group ($p > 0.05$). New connective tissue formed in the control group reached the highest at week 4 and decreased after week 6 ($p < 0.05$). However, BCP group achieved the highest amount of newly formed connective tissue at week 2 and decreased gradually after week 4 and week 6 ($p < 0.05$). New bone formation in each group increased statistically from week 2 to week 6. The amount of newly formed bone in BCP group was significantly higher than in control group ($p < 0.05$). **Conclusions:** The above established model allows us to evaluate the capability of the bone regeneration of various materials. In addition, BCP is a potential material which can be used to reconstruct alveolar bone defects in patients.

Keywords: Alveolar bone, biphasic calcium phosphate, rabbits, bone regeneration

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xương ổ răng là một phần của xương hàm trên và xương hàm dưới, đóng vai trò bao quanh và nâng đỡ răng. Trong một số trường hợp, xương ổ răng có thể bị phá hủy bởi nhiều nguyên nhân như chấn thương, các loại u và nang xương hàm, nhiễm trùng và mất răng [1]. Viêm nha chu cũng là một nguyên nhân gây nên sự tiêu xương, hình thành khuyết hổng xương ổ răng [2]. Những thay đổi về hình thái và cấu trúc của xương ổ răng không chỉ ảnh hưởng đến chức năng ăn nhai mà còn gây ra các vấn đề về thẩm mỹ, sự thoải mái và tự tin ở bệnh nhân, dẫn đến nhu cầu điều trị tái tạo lại các khuyết hổng xương ổ răng cho bệnh nhân. Trong điều trị phục hình răng mất, tái tạo hình thái xương ở phần sống hàm còn có ý nghĩa trong việc tạo được sự vững ổn của phục hình, đáp ứng nhu cầu thẩm mỹ và chức năng của bệnh nhân [3].

Nhằm tái tạo lại phần khuyết hổng xương, xương tự thân được xem là vật liệu tối ưu nhất được sử dụng bởi những ưu điểm nổi bật như dễ lấy, ít tổn kém, lượng xương thu được nhiều và có thể tiến hành phẫu thuật ghép xương cùng lúc [4]. Tuy nhiên, việc lấy xương tự thân lại để lại những hậu quả nặng nề cho bệnh nhân như hậu phẫu kéo dài ở vùng lấy xương, nhiễm trùng, chảy máu, tổn thương thần kinh [4]. Do đó, một số loại bột xương nhân tạo có những đặc tính sinh học tốt đã ra đời như Hydroxyapatite hay Beta-Tricalcium Phosphate [5]. Biphasic Calcium Phosphate là hỗn hợp giữa Hydroxyapatite và Beta-Tricalcium Phosphate.

Để thực hiện các nghiên cứu thử nghiệm vật liệu, đánh giá hiệu quả việc tạo xương và khả năng lành

thương của các kỹ thuật ghép xương trước khi ứng dụng trên lâm sàng, việc sử dụng các mô hình sinh học là rất cần thiết. Mô hình động vật với khuyết hổng xương ổ răng được xem là phù hợp để làm mô hình thử nghiệm cho nghiên cứu đánh giá khả năng tái tạo xương ổ răng [6]. Chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm thiết lập mô hình động vật đánh giá khả năng tái tạo xương ổ răng của bột xương nhân tạo thông qua đánh giá lành thương sau phẫu thuật và đánh giá kết quả tái tạo xương ổ răng bằng Xquang và phân tích mô học.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 18 con thỏ trắng đực, thuần chủng, khỏe mạnh, trọng lượng $2,5 \pm 0,2$ kg, 8-10 tuần tuổi, được chia làm 2 nhóm. Nhóm chứng ($n=9$), thỏ được tạo khuyết hổng xương ổ răng, để lành thương tự nhiên, không sử dụng bột xương. Nhóm bột xương ($n=9$), thỏ được tạo khuyết hổng xương ổ răng và được tái tạo bằng bột xương nhân tạo ngay liền sau phẫu thuật tạo khuyết hổng. Bột xương nhân tạo được cung cấp bởi Giáo Sư Bae Tae Sung, Phòng thí nghiệm Khoa học vật liệu, Trường Đại học Nha, Đại học Quốc gia Jeonbuk.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tạo khuyết hổng xương ổ răng

Phương pháp tạo khuyết hổng xương ổ răng trên thỏ thực hiện dựa theo phương pháp của Kamal và cộng sự, có biến đổi [7]. Thỏ được gây mê 30 phút trước khi phẫu thuật với xylazine HCl 5mg/kg và ketamine HCl 35mg/kg tiêm tĩnh mạch. Thỏ

được phẫu thuật ở tư thế nằm ngửa, trong điều kiện vô khuẩn trong thời gian 15 phút. Rạch một đường trên niêm mạc miệng khoảng 2cm, từ phía xa của răng cửa giữa hàm trên trái và đi theo đường cong của răng, mở rộng đến góc xa ngoài của răng cửa giữa trên trái, sau đó mở rộng đến viền nướu ở mặt ngoài và gai nướu ở đường giữa. Dùng tay khoan chậm với tốc độ 1000-1500 vòng/phút, mũi khoan kim cương tròn tạo cửa sổ xương ở phía bên xa dọc theo răng cửa giữa hàm trên bên trái về phía thành xa bằng kèm và lấy răng ra. Điều chỉnh khuyết hổng xương ổ răng đặt kích thước: 2mm x 1mm x 3mm (cao x rộng x sâu). Sau khi tạo khuyết hổng xương ổ răng, 9 con thỏ nhóm 1 không được tái tạo bằng các vật liệu ghép xương, vùng khuyết hổng được khâu đóng niêm mạc. Ở nhóm bột xương, bột xương nhân tạo được đặt từ từ vào khuyết hổng đến khi lấp đầy khuyết hổng, sau đó khâu đóng niêm mạc.

2.2.2. Phương pháp đánh giá lành thương sau phẫu thuật

Đánh giá khả năng lành thương của thỏ sau phẫu thuật 1 ngày (D1), 3 ngày (D3), 5 ngày (D5), 7 ngày (D7) và 14 ngày (D14). Chỉ số lành thương được Landry, Turnbull và Howley đề xuất để mô tả tiến trình lành thương trên lâm sàng sau phẫu thuật nha chu với 5 mức độ (1: Rất kém, 2: Kém, 3: Trung bình, 4: Tốt, 5: Rất tốt) và 5 tiêu chí: màu sắc của mô, tình trạng chảy máu khi sờ, mô hạt và mép vết thương và sự nung mủ [8]. Khi không có sự đồng nhất về các tiêu chí trong cùng một mức độ đánh giá, chọn mức độ đánh giá có chỉ số thấp hơn. Vùng đánh giá là vùng nướu phủ lên khuyết hổng có kích thước 3x2x4 mm.

2.2.3. Đánh giá kết quả tái tạo khuyết hổng xương ổ răng bằng Xquang

Sau 2, 4 và 6 tuần, 3 con thỏ của mỗi nhóm được gây chết bằng cách tiêm không khí vào tĩnh mạch tai. Dùng đĩa cắt kim cương và tay khoan chậm thu phần xương hàm trên của thỏ và chụp Xquang. Phim Xquang gốc răng được đặt tại vị trí mặt bên của khuyết hổng xương ổ răng đã phẫu thuật và ghi hình với dòng điện 65 kvp, 7.5 mA trong 0.25 giây. Chỉ số đánh giá độ cản quang của xương dựa theo nghiên cứu của Miloro và cộng sự [9]. Điểm 1 không có xương hình thành ở khuyết hổng. Điểm 2: độ cản quang thấp hơn xương xốp kế cận. Điểm 3: độ cản quang lớn hơn hoặc bằng xương xốp kế cận, nhưng thấp hơn xương vỏ. Điểm 4: độ cản quang lớn hơn hoặc bằng xương vỏ kế cận.

2.2.4. Phân tích mô học kết quả tái tạo khuyết hổng xương ổ răng

Đánh giá sự hình thành xương và mô liên kết

thành trong khuyết hổng xương ổ răng thông qua hình ảnh mô học theo nghiên cứu của Zhihua và cộng sự [10]. Block mô kích thước 1,5 cm x 1,5 cm x 3 cm có chứa vùng khuyết hổng xương ổ răng được cố định bằng cách ngâm trong dung dịch Paraformaldehyde 10% trong 24 giờ. Sau đó, mẫu mô học được khử khoáng trong 8 tuần, đúc paraffin, cắt lát mô học với độ dày 5µm ở vị trí chính giữa khuyết hổng xương ổ răng, tạo thành 3 tiêu bản và nhuộm Hematoxylin và Eosin (H&E) theo hướng dẫn quy trình kỹ thuật giải phẫu bệnh-tế bào học của Bộ Y tế (2013). Hình ảnh mô học được quan sát bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100x. Xương mới hình thành (XMHT) và mô liên kết mới hình thành (MLKMT) trên 3 tiêu bản/con thỏ được đánh giá cho điểm theo tỷ lệ mô mới hình thành, sau đó được lấy trung bình. Mỗi tiêu bản được đánh giá theo thang điểm từ 0-10.

2.3. Xử lý số liệu

Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm IBM SPSS statistics 20. Sử dụng kiểm định phi tham số (nonparametric test) – kiểm định Mann – Whitney để kiểm định các giả thiết về 2 mẫu độc lập không có phân phối chuẩn. Mức độ ý nghĩa thống kê được xác định khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đánh giá đặc điểm lành thương sau tái tạo khuyết hổng xương ổ răng

Kết quả đánh giá đặc điểm lành thương sau phẫu thuật được trình bày ở Hình 1. Kết quả cho thấy, trung bình điểm lành thương tăng dần theo ngày, từ ngày 1 đến ngày 14 sau phẫu thuật. Trung bình điểm lành thương giữa ngày 1 với ngày 5, 7, 14 có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở cả 2 nhóm thí nghiệm (Hình 1a,b).

Có sự khác biệt không lớn trong phân bố điểm lành thương ở hai nhóm thí nghiệm, ngày 1 và ngày 3 có điểm lành thương chủ yếu phân bố ở điểm 1 và điểm 2. Ngày 5, phân bố điểm lành thương gồm điểm 2 và điểm 3. Ngày 7, phân bố điểm lành thương chủ yếu ở điểm 3 và điểm 4, điểm 2 chiếm tỷ lệ thấp. Ở ngày 14, sự phân bố điểm chủ yếu là điểm 4 và điểm 5 (Hình 1c,d).

Nhìn chung, tại từng thời điểm đánh giá, điểm lành thương giữa 2 nhóm thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2. Đánh giá kết quả tái tạo khuyết hổng xương ổ răng bằng Xquang

Chúng tôi tiến hành đánh giá quá trình tái tạo khuyết hổng bằng Xquang. Kết quả trình bày ở Hình 2 cho thấy xương hình thành ở vùng khuyết hổng của tăng dần theo thời gian. Ở cả hai nhóm thí

nghiêm, đậm độ cản quang ở thời điểm 6 tuần lớn hơn 2 tuần có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (Hình 2a,b).

Về phân bố điểm Xquang, vào thời điểm 2 tuần, 100% số thỏ ở cả 2 nhóm đều có điểm là 1 (không có xương mới hình thành). Bốn tuần sau phẫu thuật, điểm Xquang chủ yếu là 1 và 2 trong đó nhóm bột xương có tỷ lệ điểm 2 cao hơn. Điều này cho thấy sau 4 tuần, xương mới hình thành nhưng đậm độ thấp hơn đậm độ cản quang của xương xốp lân cận. Ở thời điểm 6 tuần sau phẫu thuật, điểm Xquang chủ yếu là 2 và 3. Trong đó nhóm bột xương có tỷ lệ điểm 3 cao hơn. Điều này cho thấy sau 6 tuần có xương mới hình thành với đậm độ cao hơn đậm độ cản quang của xương xốp nhưng thấp hơn xương đặc kề cận (Hình 2c,d).

Nhìn chung, tại từng thời điểm đánh giá, điểm Xquang nhóm bột xương cao hơn nhóm đối chứng. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Hình 2e).

3.3. Đánh giá quá trình hình thành mô liên kết

Sau phẫu thuật tạo khuyết hổng, mô liên kết hình thành lấp vào vị trí khuyết hổng. Kết quả phân tích quá trình hình thành mô liên kết được trình bày ở Hình 3. Ở nhóm chứng, sau hai tuần nhổ răng và lấy đi một lượng xương ổ răng nhất định, một lượng lớn mạch máu xâm nhập vào bên trong khuyết hổng với ít mô liên kết được hình thành. Sau 4 tuần mô liên kết hình thành đạt cực đại và giảm sau 6 tuần (Hình 3a,c). Trong khi đó nhóm bột xương hình thành mô liên kết cực đại sau 2 tuần và giảm dần sau 4 và 6 tuần (Hình 3b,d). Kết quả so sánh mô liên kết mới hình thành giữa 2 nhóm được trình bày ở Hình 3e. Kết quả cho thấy sau 2 tuần mô liên kết mới hình thành ở nhóm bột xương cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, ở thời điểm 4 tuần, mô liên kết mới hình thành ở nhóm chứng cao hơn nhóm bột xương. Sau 6 tuần, mô liên kết mới hình thành giảm và không có khác biệt thống kê giữa 2 nhóm (Hình 3e).

3.4. Đánh giá quá trình hình thành mô xương

Kết quả đánh giá quá trình hình thành mô xương mới ở vị trí khuyết hổng được trình bày ở Hình 4. Nhìn chung, xương mới hình thành tăng dần từ 2 tuần đến 6 tuần sau phẫu thuật. Ở thời điểm 6 tuần, lượng xương mới hình thành đạt cực đại có ý nghĩa thống kê so với 2 tuần và 4 tuần (Hình 4a, b). Điểm đánh giá xương mới hình thành sau 6 tuần ở nhóm chứng chủ yếu là 0-2 điểm. Trong khi đó ở nhóm bột xương là 3-4 điểm (Hình 4c, d). Lượng xương mới hình thành sau 4 tuần ở nhóm bột xương có xu hướng cao hơn nhóm chứng nhưng không có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó sau 6 tuần, lượng xương mới hình thành ở nhóm bột xương cao hơn nhóm đối chứng có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$) (Hình 4e).

4. BÀN LUẬN

4.1. Mô hình tái tạo khuyết hổng xương ổ răng

Với mục tiêu nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng tái tạo xương ổ răng của các vật liệu được sử dụng, chúng tôi tiến hành tạo khuyết hổng xương ổ răng ở thỏ bằng cách loại bỏ phần xương ổ răng ở phía xa của răng cửa giữa hàm trên và nhổ răng này, sau đó tiến hành ghép các vật liệu tái tạo cùng lúc. Các mô hình nghiên cứu tương tự như của Sawada và cộng sự, Puumanen và cộng sự, Pilanci và cộng sự cũng tạo ra một khuyết hổng xương ổ răng, đồng thời tái tạo bằng các vật liệu sinh học cùng lúc [11].

Ngày nay, xương tự thân vẫn được xem là lựa chọn tối ưu nhất trong tái tạo mô, tuy nhiên lượng xương cung cấp có giới hạn và thời gian hậu phẫu dài, đau đớn, nhiễm trùng vết mổ đã khiến các nhà lâm sàng cân nhắc đến một lựa chọn khác thay thế: xương nhân tạo. Các chế phẩm có thành phần chính là canxi và photphat có cấu trúc tương tự khoáng xương được yêu thích sử dụng, trong đó có Biphasic Calcium Phosphate (BCP) được chúng tôi lựa chọn. Biphasic calcium phosphate là hỗn hợp của HA – một hợp chất bền vững và β -TCP, một hợp chất dễ tan, sự kết hợp này giúp gia tăng hoạt tính sinh học và khả năng dẫn tạo xương. Hỗn hợp này thúc đẩy sự biệt hóa các tế bào gốc, gia tăng sự kết dính tế bào và các yếu tố tăng trưởng. Gnaahati và cộng sự đã chỉ ra rằng sử dụng BCP cho phép các mô liên kết và tế bào không lờ đa nhân xâm nhập vào vùng ghép và sự tăng sinh mạch máu nhanh hơn, thời gian phân rã chậm hơn so với chỉ sử dụng đơn thuần HA [12]. Các nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng BCP bao gồm HA và β -TCP vượt trội hơn so với HA đơn thuần trong sự hình thành xương mới. Mặc dù sự tăng sinh tế bào cao với cả hai vật liệu, nhưng sự gia tăng nồng độ phosphatase kiềm ở BCP vẫn lớn hơn [13].

Ở nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng BCP với tỉ lệ HA: β -TCP là 3:2 (60%-40%). Puttini và cộng sự (2019) cũng sử dụng BCP với tỉ lệ HA: β -TCP là 3:2 khi đánh giá hiệu quả tái tạo xương của vật liệu này đối với khuyết hổng vòm sọ ở chuột và nhận thấy khả năng tái tạo xương đáng kể ở nhóm thử nghiệm so với nhóm chứng [14]. Trong khi đó, kết quả từ việc đánh giá tỷ lệ HA: β -TCP trong tái tạo khuyết hổng do nha chu ở chó cho thấy rằng độ sâu túi thấp hơn ở nhóm sử dụng BCP có tỷ lệ HA cao hơn. Sau 6 tháng, tỷ lệ xương mới hình thành cao hơn đáng kể quan sát ở nhóm có tỉ lệ HA: β -TCP là 65:35 và 85:15 so với nhóm có tỉ lệ HA: β -TCP là 50:50 100:0 và 0:100 [15].

Các vi hạt giải phóng từ BCP có thể bị thực bào bởi các đại thực bào đơn bào, gây ra một phản ứng viêm đặc trưng bởi sự tiết ra các cytokine gây viêm. Trong số đó, yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) đóng một

vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy quá trình tái tạo xương thông qua sự thúc đẩy các nguyên bào xương [16]. Ở nghiên cứu hiện tại, chúng tôi sử dụng BCP với kích thước hạt là 300µm, với mục đích tái tạo khuyết hổng xương ổ răng. Theo Malard và cộng sự, kích thước hạt 200-400 µm giúp xương phát triển nhiều hơn, thông qua cơ chế tập trung tế bào tạo xương và nâng đỡ cơ học [17]. Ngoài ra, kích thước hạt cao hơn 300µm giúp tăng khả năng tăng sinh mạch máu và khả năng di chuyển, kết dính và tăng sinh của tế bào [18].

4.2. Đánh giá lành thương sau phẫu thuật

Trong nghiên cứu của chúng tôi, lành thương sau phẫu thuật loại bỏ xương ổ răng và nhổ răng được xem là lành thương thứ phát [19]. Dấu hiện sưng ở mô mềm thường diễn ra vào ngày thứ 2, mức độ sưng sẽ phụ thuộc vào mức độ can thiệp và thời gian phẫu thuật, mức độ sưng sẽ giảm dần sau ngày thứ 3 và thứ 4, do đó thể quan sát thấy các dấu hiệu sưng nhẹ, màu sắc nướu đỏ [20]. Một số chỗ ở ngày 1, 3 có hở miệng vết thương dọc chiều dài các mũi khâu do mũi khâu bị lỏng hoặc bị đứt, có thể do mép vết thương quá căng hoặc độ dày chỉ quá dày (< 4-0) [21]. Dịch rỉ viêm xuất hiện sớm đôi khi không phải là một dấu hiệu xấu của quá trình lành thương, mà là một hiện tượng sinh lý giúp vận chuyển các tế bào tái tạo mô, cung cấp dinh dưỡng cho sự chuyển hóa tế bào và khuếch tán các yếu tố miễn dịch và tăng trưởng [19]. Nhìn chung, cả 2 nhóm nghiên cứu đều cho thấy kết quả sự lành thương tăng dần theo thời gian, không có các biến chứng nhiễm trùng tại chỗ hay triệu chứng toàn thân trên động vật. Điều này cho thấy phương pháp thực hiện mô hình khuyết hổng xương và các loại vật liệu ghép xương dùng trong nghiên cứu không gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe của đối tượng nghiên cứu.

4.3. Đánh giá khả năng tái tạo xương bằng Xquang

Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá khả năng tái tạo xương ổ răng bằng phim Xquang gốc răng tại vị trí khuyết hổng ở 3 thời điểm: 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần sau phẫu thuật dựa trên thang điểm đánh giá đậm độ xương của Miloro và cộng sự [9]. Thang điểm đánh giá gồm 4 điểm 1-2-3-4 tương ứng với 4 mức độ cản quang của xương: chưa có xương mới hình thành – đậm độ cản quang của xương mới hình thành thấp hơn đậm độ cản quang của xương xốp kế cận – đậm độ cản quang của xương mới hình thành bằng hoặc cao hơn đậm độ cản quang của xương xốp kế cận nhưng thấp hơn xương đặc kế cận – đậm độ cản quang của xương mới hình thành bằng hoặc cao hơn đậm độ cản quang của xương đặc kế cận. Nhìn chung, cả 2 nhóm nghiên cứu đều cho thấy kết quả sự hình thành xương trên X quang tăng dần

theo thời gian. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Nguyen và cộng sự (2017) đã nghiên cứu hiệu quả của bột xương BCP kết hợp màng titan trong tái tạo khuyết hổng xương chậu ở thỏ và nhận thấy khả năng tái tạo xương tăng rõ rệt sau 6-8 tuần [22]. Ở nghiên cứu của Abdullah và cộng sự (2016) khi đánh giá hiệu quả của màng PRF và bột xương β -TCP trong tái tạo xương vòm sọ ở thỏ, lượng xương mới hình thành quan sát được trên micro-CT ở nhóm sử dụng màng PRF và bột xương β -TCP cao hơn nhóm chứng và nhóm chỉ sử dụng màng PRF [23]. Acar và cộng sự (2014) cũng sử dụng micro-CT để đánh giá khả năng tái tạo xương ở khuyết hổng vòm sọ thỏ, kết quả cho thấy khả năng tái tạo xương ở nhóm ghép BCP và màng PRF cao hơn các nhóm chỉ ghép 1 trong 2 loại vật liệu [24]. Hirata và cộng sự (2006) cũng nghiên cứu hiệu quả của β -TCP sau phẫu thuật cắt bỏ các khối u xương lớn. Các tác giả cũng chỉ ra khả năng tích hợp xương của β -TCP vào xương cơ thể ghép và vỏ xương bị tiêu hủy bởi khối u cũng được phục hồi nguyên vẹn trên phim X quang [25].

Ở nghiên cứu của chúng tôi, nhóm bột xương cho kết quả đánh giá cao hơn nhóm chứng nhưng sự khác biệt chưa đủ để có tính thống kê. Nguyên nhân có thể do chúng tôi chỉ sử dụng phim Xquang gốc răng 2 chiều để khảo sát đậm độ cản quang của xương mới, nên không khảo sát được lượng xương mới tạo thành theo không gian 3 chiều như các nghiên cứu sử dụng micro-CT. Mặc dù vậy, kết quả Xquang cũng cho phép chúng tôi có một cái nhìn 2 chiều về khả năng tái tạo xương bên trong khuyết hổng. Do đó, chúng tôi thực hiện đồng thời phân tích mô học để bổ trợ và làm sáng tỏ hơn về các thành phần bên trong khuyết hổng qua từng thời điểm.

4.4. Đánh giá tái tạo khuyết hổng xương ổ răng bằng phân tích mô học

Chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng tái tạo khuyết hổng xương ổ răng bằng phân tích mô học dựa trên % xương mới hình thành (XMHT) và mô liên kết mới hình thành (MLKMHT). Tỷ lệ % xương và % mô liên kết được đánh giá bởi người đọc tiêu bản. Mỗi tiêu bản được đánh giá theo thang điểm từ 0-10 dựa trên nghiên cứu của Zhihua và cộng sự [10].

Đối với nhóm bột xương, vào thời điểm 2 tuần, mô liên kết bắt đầu tăng sinh ở trong khuyết hổng. Sau 4 tuần, những tế bào xương mới đã bắt đầu hình thành bên trong mô liên kết đồng thời lượng mô liên kết giảm đi. 6 tuần sau phẫu thuật, xương mới hình thành thay thế gần như toàn bộ phần mô liên kết. Lượng mô liên kết mới hình thành giảm dần theo thứ tự: 2 tuần > 4 tuần > 6 tuần, sự khác biệt

này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Ở thời điểm 2 tuần, số lượng tiêu bản có mô liên kết chiếm 70-80% diện tích khuyết hổng (66,7%), phần thiếu số còn lại là những tiêu bản có lượng mô liên kết mới hình thành chiếm > 90% diện tích khuyết hổng (22,2%) và tiêu bản có lượng mô liên kết chiếm 50-60% diện tích khuyết hổng (11,1%). Ở thời điểm 4 tuần, 55,6% tiêu bản có lượng mô liên kết chiếm 50-60% diện tích khuyết hổng, 44,4% còn lại có lượng mô liên kết chiếm 30-40% diện tích khuyết hổng. Vào thời điểm 6 tuần, hơn 1/2 số lượng tiêu bản có lượng mô liên kết mới hình thành chiếm 30-40% khuyết hổng, 1/3 số tiêu bản có lượng mô liên kết thấp hơn (< 20% diện tích khuyết hổng), và phần còn lại có lượng mô liên kết chiếm 50-60% diện tích khuyết hổng. Lượng xương mới hình thành tăng dần theo thời gian. Sự khác biệt về xương mới hình thành giữa thời điểm 6 tuần với 2 tuần và 4 tuần khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Về phân bố điểm mô học, ở thời điểm 2 tuần và 4 tuần, toàn bộ tiêu bản ghi nhận lượng xương mới hình thành < 20% diện tích khuyết hổng. Tại thời điểm 6 tuần, đã có đến 66,7% tiêu bản ghi nhận lượng xương mới hình thành chiếm 30-40% diện tích khuyết hổng. Nhìn chung, kết quả phân tích mô học cả 2 nhóm nghiên cứu đều cho thấy kết quả sự hình thành xương tăng và sự hình thành mô liên kết giảm dần theo thời gian. Tại các thời điểm đánh giá 2, 4, và 6 tuần, lượng xương mới hình thành nhóm bột xương cao hơn nhóm chứng có ý nghĩa thống kê.

Kết quả của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Acar và cộng sự (2015) khi đánh giá kết quả mô học giữa nhóm chứng, nhóm tái tạo khuyết hổng bằng màng PRF, β -TCP hoặc kết hợp cả 2 giữa 2 thời điểm 4 tuần và 8 tuần. Kết quả mô học cho thấy lượng xương mới hình thành ở nhóm sử dụng màng PRF và β -TCP là lớn nhất, cao hơn 2 nhóm chỉ ghép 1 trong 2 loại vật liệu và nhóm chứng [24]. Yilmaz và cộng sự (2014) cũng nhận thấy lượng xương mới hình thành quan sát được trên tiêu bản mô học ở nhóm PRF kết hợp β -TCP cao hơn nhóm PRF và nhóm chứng khi tái tạo khuyết hổng xương ở lợn [26]. Yamauchi và cộng sự (2006) đánh giá hiệu quả của khối β -TCP trong tái tạo khuyết hổng xương hàm dưới ở chó và nhận thấy có xương mới hình thành ở giữa khối β -TCP và xương hàm dưới [27]. Nghiên cứu của Kim và cộng sự (2012) về tái tạo khuyết hổng ở thành xoang trước hàm trên giữa 2 nhóm: nhóm sử dụng β -TCP phủ rhBMP-2 và nhóm sử dụng β -TCP và màng PRF cũng cho thấy khả năng tái tạo xương ở cả 2 nhóm, riêng nhóm sử dụng β -TCP và màng PRF có lượng xương mới hình thành nhiều hơn trên phân tích mô học [28].

Quá trình tích hợp vật liệu ghép vào vị trí nhận gồm 4 quá trình: viêm, tái tạo mạch máu, tăng sinh và tái cấu trúc. Khả năng tái tạo xương của vật liệu phụ thuộc vào 3 yếu tố: các tế bào gốc trung mô có khả năng biệt hóa thành tạo cốt bào, các yếu tố tăng trưởng và khung sườn giúp kết dính các yếu tố tăng trưởng, tạo điều kiện cho tế bào tăng sinh và biệt hóa [18].

Về cơ chế hình thành xương mới của BCP, khi BCP được ghép vào khuyết hổng, sự trao đổi ion giữa cơ thể và vật liệu dẫn tới hình thành một lớp khoáng hóa bề mặt giữa xương và vật liệu, tạo nên sự kết dính tốt hơn. Ngoài ra, thông qua quá trình hòa tan – lắng đọng, sự phát triển của lớp khoáng chất giống xương có thể bắt đầu quá trình hình thành xương bằng cách bắt chước cấu trúc khoáng xương hoặc bằng sự hiện diện của các hợp chất tạo xương như BMP có trong các dịch tự nhiên của cơ thể [29].

Mạch máu có vai trò quan trọng đối với sự phát triển của xương. Mạch cung cấp oxy, chất dinh dưỡng và các yếu tố điều tiết cho các mô, cũng như loại bỏ các chất thải trong quá trình trao đổi chất như carbon dioxide và axit [30]. Vào thời điểm 2 tuần đầu tiên, hầu hết các tiêu bản đều bắt đầu xuất hiện các mạch máu, là cơ sở cho sự hình thành xương về sau. Trong quá trình lành thương, các đại thực bào giúp tăng sinh nguyên bào sợi, cũng như các yếu tố phân bào kích thích hình thành mạch và tổng hợp collagen. Các đại thực bào tiết TGF- β , là một yếu tố tăng trưởng hướng hóa giúp các nguyên bào sợi di chuyển đến vị trí khuyết hổng. Nguyên bào sợi này kích thích sản xuất ra collagen, là đại phân tử chính cấu thành mô liên kết. Giai đoạn này bắt đầu vào ngày thứ 3 và kết thúc vào tuần thứ 3 [31]. Điều này giải thích sự tăng sinh của mô liên kết giảm dần từ tuần 2 đến tuần 6 ở nhóm bột xương.

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu cứu chúng tôi đã thiết lập được mô hình khuyết hổng xương ổ răng in vivo trên thỏ thực nghiệm. Nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy rằng bột xương nhân tạo là vật liệu có tính tương hợp sinh học cao và có tiềm năng trong việc tái tạo xương và mô liên kết, giúp tăng khả năng lành thương. Chúng tôi kiến nghị có thể sử dụng mô hình thực nghiệm khuyết hổng xương ổ răng này để tiến hành các nghiên cứu ứng dụng các vật liệu có tiềm năng tái tạo xương ổ răng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài khoa học công nghệ cấp Đại học Huế (DHH 2019-04-89).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita M, Kitamura C, Fukushima H. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. *International journal of dentistry*. 2012;2012.
2. Wood DL, Hoag PM, Donnenfeld OW, Rosenfeld LD. Alveolar crest reduction following full and partial thickness flaps. *Journal of periodontology*. 1972;**43**(3):141-4.
3. Schneider R. Prosthetic concerns about atrophic alveolar ridges. *Postgrad Dent*. 1999;**6**(2):3-7.
4. Kang NH. Current Methods for the Treatment of Alveolar Cleft. *Arch Plast Sur* 2017. 2017;**44**:188-93.
5. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®]. 2002;**395**:81-98.
6. Koh KS, Choi JW, Park EJ, Oh TS. Bone regeneration using silk hydroxyapatite hybrid composite in a rat alveolar defect model. *International journal of medical sciences*. 2018;**15**(1):59.
7. Kamal M, Andersson L, Tolba R, Bartella A, Gremse F, Holze F, et al. A rabbit model for experimental alveolar cleft grafting. *Journal of translational medicine*. 2017;**15**(1):50.
8. Landry RG. Effectiveness of Benzylamine HC1 in the Treatment of Periodontal Post-surgical Patients: Faculty of Dentistry, University of Toronto; 1985.
9. Miloro M, Haralson DJ, Desa V. Bone healing in a rabbit mandibular defect using platelet-rich plasma. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2010;**68**(6):1225-30.
10. Han Z, Bhavsar M, Leppik L, Oliveira KM, Barker JH. Histological scoring method to assess bone healing in critical size bone defect models. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2018;**24**(5):272-9.
11. Kim J-H, Moon H-J, Kim T-H, Jo J-M, Yang SH, Naskar D, et al. A novel in vivo platform for studying alveolar bone regeneration in rat. *Journal of tissue engineering*. 2013;**4**:2041731413517705.
12. Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, et al. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomedical materials*. 2012;**7**(1):015005.
13. Di Silvio L, Gurav N, Sambrook R. The fundamentals of tissue engineering: new scaffolds. *The Medical Journal of Malaysia*. 2004;**59**:89-90.
14. Puttini IdO, Poli PP, Maiorana C, Vasconcelos IRd, Schmidt LE, Colombo LT, et al. Evaluation of osteoconduction of biphasic calcium phosphate ceramic in the calvaria of rats: Microscopic and histometric analysis. *Journal of Functional Biomaterials*. 2019;**10**(1):7.
15. Piattelli A, Scarano A, Mangano C. Clinical and histologic aspects of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) used in connection with implant placement. *Biomaterials*. 1996;**17**(18):1767-70.
16. Gerstenfeld LC, Cho T-J, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves B, et al. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor- α signaling. *Cells Tissues Organs*. 2001;**169**(3):285-94.
17. Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*. 1999;**46**(1):103-11.
18. Titsinides S, Agogiannis G, Karatzas T. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Japanese Dental Science Review*. 2019;**55**(1):26-32.
19. Pippi R. Post-surgical clinical monitoring of soft tissue wound healing in periodontal and implant surgery. *International journal of medical sciences*. 2017;**14**(8):721.
20. Yao J, Lee KK, McGrath C, Wu YN, Li KY, Mattheos N. Comparison of patient-centered outcomes after routine implant placement, teeth extraction, and periodontal surgical procedures. *Clinical oral implants research*. 2017;**28**(4):373-80.
21. Burkhardt R, Lang N. Role of flap tension in primary wound closure of mucoperiosteal flaps: a prospective cohort study. *Clinical oral implants research*. 2010;**21**(1):50-4.
22. Nguyen T-DT, Bae T-S, Yang D-h, Park M-s, Yoon S-j. Effects of titanium mesh surfaces-coated with hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanotubes on acetabular bone defects in rabbits. *International journal of molecular sciences*. 2017;**18**(7):1462.
23. Abdullah WA. Evaluation of bone regenerative capacity in rats clavierial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. *The Saudi dental journal*. 2016;**28**(3):109-17.
24. Acar AH, Yolcu Ü, Gül M, Keleş A, Erdem NF, Kahraman SA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Archives of oral biology*. 2015;**60**(4):606-14.
25. Hirata M, Murata H, Takeshita H, Sakabe T, Tsuji Y, Kubo T. Use of purified beta-tricalcium phosphate for filling defects after curettage of benign bone tumours. *International orthopaedics*. 2006;**30**(6):510-3.
26. Yilmaz D, Dogan N, Ozkan A, Sencimen M, Ora BE, Mutlu I. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2014;**29**(1):59-65.
27. Yamauchi K, Takahashi T, Funaki K, Yamashita Y. Periosteal expansion osteogenesis using highly purified beta-tricalcium phosphate blocks: a pilot study in dogs. *Journal of periodontology*. 2008;**79**(6):999-1005.
28. Kim B-J, Kwon T-K, Baek H-S, Hwang D-S, Kim C-H, Chung I-K, et al. A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate

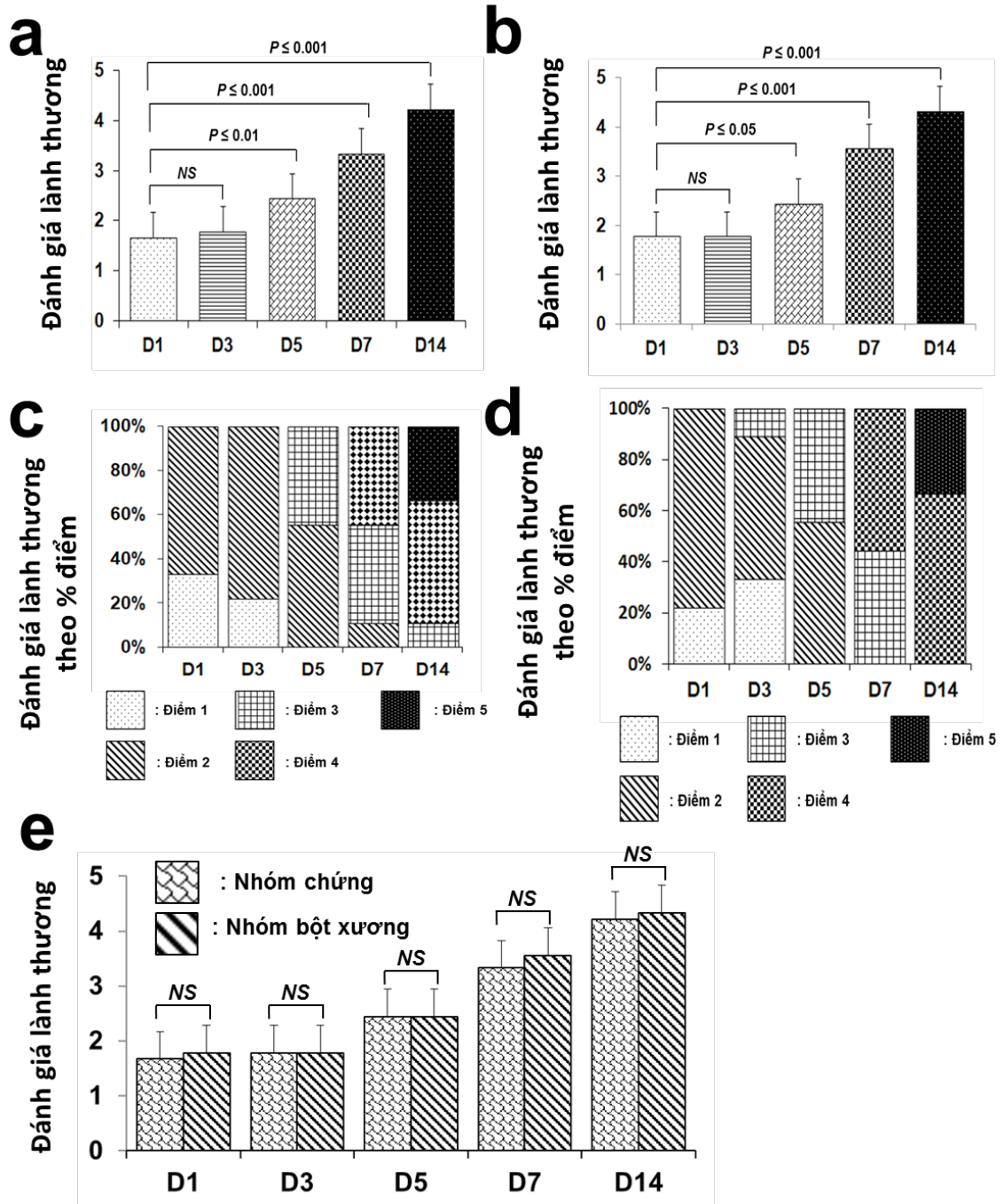
and platelet-rich fibrin—mixed tricalcium phosphate in rabbits. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2012;**113**(5):583-92.

29. Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International journal of nanomedicine*. 2006;**1**(3):317.

30. Marenzana M, Arnett TR. The key role of the blood supply to bone. *Bone research*. 2013;**1**:203-15.

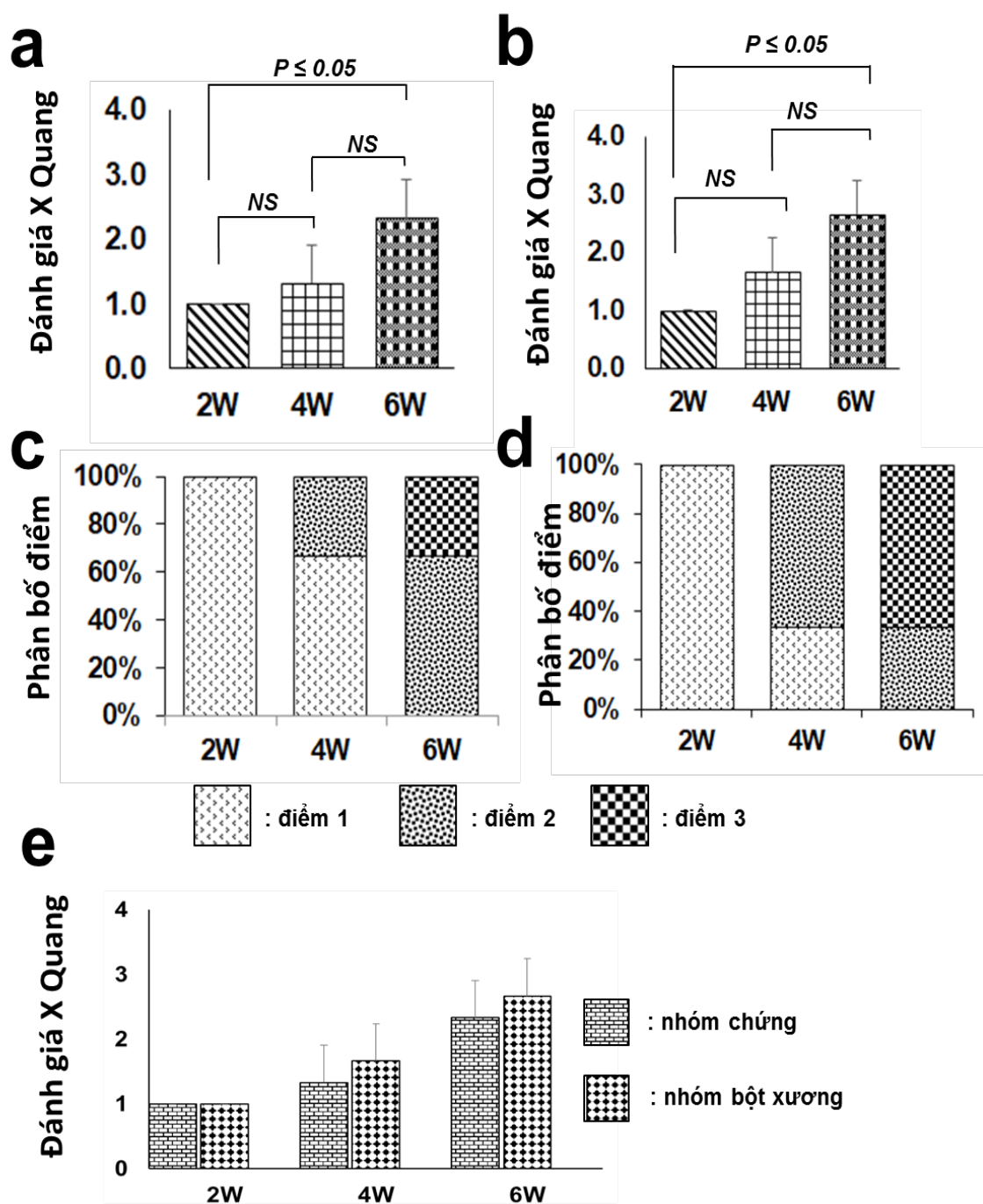
31. Aricioglu C, Dolanmaz D, Esen A, Isik K, Avunduk MC. Histological evaluation of effectiveness of platelet-rich fibrin on healing of sinus membrane perforations: A preclinical animal study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2017;**45**(8):1150-7.

HÌNH ẢNH



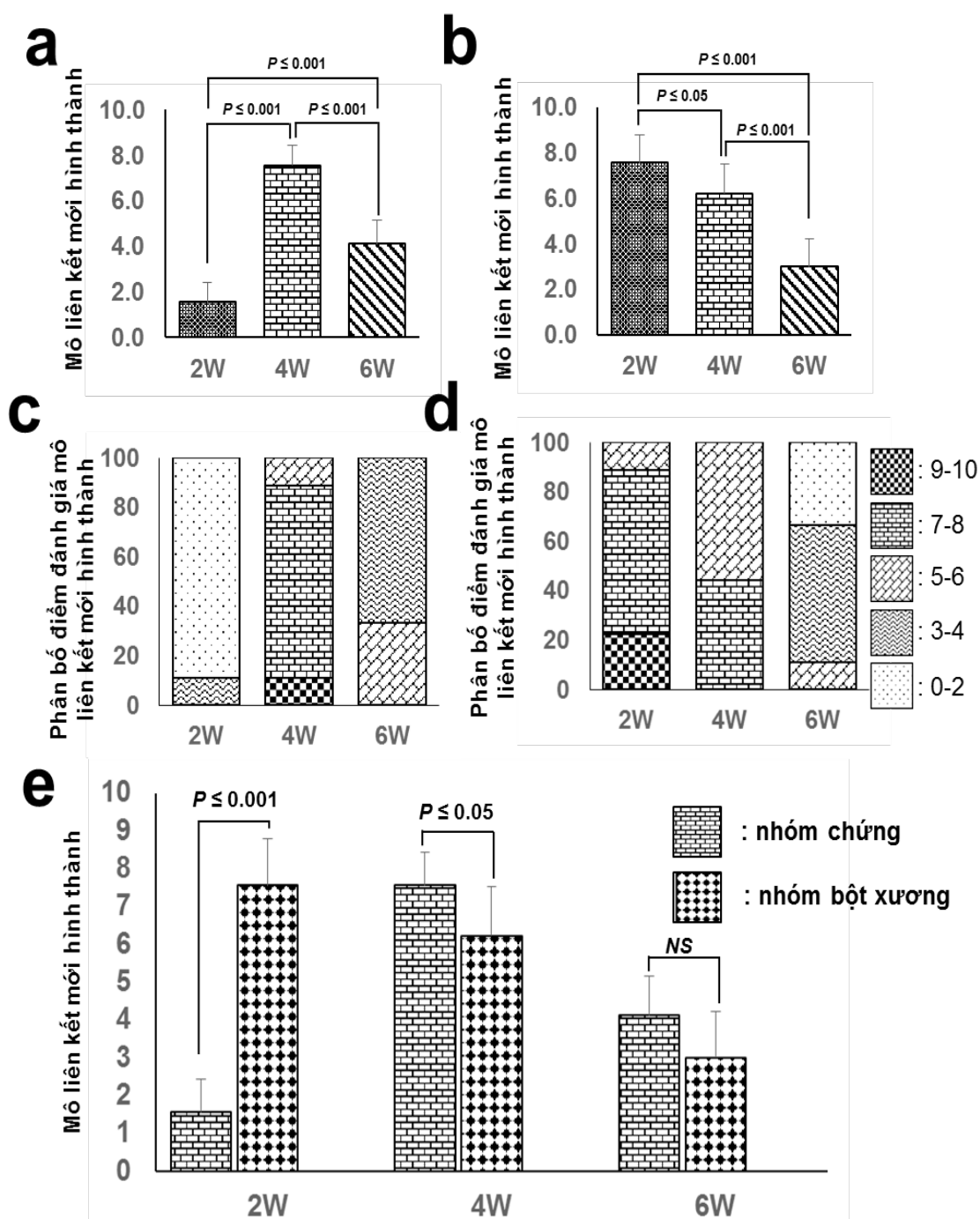
Hình 1. Đánh giá quá trình lành thương

a-b. Biểu đồ đánh giá sự lành thương ở nhóm chứng (a) và nhóm bột xương (b) tại các thời điểm: ngày 1, ngày 3, ngày 5, ngày 7 và ngày 14 sau phẫu thuật. c-d. Phân bố điểm lành thương ở nhóm chứng (c) và nhóm bột xương (d) tại các thời điểm: ngày 1, ngày 3, ngày 5, ngày 7 và ngày 14 sau phẫu thuật. e. So sánh sự lành thương giữa nhóm chứng và nhóm bột xương tại các thời điểm: ngày 1, ngày 3, ngày 5, ngày 7, ngày 14 sau phẫu thuật. **NS**: không có ý nghĩa thống kê (Test Mann-Whitney).



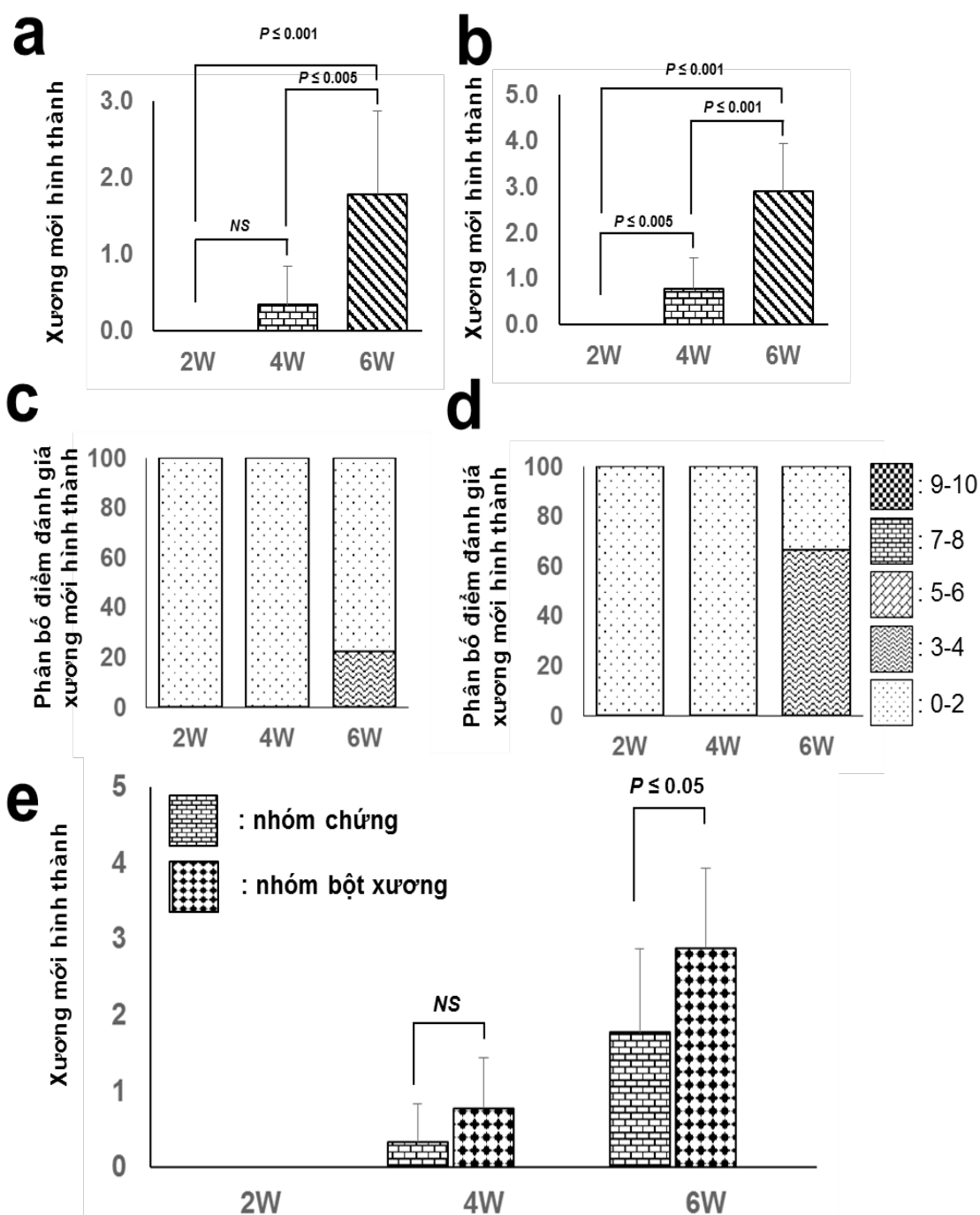
Hình 2. Đánh giá tái tạo xương ổ răng bằng X Quang

a-b. Đồ thị biểu diễn khả năng tái tạo xương ổ răng của nhóm chứng (a) và nhóm bột xương (b) tại các thời điểm: 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần sau phẫu thuật. c-d. Phân bố điểm XQ ở nhóm chứng (c) và nhóm bột xương (d) tại các thời điểm: 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần sau phẫu thuật. e. So sánh khả năng tái tạo xương ổ răng bằng X quang giữa nhóm chứng và nhóm bột xương. NS: không có ý nghĩa thống kê (Test Mann-Whitney).



Hình 3. Đánh giá khả năng hình thành mô liên kết

a-b. Đánh giá lượng mô liên kết mới hình thành tại các thời điểm: 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần sau phẫu thuật. c-d. Phân bố điểm đánh giá lượng mô liên kết mới hình thành tại các thời điểm: 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần sau phẫu thuật. e. So sánh lượng mô liên kết mới hình thành. NS: không có ý nghĩa thống kê (Test Mann-Whitney).



Hình 4. Đánh giá khả năng hình thành mô xương

a-b. Đánh giá lượng mô xương mới hình thành tại các thời điểm: 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần sau phẫu thuật. **c-d.** Phân bố điểm đánh giá lượng mô xương mới hình thành tại các thời điểm: 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần sau phẫu thuật. **e.** So sánh lượng mô liên kết mới hình thành. **NS:** không có ý nghĩa thống kê (Test Mann-Whitney).