

# BỘ GIÁO DỤCVIỆN HÀN LÂM KHOA HỌCVÀ ĐÀO TẠOVÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAMHỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



# NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ VẬT LIỆU BIOGLASS VÀ TỔ HỢP LAI VỚI POLYMER ALG-F127 ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG ĐIỀU TRỊ NỘI NHA

# LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa hữu cơ Mã số: 8 44 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: 1. TS. NGUYÊN THỊ NGỌC TRĂM hay 2. PGS. TS. TRẦN NGỌC QUYÊN T

Tp. Hồ Chí Minh - 2025

# **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước phát luật.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 15 tháng 03 năm 2025

Tác giả luận văn

Lương Thị Thảo Hân

# LỜI CẨM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Nguyễn Thị Ngọc Trăm và PGS.TS Trần Ngọc Quyển đã tận tình hướng dẫn, định hướng và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài này. Sự chỉ dẫn tận tâm và những góp ý quý báu của các thầy cô không chỉ giúp tôi hoàn thiện nghiên cứu mà còn mở rộng tầm nhìn khoa học, nghiên cứu. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Đặng Thị Lệ Hằng vì đã luôn sẵn sàng hỗ trợ, giải đáp những thắc mắc trong quá trình nghiên cứu cũng như chia sẻ những kinh nghiệm quý báu trong lĩnh vực khoa học vật liệu.

Bên cạnh đó, tôi xin bày tỏ sự tri ân đến toàn thể thầy cô tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những người đã tận tình giảng dạy, truyền đạt cho tôi những kiến thức chuyên môn sâu trong suốt thời gian học tập.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Phòng Vật Y sinh, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vì đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu. Sự hỗ trợ về hóa chất, dụng cụ và trang thiết bị hiện đại tại phòng thí nghiệm là yếu tố quan trọng giúp tôi có thể thực hiện và hoàn thành tốt đề tài này.

Cuối cùng, tôi xin dành lời cảm ơn sâu sắc đến gia đình và bạn bè đã hỗ trợ, động viên tinh thần trong quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Tác giả luận văn

Lương Thị Thảo Hân

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MUC LUC	iii
DANH MUC TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MUC BẢNG	v
	. VI
MC DÀU	. VII 1
	1
1. Lý do chọn để tải	1
2. Mục tieu nghiên cưu	3
3. Noi dung nghien cưu	3
4. Cơ sơ khoa học và tinh thực tiên của de tai	4
5. Nhưng dong gop của luận văn	4
CHUONG I. TONG QUAN NGHIEN CUU	כ
1.1. Tính trạng bệnh lý và phương pháp điều trị nội nhà hiện nay	5
1.1.1. Thực trạng bệnh ly nội nhà	5
1.1.2. Cac phương pháp điều trị nội nhà	0
1.2. Gioi trieu ve Alginate	ð
1.2.1. Cau truc cua Alginate	6
1.2.2. Thin chai co ban cua alginate	9 11
1.5. Tông quan về phương $r_{12}$ ,	11
1.3.2 Úng dụng của Phironic E127 trong ngành y sinh	12
1.5.2. Ong dụng của r tươnh ( $1.127$ ương ngann ý shìn	12
1.4.1 Tổng quan về bioglass 588	13
1 4 2 Phirong nhán điều chế	13
1.5. Tổng quan về donamine	15
1.5.1. Cấu trúc của dopamine	15
1.5.2. Khả năng tao liên kết hóa học và củng cố mang lưới hydrogel	.15
1.6. Tổng quan về hemin	. 16
1.7. Tổng quan về tình hình nghiên cứu	. 17
1.7.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	. 17
1.7.2. Tình hình nghiên cứu trong nước	. 19
CHƯƠNG 2. ĐỔI TƯỢNG VÀ PHƯỜNG PHÁP NGHIÊN CỨU	. 23
2.1. Đối tương – pham vi nghiên cứu	.23
2.2. Dụng cụ, hóa chất và thiết bị	. 23
2.3. Các phương pháp nghiên cứu	. 26
2.3.1. Tổng hợp và đánh giá nano hemin, bioglass 58S, bioglass 58S tích	
hợp hemin	.26
2.3.1.1. Tổng hợp nano Hemin (HNP)	. 26
2.3.1.2. Tổng hợp nano bioglass 58S (BG)	. 26
2.3.1.3. Tổng hợp Bioglass 58S tích hợp Hemin (BG 58S-Fe)	. 27

2.3.1.4. Đánh giá hoạt tính BG 58S-Fe	27
2.3.2. Tổng hợp và đánh giá cấu trúc hóa học dẫn xuất dopamine từ A	lg,
pluronic F127 (PDA, ADA)	29
2.3.2.1. Tổng hợp dẫn xuất dopamin	29
2.3.2.2. Xác định mức độ thế dopamine	30
2.3.3. Khảo sát khả năng liên kết PDA, ADA với BG 58S-Fe và tổng l	nợp,
đánh giá vật liệu hydrogel	30
2.3.3.1. Khảo sát khả năng liên kết PDA, ADA với BG 58S-Fe	30
2.3.3.2. Tổng hợp, đánh giá vật liệu hydrogel	31
2.3.3. Khảo sát độc tính, khả năng khoáng hóa in vitro trên tế bào	32
2.3.3.1. Khảo sát độc tính	32
2.3.3.2. Khảo sát khả năng khoáng hóa	33
2.3.4. Phân tích thống kê	33
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	34
3.1. Kết quả cấu trúc BG 58S và BG 58S-Fe	34
3.2. Đánh giá khả năng giả xúc tác HRP của BG 58S và BG 58S-Fe	37
3.3. Kết quả tổng hợp và đánh giá cấu trúc hóa học của PDA, ADA	37
3.4. Kết quả khả năng liên kết PDA, ADA với BG 58S-Fe và tổng hợp, ở	tánh
giá vật liệu hydrogel	39
3.4.1. Hiệu quả hình thành liên kết dopamin	39
3.4.2. Tổng hợp hydrogel	40
3.4.3. Cấu trúc hình thái và lưu biến của hệ vật liệu hydrogel	42
3.5. Kết quả đánh giá tiềm năng ứng dụng trong nội nha	43
3.5.1. Khảo sát độc tính	43
3.5.1.1. Độc tính gián tiếp	43
3.5.1.2. Độc tính trực tiếp	44
3.5.2. Khảo sát khoáng hóa	46
3.5.2.1. Hiệu quả tạo khoáng bề mặt	46
3.5.2.2. Khả năng biệt hóa xương	47
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	49
KÉT LUÂN	49
KIẾN NĠHI	49
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	50
- · ·	

# DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

STT	Từ viết tắt	Từ đầy đủ
1	ADA	Alginate-dopamine
2	BG	Bioglass
3	BG 58S	Bioglass 58S
4	DLS	Tán xạ ánh sáng động
5	ECM	Ma trận ngoại bào
6	EDS	Phổ tán xạ năng lượng
7	F127	Pluronic F127
8	НА	Hydroxyapatite
9	HNP	Hemin nanoparticles
10	HNP BG	Bioglass 58S tích hợp Hemin
11	HRP	Enzyme horseradish peroxidase
12	MBGs	Mesoporous bioglass
13	PDA	Pluronic-dopamine
14	PEG	Polyethylene glyco
15	PEO	Poly(ethylene oxide)
16	PLA	Polylactic acid
17	PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
18	РРО	Poly(propylene oxide)
19	SEM	Kính hiển vi điện tử quét
20	TEM	Kính hiển vi điện tử truyền qua
21	XRD	Phổ nhiễu xạ tia X

# DANH MỤC BẢNG

Bång 2.1. Nguyên liệu – hóa chất	23
Bảng 2.2. Danh mục dụng cụ	25
Bảng 2.3. Danh mục trang thiết bị	25

# DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỔ THỊ

Hình 1.1. Thống kê số năm sống chung với khuyết tật nha khoa theo nhóm tuổi
và khu vực phân bố trên thế giới năm 2019 <sup>13</sup> 5
Hình 1.2. Cấu trúc đơn vị monomer và các khối phân bố của muối Alginate <sup>22</sup> 8
Hình 1.3. Quá trình tạo gel của alginate <sup>26</sup> 10
Hình 1.4. Cấu trúc Pluronic F12711
Hình 1.5. Quá trình tạo gel dưới ảnh hưởng nhiệt độ của F127 <sup>29</sup> 12
Hình 1.6. Quy trình sol-gel điều chế bioglass <sup>32</sup> 14
Hình 1.7. Quy trình nung chảy điều chết bioglass <sup>32</sup> 15
Hình 1.8. Quá trình oxi hóa dopamine15
Hình 1.9. Hydrogel cellulose carboxymethyl biến tính dopamine (CMC-DA)
được liên kết chéo bởi enzyme HRP <sup>34</sup> 16
Hình 1.10. Cấu trúc hemin
Hình 1.11. Hình ảnh SEM về sự hình thành hydroxycarbonated apatite trên bề
mặt các hạt MBG sau 5 ngày trong SBF <sup>38</sup> 18
Hình 1.12. Đặc tính sinh học của scaffold GA và GA-NCs: Khả năng sống sót tế
bào được đánh giá bằng phương pháp phân tích MTT (A), sự tăng sinh tế bào
được định lượng bằng phương pháp phân tích Picogreen (B), hình ảnh huỳnh
quang của scaffold biểu thị tế bào sống/chết (C) <sup>4</sup> 19
Hình 1.13. Cấu trúc hệ G3.0-He <sup>41</sup> 21
Hình 2.1 Sơ đồ tổng hợp HNP26
Hình 2.2. Sơ đồ tổng hợp BG 58S27
Hình 2.3. Sơ đồ mô tả phương pháp thử hoạt tính bằng pyrogallol <sup>44</sup>
Hình 2.4. Sơ đồ tổng hợp ADA29
Hình 2.5. Sơ đồ tổng hợp PDA 30
Hình 2.6. Phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch dopamine trong quá trình oxy hóa
thành polydopamine theo thời gian <sup>45</sup>
Hình 3.1. Hình ảnh SEM, surface mapping EDS và phổ EDS tổng quát của
bioglass BG 58S (A, B,C) và BG 58S-Fe (D, E, F)
Hình 3.2. Giản đồ XRD của BG 58S và BG 58S-Fe
Hình 3.3. Hiệu quả xúc tác của BG 58S và BG 58S-Fe trên phản ứng oxy hóa
pyrogallol của các mẫu thử với nồng độ khác nhau (A) Hình ảnh đổi màu của
các mẫu và (B) Hình ảnh phổ UV-Vis37
Hình 3.4. Sơ đồ tổng hợp ADA và PDA 38
Hình 3.5. Sự thay đổi theo thời gian của phổ UV-Vis đối với các dung dịch
PDA, ADA và hỗn hợp ADA-PDA (tỉ lệ 1:1) khi bổ sung BG 58S-Fe và H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
với nồng độ 5mg/ml, trong khoảng bước sóng 250nm-800nm

Hình 3.6. Phương pháp đảo ống nghiệm để chuyển đổi sol-gel của PDA có hoặc không có HNP BG/H2O2 và hỗn hợp PDA–ADA: (A) sơ đồ minh họa (B) Hình Hình 3.7. Hình ảnh SEM bề mặt (A) và biểu đồ thể hiện kết quả phân tích lưu biến theo nhiệt độ (B) của hydrogel thu được từ PDA 15%, PDA 15% + BG Hình 3.8. Khả năng sống sót của tế bào gốc trung mô người (hMSCs) với dung dịch chiết xuất từ hydrogel (10 mg/ml) ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau .... 44 Hình 3.9. Kết quả nhuôm sống/chết tế bào gốc trung mô người (hMSCs) trong hydrogel được thực hiện bằng Propidium Iodide (PI, đỏ, tế bào chết), Acridine Orange (AO, xanh luc, tế bào sống) và Hoechst 33342 (xanh dương, nhân tế bào)......45 Hình 3.10. Hình ảnh SEM (A) bề mặt và Phổ EDS (B) thể hiện khả năng khoáng Hình 3.11 Kết quả nhuộm Alizarin red của tế bào hMSCs nuôi cấy với hydrogel 

# MỞ ĐẦU

#### 1. Lý do chọn để tài

Nội nha được biết đến là một ngành thuộc lĩnh vực nha khoa liên quan đến mô mềm bên trong răng (tủy răng) và các mô xung quanh chân răng. Cũng giống như nhiều bộ phận khác trong cơ thể, răng cũng cần có sự nuôi dưỡng bởi một hệ thống gồm: Bạch huyết, tổ chức thần kinh và mạch máu. Các tổn thương răng nội nha gây ra nhiều phiền toái cho người bệnh trong vấn đề ăn uống, thẩm mỹ. Tổn thương nội nha xảy ra có nhiều dạng, do nhiều nguyên nhân khác nhau, có thể kế tới 1 số trường hợp như: răng bể, sứt mẻ xảy ra khi gặp các va chạm hoặc chấn thương ở vùng răng hàm mặt; sâu răng-răng bị tổn thương do vi khuẩn tấn công, những chấm li ti hoặc lỗ có màu đen xuất hiện trên bề mặt răng lâu ngày ăn sâu vào tủy răng; viêm nha chu gây viêm nhiễm xung quanh răng, nướu răng sưng đau, chân răng lung lay,... Trong lĩnh vực nha khoa hiện đại, việc điều trị các tổn thương răng như sâu răng, mẻ răng, và sự lão hóa răng do bệnh lý nha chu đang đặt ra nhiều thách thức đáng kể.

Các phương pháp điều trị thông dụng hiện nay bao gồm trám răng với vật liệu composite, trồng răng giả sử dụng implant hoặc cầu răng, và các phương pháp phục hình khác như bọc răng sứ. Tuy nhiên, mỗi phương pháp đều có những nhược điểm riêng. Ví dụ, trám răng composite, mặc dù có tính thẩm mỹ cao, lại có nguy cơ co ngót và gây ra khe hở, tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhập và gây sâu răng tái phát. Trồng răng giả, mặc dù có độ bền cao, lại đòi hỏi quá trình phẫu thuật phức tạp và thời gian điều trị kéo dài. Hơn nữa, vật liệu sử dụng trong các phương pháp này thường có khả năng tương thích sinh học chưa tối ưu, dẫn đến nguy cơ viêm nhiễm và đào thải sau điều trị.

Đặc biệt, trong trường hợp tổn thương răng do bệnh lý nha chu, việc phục hồi mô xương và mô mềm xung quanh răng bị tổn thương là một thách thức lớn. Các vật liệu truyền thống thường không thể kích thích quá trình tái tạo mô một cách hiệu quả, dẫn đến sự suy giảm chức năng ăn nhai và thẩm mỹ của răng.

Điều này đòi hỏi các nhà nghiên cứu phải tìm ra những vật liệu và phương pháp điều trị mới, an toàn và hiệu quả hơn, có khả năng tương thích sinh học cao, kích thích quá trình tái tạo mô, và giảm thiểu nguy cơ biến chứng sau điều trị<sup>1</sup>. Lĩnh vực này tận dụng lợi thế của những đổi mới trong nghiên cứu tế bào gốc, sinh học tế bào và phân tử, kỹ thuật mô và khoa học vật liệu ứng dụng nhằm hỗ trợ khả năng tự phục hồi của mô sau chấn thương, định hướng tái tạo mô tự thân thay thế cho mô tổn thương vốn không thể tự phục hồi hoặc đẩy nhanh quá trình phục hồi. Vật liệu sinh học được thiết kế để phát tín hiệu sinh học, hoạt động như một hệ thống định vị, dẫn dắt tế bào gốc nội sinh hoặc tế bào gốc ngoại lai đến vùng mô tổn thương, từ đó kích hoạt quá trình tái tạo và phục hồi mô <sup>2</sup>.

Trong điều trị nội nha nói riêng và tái tạo mô nói chung, nghiên cứu vật liệu sinh học ngày nay tập trung nhiều vào vật liệu tự nhiên, ma trận ngoại bào (ECM), và vật liệu tổng hợp. Do hạn chế của vật liệu tự nhiên, polymer tổng hợp được ưa chuộng, kết hợp với nano ion kim loại cho tiềm năng tái tạo mô<sup>3</sup>. Các nghiên cứu gần đây chứng minh scaffold nanocomposite kết hợp các thành phần nguồn gốc từ polymer tự nhiên như gelatin, alginate, chitosan,... có thể tăng cường gắn kết, tăng sinh, và biệt hóa tế bào xương răng, đồng thời giảm oxy hóa<sup>4</sup>. Hydrogel Pluronic chứa chất ức chế GSK3 giảm tổn thương mô nha chu, với kết quả lâm sàng và mô học cho thấy giảm đáng kể độ sâu túi nha chu và tiêu xương<sup>5</sup>.

Bioglass (BG) là một loại thủy tinh sinh học được sử dụng trong các ứng dụng y tế, đặc biệt là trong tái tạo xương và kỹ thuật mô. Thành phần của chính của bioglass bao gồm silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>), calcium oxide (CaO) và phosphorus pentoxide (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) với các tỉ lệ khác nhau. Khi được cấy ghép vào cơ thể, bioglass hình thành một lớp hydroxyapatite trên bề mặt, có tính chất hóa học và cấu trúc tương tự với pha khoáng của xương, không gây độc hại và tương thích với các mô trong cơ thể. Theo thời gian, nó sẽ phân hủy trong cơ thể, giải phóng các ion có lợi như canxi và phospho, hỗ trợ quá trình tái tạo xương.

Do đó trong nghiên cứu nay, chúng tôi phát triển một loại vật liệu nanocomposite hydrogel đa chức năng sử dụng thành phần hỗ trợ tạo liên kết ngang. Dopamine biến tính có khả năng đóng vai trò là tác nhân liên kết chéo đa chức, góp phần hình thành cả liên kết cộng hóa trị và không cộng hóa trị trong cấu trúc hydrogel. Nhờ chứa nhóm catechol, dopamine có khả năng tạo liên kết hydrogen, tương tác  $\pi$ – $\pi$ , và liên kết cộng hóa trị với các nhóm chức như –COOH hoặc –NH<sub>2</sub>, từ đó tăng cường độ bền cơ học, khả năng đàn hồi và khả năng bám dính trên bề mặt mô trong môi trường ẩm. Đồng thời, sự tham gia của dopamine trong mạng lưới polymer giúp cải thiện tính tự phục hồi và tính tương thích sinh học của hydrogel<sup>6</sup>. Bên cạnh đó, Hemin, với hoạt tính bắt chước enzyme peroxidase, có thể xúc tác quá trình oxi hóa nhóm catechol của dopamine thành quinone dễ dàng tham gia các phản ứng kết nối cộng hóa trị giúp hình thành mạng lưới liên kết chéo bền vững.

Alginate mang đến tính tương thích sinh học và khả năng tạo gel lý tưởng, góp phần trong việc thúc đẩy tổng hợp và tái tạo mô cho quá trình phục hồi<sup>7</sup>. Pluronic F127 với đặc tính nhạy nhiệt, cho phép hệ thống chuyển từ dạng lỏng sang gel ở nhiệt độ cơ thể, tạo điều kiện thuận lợi cho việc đưa thuốc vào vị trí điều trị và kiểm soát

quá trình giải phóng hoạt chất một cách chính xác<sup>8</sup>, bioglass kích thích quá trình tái tạo xương thông qua cơ chế giải phóng ion canxi và phosphate, từ đó thúc đẩy sự hình thành hydroxyapatite, thành phần chính của xương<sup>9, 10</sup>. Nano hemin được bổ sung vào cấu trúc biogalss nhằm mang lại hoạt tính xúc tác bắt chước enzyme horseradish peroxidase giúp tạo liên kết chéo dẫn xuất dopamine.

# 2. Mục tiêu nghiên cứu

# Mục tiêu tổng quát:

Tổng hợp được hệ vật liệu Bioglass 58S tích hợp Hemin (BG 58S-Fe) kết hợp với Hydrogel dẫn xuất kép Dopamine (DA) từ Alg và F127 (PDA, ADA) bước đầu đánh giá tiềm năng ứng dụng trong tái tạo mô xương.

# Mục đích cụ thể:

- Tổng hợp và đánh giá BG 58S-Fe có khả năng bắt chước enzyme HRP
- Tổng hợp nanocomposite hydrogel trên cơ sở Alg, F127 sử dụng liên kết ngang dopamine, hỗ trợ bởi BG 58S-Fe
- Đánh giá được tiềm năng ứng dụng của vật liệu trong tái tạo xương hướng đến ứng dụng nội nha thông qua các nghiên cứu khoáng hóa xương trong môi trường giả sinh học và khoáng hóa ở cấp độ tế bào gốc trung mô của vật liệu

# 3. Nội dung nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu gồm các nội dung nghiên cứu chính là:

- Nội dung 1: Nghiên cứu quy trình tổng hợp nano hemin, bioglass 58S, bioglass 58S tích hợp hemin (BG 58S-Fe) và đánh giá hoạt tính cấu trúc, khả năng bắt chước xúc tác HRP của vật liệu.
- Nội dung 2: Tổng hợp và đánh giá cấu trúc hóa học dẫn xuất dopamine từ Alg, pluronic F127 (PDA, ADA)
- Nội dung 3: Khảo sát khả năng liên kết PDA, ADA với BG 58S-Fe và tổng hợp, đánh giá vật liệu hydrogel
- Nội dung 4: Khảo sát độc tính và khả năng khoáng hóa xương trong môi trường giả sinh học và khoáng hóa ở cấp độ tế bào gốc trung mô của vật liệu.

# 4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

Hiện nay các bệnh lý răng miệng đang là một trong những vấn đề sức khỏe phổ biến trên toàn cầu nói chung và Việt Nam nói riêng. Trong đó, các bệnh nội nha như viêm tủy, sâu răng chiếm tỷ lệ đáng kể, ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng cuộc sống của người bệnh.

Mặc dù các phương pháp điều trị quen thuộc hiện hành bao gồm lấy tủy và trám bít ống tủy, thay thế răng giả có thể dễ dàng thực hiện nhưng vẫn còn tồn tại nhiều hạn chế. Việc loại bỏ hoàn toàn vi khuẩn trong hệ thống ống tủy là một thách thức lớn do cấu trúc giải phẫu phức tạp. Ngoài ra, vật liệu trám bít hiện tại thiếu khả năng tái tạo mô và không đáp ứng được các yêu cầu sinh học lâu dài, dẫn đến nguy cơ tái nhiễm và không giữ được răng tự nhiên.

Do đó việc nghiên cứu phát triển vật liệu đa chức năng chứa các thành phầnthành phần như Alg, F127, bioglass sở hữu nhiều đặc tính của vật liệu tiên tiến để tái tạo tế bào xương, điều này được chứng minh qua nhiều nghiên cứu bằng nhiều phương pháp khác nhau. Việc tổng hợp hydrogel từ các thành phần trên, với phương pháp liên kết ngang từ dẫn xuất dopamine và hemin giúp cung cấp khả năng khoáng hóa và biệt hóa tế bào xương, tạo điều kiện tăng cường quá trình hình thành xương răng. Ngoài ra, tính tương thích sinh học, đặc trưng cơ học và khả năng ổn định trong môi trường cơ thể cũng cần được khảo sát để đạt kết quả tốt nhất. Do đó, luận văn với mục đích nghiên cứu phát triển hệ vật liệu mới tương thích sinh học, có hiệu quả khoáng hóa trong môi trường giả sinh học và ở cấp độ tế bào sẽ có tiềm năng lớn trong trong tái tạo hay hỗ trợ điều trị nội nha sẽ có tính khoa học và thực tiễn cao.

#### 5. Những đóng góp của luận văn

Nghiên cứu tổng hợp và ứng dụng hệ hydrogel có chứa hemin và dopamine đóng góp vào hướng phát triển vật liệu polymer sinh học trong lĩnh vực điều trị nội nha và tái tạo mô. Các kết quả đạt được là cơ sở khoa học, góp phần mở rộng tính ứng dụng và hiệu quả sinh học của hydrogel trong môi trường mô răng.

Ngoài ra, luận văn bổ sung thêm nghiên cứu về cơ chế liên kết chéo và khả năng tích hợp các chất có hoạt tính sinh học nhằm cải thiện đặc tính cơ học, khả năng bám dính và kích thích tái tạo mô tổn thương.

# CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

# 1.1. Tình trạng bệnh lý và phương pháp điều trị nội nha hiện nay

#### 1.1.1. Thực trạng bệnh lý nội nha

Thực trạng bệnh lý nội nha trên thế giới:

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), các bệnh về răng miệng, bao gồm các bệnh nội nha như viêm tủy răng và viêm quanh cuống, ảnh hưởng đến khoảng 3,5 tỷ người trên toàn thế giới, biến chúng thành một trong những vấn đề sức khỏe phổ biến nhất hiện nay<sup>11</sup>. Từ năm 2018 đến 2024, số liệu về các ca bệnh nội nha trên toàn cầu cho thấy xu hướng gia tăng đều đặn, theo các nghiên cứu và báo cáo y tế, tỷ lệ điều trị tủy răng chiếm một phần đáng kể trong các can thiệp nha khoa, đặc biệt là ở các quốc gia phát triển. Trên toàn cầu, từ 2018 đến 2024, số lượng ca điều trị tủy răng đã tăng lên rõ rệt. Ở các nước như Hoa Kỳ và Châu Âu, tỷ lệ thành công của các ca điều trị tủy răng đạt khoảng 95%, với hơn 90% các răng được điều trị kéo dài từ 8 đến 10 năm sau quá trình điều trị. Các bệnh nội nha, bao gồm viêm tủy răng và viêm quanh cuống răng, chiếm khoảng 40-50% tổng số các bệnh về răng miệng<sup>12</sup>. Tỷ lệ mắc bệnh này có xu hướng tăng do các yếu tố như thay đổi thói quen ăn uống và tuổi tác của cộng đồng<sup>11</sup>.

Theo nghiên cứu về Gánh nặng bệnh tật toàn cầu năm 2019 của tổ chức Y tế thế giới WHO, tình trạng mất răng (mất toàn bộ răng), viêm nướu nghiêm trọng (bệnh nướu mãn tính) và sâu răng không được điều trị đã gây ra 23,1 triệu DALYs (chỉ số dùng để đo lường gánh nặng bệnh tật) trên toàn thế giới thời điểm 2019, tương đương với việc ảnh hưởng khoảng 284,6năm/100000 dân số, tăng 28,02% so với thời điểm từ 1990-2010<sup>13</sup> (Hình 1.1)



Hình 1.1. Thống kê số năm sống chung với khuyết tật nha khoa theo nhóm tuổi và khu vực phân bố trên thế giới năm 2019<sup>13</sup>

Thực trạng bệnh lý nội nha tại Việt Nam:

Theo thống kê của Viện Răng Hàm Mặt Trung ương, năm 2020 Việt Nam có trên 90% dân số mắc các bệnh về răng miệng, tập trung ở các bệnh như sâu răng, viêm nướu răng, viêm quanh răng và 75 % dân số bị sâu răng, trong đó trung bình 45 tuổi đã mất hơn 6 răng. Có hơn 80% người cao tuổi và người trưởng thành có sâu răng vĩnh viễn; hơn 60% trẻ em và hơn 80% người lớn có viêm lợi, viêm quanh lợi,..; hơn 30% người trưởng thành trở lên có túi mủ bệnh lý quanh chân răng, nguyên nhân làm cho răng lung lay và cũng là ổ vi khuẩn sinh sôi<sup>14</sup>.

Theo nghiên cứu năm 2020 của tác giả Nguyễn Thị Hồng Minh và các cộng sự, trẻ em Việt Nam ở nhóm tuổi 12 - 15 trung bình mỗi trẻ có một đến hai răng sâu không được điều trị, tỷ lệ sâu răng sữa ở nhóm tuổi 6-8 tuổi chiếm tới 86,4% trung bình mỗi trẻ có 6,21 răng bị sâu<sup>15</sup>.

Nhóm tác giả Phạm Thị Thanh Mai đã nghiên cứu tình trạng sức khỏe răng miệng và nhu cầu điều trị của bệnh nhân đến khám tại Khu thực hành Nha khoa tổng quát - Khoa Răng Hàm Mặt, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh dựa trên mô tả hồi cứu 595 dữ liệu về tình trạng sức khỏe răng miệng của bệnh nhân ( $\geq$  18 tuổi) đến khám và điều trị từ năm 2017 - 2020. Kết quả cho thấy tỷ lệ bệnh nhân không có thói quen thăm khám răng miệng định kỳ chiếm 91,43%. Đau răng là triệu chứng than phiền nhiều nhất (63,87%). Về tình trạng sức khỏe răng miệng, đa số là viêm nướu (95,13%) và sâu răng (93,28%); mất răng chiếm 64,36%. Nhu cầu điều trị nha chu chiếm tỷ lệ cao nhất (99,83%), chủ yếu là lấy cao răng (84,04%). Nhu cầu trám do sâu (87,90%), nhổ răng do sâu (34,45%) và điều trị tủy (32,77%)<sup>16</sup>.

# 1.1.2. Các phương pháp điều trị nội nha

Điều trị nội nha hay thường áp dụng nhất là điều trị tủy răng được thực hiện bởi bác sĩ chuyên khoa làm trong ngành nội nha.

Viêm tủy răng được phân thành ba giai đoạn: viêm tủy có khả năng hồi phục, viêm tủy cấp không hồi phục và viêm tủy hoại tử. Để điều trị tủy răng một cách hiệu quả, bác sĩ cần đánh giá chính xác tình trạng hồi phục của viêm tủy. Đối với viêm tủy có khả năng hồi phục, việc điều trị nguyên nhân gây viêm sẽ giúp cải thiện các triệu chứng của viêm tủy cấp. Đồng thời, bệnh nhân sẽ được kê đơn thuốc nhằm giảm cơn đau. Trong trường hợp viêm tủy không có khả năng hồi phục hoặc khi tủy đã hoại tử, bác sĩ sẽ tiến hành loại bỏ tủy răng và làm sạch ống tủy để loại bỏ hoàn toàn cấu trúc bị viêm nhiễm. Đối với những trường hợp nghiêm trọng hơn, việc nhổ bỏ răng có thể được chỉ định để loại bỏ các phần viêm nhiễm lan ra khỏi chóp chân răng. Trong những năm gần đây, nghiên cứu trong lĩnh vực nội nha đã có những bước tiến lón, đặc

biệt là về vật liệu và công nghệ.

Trám răng hay còn được gọi là hàn răng - một kỹ thuật nha khoa dùng vật liệu nhân tạo để bổ sung vào mô răng bị thiếu. Không chỉ hoàn thiện thẩm mỹ mà phương pháp này còn giúp cho bệnh nhân cải thiện chức năng nhai. Các vật liệu sinh học tiên tiến, bao gồm chất trám bít gốc canxi silicat (bioceramic sealers), đang được ưa chuộng nhờ tính chất sinh học và khả năng kháng khuẩn cao. Những vật liệu này không chỉ cải thiện khả năng hàn/trám kín ống tủy mà còn hỗ trợ trong việc tái tạo mô, giúp kéo dài tuổi thọ của răng đã điều trị.

Kỹ thuật điều trị ứng dụng sóng siêu âm và lase sử dụng thiết bị công nghệ tiên tiến hơn trong việc làm sạch và tạo hình ống tủy đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi, ví dụ, hệ thống GentleWave sử dụng sóng siêu âm để loại bỏ mô chết và vi khuẩn, đạt hiệu quả cao trong việc làm sạch ống tủy mà không cần can thiệp phẫu thuật nhiều<sup>17</sup>.

*Kỹ thuật phục hồi mô* (hay can thiệp tái tạo mô, phục hồi mô tủy răng) trong điều trị nội nha được áp dụng nhằm phục hồi chức năng của tủy răng và các cấu trúc xung quanh. Kỹ thuật này bao gồm việc sử dụng các vật liệu sinh học, tế bào gốc, hoặc các yếu tố tăng trưởng để kích thích sự phát triển của mô răng và tái tạo các cấu trúc bị tổn thương. Các giải pháp này không chỉ điều trị viêm tủy mà còn giúp phục hồi chức năng của răng, đồng thời bảo vệ răng khỏi sự mất mát và tổn thương thêm. Lợi ích của kỹ thuật phục hồi mô giúp cải thiện khả năng sống và chức năng của răng, giảm nguy cơ mất răng và các biến chứng liên quan, từ đó hỗ trợ quá trình lão hóa khỏe mạnh bằng cách duy trì sự ổn định của sức khỏe răng miệng. Tuy nhiên, việc áp dụng giải pháp phục hồi mô trong điều trị nội nha vẫn đối mặt với một số thách thức. Các vấn đề như chi phí cao và yêu cầu kỹ thuật cao có thể hạn chế khả năng tiếp cận và hiệu quả của phương pháp này<sup>18</sup>.

Nhìn chung, tùy vào tình trạng bệnh nhân và điều kiện sẵn có mà các phương pháp khác nhau được sử dụng hoặc kết hợp trong điều trị nội nha. Tuy nhiên, phương pháp điều trị nội nha bằng tái tạo mô đang trở thành hướng nghiên cứu cấp thiết và quan trọng nhờ vào các ưu điểm nổi trội. Các phương pháp điều trị nội nha truyền thống thường chỉ tập trung vào việc loại bỏ mô bị nhiễm trùng mà không khôi phục chức năng của tủy răng hoặc các cấu trúc xung quanh, điều này có thể dẫn đến việc mất răng và các biến chứng liên quan. Kỹ thuật tái tạo mô giúp khôi phục cả cấu trúc và chức năng của răng, từ đó bảo tồn răng bị tổn thương, giảm nguy cơ mất răng và các vấn đề liên quan đến sức khỏe răng miệng. Đặc biệt, phương pháp này hỗ trợ quá trình lão hóa khỏe mạnh bằng cách duy trì được răng thật, điều này rất quan trọng đối với người cao tuổi, người dễ bị mất răng và gặp phải các vấn đề về sức khỏe răng miệng. Sự phát triển của công nghệ sinh học và vật liệu mới mở ra cơ hội lớn cho việc ứng dụng các kỹ thuật tái tạo mô trong điều trị nội nha. Nghiên cứu và phát triển các phương pháp này không chỉ giúp cải thiện kết quả điều trị mà còn nâng cao chất lượng cuộc sống của bệnh nhân, đồng thời giảm tỷ lệ thất bại điều trị và tăng cường sự hài lòng của người bệnh.

#### 1.2. Giới thiệu về Alginate

#### 1.2.1. Cấu trúc của Alginate

Alginate là một polysaccharide tự nhiên, có nguồn gốc từ thành tế bào của tảo nâu (*Phaeophyceae*), một trong những vật liệu sinh học sóm được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi. Được chiết xuất lần đầu tiên vào năm 1881 bởi nhà hóa học người Anh Edward C.C. Stanford, alginate nhanh chóng thu hút sự chú ý của giới khoa học bởi khả năng tạo gel độc đáo khi tiếp xúc với các ion divalent như canxi. Những nghiên cứu ban đầu tập trung vào việc khai thác alginate trong ngành công nghiệp thực phẩm, dệt may và giấy. Tuy nhiên, tiềm năng y sinh học của alginate bắt đầu được khám phá mạnh mẽ hơn vào những năm 1960. Các nghiên cứu tiên phong của Andrady và cộng sự (1980) đã chứng minh khả năng tương thích sinh học cao của alginate và khả năng tạo gel trong môi trường sinh lý, mở ra hướng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh như băng vết thương, hệ thống dẫn thuốc và kỹ thuật mô<sup>19</sup>. Đặc biệt, nghiên cứu của Martinsen và cộng sự (1989) đã đưa ra phương pháp đóng gói tế bào sống trong gel alginate, mở đường cho các ứng dụng trong liệu pháp tế bào và kỹ thuật mô<sup>20</sup>.

Alginate thuộc họ polymer polysaccharide tự nhiên. Cấu trúc cơ bản của alginate là một copolymer tuyến tính được tạo thành từ hai đơn vị monome chính:  $\beta$ -D-mannuronate (M) và  $\alpha$ -L-guluronate (G) (Hình 1.2). Hai đơn vị này được liên kết với nhau thông qua liên kết glycosidic  $\beta(1\rightarrow 4)^{21}$ .



Hình 1.2. Cấu trúc đơn vị monomer và các khối phân bố của muối Alginate<sup>22</sup>

Cấu trúc của alginate không chỉ đơn giản là một chuỗi ngẫu nhiên của các đơn vị M và G. Sự phân bố của chúng tạo thành các khối khác biệt, đóng vai trò quan trọng trong việc quyết định tính chất của alginate. Cụ thể:

Khối G (G-blocks): là các đoạn chuỗi dài của các đơn vị α-L-guluronate liên tiếp. Khối G có cấu trúc "hộp trứng" (egg-box) <sup>23</sup> khi liên kết với các ion divalent, đặc biệt là canxi, tạo thành gel alginate mạnh và ổn định. Sự hiện diện của các khối G cao dẫn đến gel có độ cứng cao hơn.

Khối M (M-blocks): là các đoạn chuỗi dài của các đơn vị β-D-mannuronate liên tiếp. Khối M tạo ra gel mềm và linh hoạt hơn so với khối G<sup>23</sup>. Các khối M có xu hướng tạo ra gel yếu hơn do khả năng liên kết ion kém hơn.

Khối MG (MG-blocks): là các đoạn chuỗi xen kẽ của các đơn vị M và G. Khối MG tạo ra gel có tính chất trung gian giữa khối G và khối M. Sự phân bố của các khối MG ảnh hưởng đến tính đồng nhất và độ đàn hồi của gel.

Sự phân bố của các khối G, M và MG trong chuỗi alginate phụ thuộc vào nguồn gốc của tảo nâu và phương pháp chiết xuất. Điều này dẫn đến sự khác biệt về chất vật lý và hóa học của alginate, bao gồm độ nhớt, khả năng tạo gel và tính chọn lọc ion. Đặc biệt, khối G có khả năng liên kết mạnh mẽ với các ion divalent như canxi, tạo thành gel alginate thông qua liên kết ngang ion.

Trong các nghiên cứu khoa học gần đây, alginate tiếp tục chứng minh vai trò đa năng và tiềm năng ứng dụng rộng rãi. Đặc biệt, nó được khai thác mạnh mẽ trong lĩnh vực kỹ thuật mô và y học tái tạo, nơi mà khả năng tạo gel ba chiều của alginate tạo môi trường thuận lợi cho sự phát triển và biệt hóa của tế bào. Các nghiên cứu tập trung vào việc tạo ra các khung giàn alginate có cấu trúc nano, tăng cường khả năng tương tác tế bào và thúc đẩy quá trình tái tạo mô. Bên cạnh đó, alginate cũng được sử dụng để phát triển các hệ thống phân phối thuốc thông minh, cho phép kiểm soát việc giải phóng thuốc theo thời gian và không gian. Trong lĩnh vực thực phẩm và công nghệ sinh học, alginate được ứng dụng để tạo ra các vi hạt hoặc viên nang, bảo vệ các hợp chất sinh học nhạy cảm khỏi các yếu tố môi trường và kiểm soát quá trình giải phóng chúng.

# 1.2.2. Tính chất cơ bản của alginate

 Độ nhớt: Độ nhớt của alginate chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, trong đó khối lượng phân tử và tỷ lệ M/G đóng vai trò then chốt. Theo Lee và Mooney, độ nhớt của alginate tăng đáng kể khi khối lượng phân tử tăng, đồng thời, tỷ lệ G cao hơn dẫn đến dung dịch có độ nhớt cao hơn do khả năng tạo liên kết ngang mạnh mẽ hơn của các khối guluronate<sup>24</sup>. Các nghiên cứu sớm hơn cũng nhấn mạnh ảnh hưởng của các ion đa hóa trị, đặc biệt là canxi, đối với độ nhớt alginate. Theo công bố của Augst, Kong và Mooney, sự hiện diện của ion canxi dẫn đến sự hình thành gel thông qua liên kết ion, gây ra sự gia tăng đáng kể độ nhớt và tạo ra các cấu trúc gel có tính chất cơ học được điều chỉnh<sup>25</sup>. Độ nhớt cao này gây ra các thách thức trong quá trình xử lý, như khó khăn trong việc bơm, trộn, và tạo hình vật liệu, đặc biệt trong các ứng dụng vi mô hoặc yêu cầu độ chính xác về cấu trúc. Ảnh hưởng tiêu cực đến khả năng sống của tế bào cũng là vấn đề đáng lưu tâm; sự phân bố tế bào đồng đều trong ma trận alginate trở nên khó khăn, và lực cắt lớn cần thiết cho quá trình trộn lẫn có thể gây tổn thương tế bào. Bên cạnh đó, độ nhớt cao cũng hạn chế sự khuếch tán của các chất, bao gồm thuốc, qua gel alginate, làm giảm hiệu quả phân phối.

• Khả năng tạo gel: Cơ chế tạo gel của alginate dựa trên sự tương tác ion, chủ yếu với ion Ca<sup>2+</sup> tạo nên một mạng lưới polymer ba chiều. Khi dung dịch alginate tiếp xúc với ion canxi, các chuỗi polymer alginate, đặc biệt là các khối guluronate (G-blocks), liên kết chéo với nhau. Điều này xảy ra thông qua việc các ion canxi lấp đầy không gian giữa các chuỗi guluronate làm ổn định mạng lưới gel (Hình 1.3).



Hình 1.3. Quá trình tạo gel của alginate<sup>26</sup>

• Khả năng tương thích sinh học: Alginate thể hiện tính tương thích sinh học cao, một đặc tính cốt yếu cho các ứng dụng y sinh học. Nguồn gốc tự nhiên của alginate giúp giảm thiểu rủi ro phản ứng phụ so với các vật liệu tổng hợp. Bản chất không độc hại của alginate được chứng minh qua sự giảm thiểu phản ứng viêm khi tiếp xúc với mô sống, tạo điều kiện thuận lợi cho sự ổn định sinh học. Khả năng phân hủy sinh học từng phần, mặc dù không hoàn toàn trong môi trường cơ thể người, cho phép

alginate dần dần được thay thế bởi mô nội sinh<sup>27</sup>. Bên cạnh đó, tính linh hoạt trong thiết kế vật liệu, cùng khả năng điều chỉnh tính chất cơ học và tốc độ phân hủy, mở rộng phạm vi ứng dụng của alginate trong kỹ thuật mô, phân phối thuốc, và liệu pháp vết thương.

# 1.3. Tổng quan về pluronic F127

#### 1.3.1. Cấu trúc và đặc điểm tạo gel của pluronic F127

Pluronic F127, một copolymer triblock, được cấu thành từ ba khối polymer riêng biệt liên kết chặt chẽ với nhau. Cụ thể, phân tử này bao gồm hai khối poly(ethylene oxide) (PEO) ưa nước ở hai đầu và một khối poly(propylene oxide) (PPO) kỵ nước ở trung tâm (Hình 1.4). Các khối PEO có khả năng hòa tan cao trong nước do sự hiện diện của nhiều nhóm ether (-O-) tạo liên kết hydro với phân tử nước. Trong khi đó, khối PPO kỵ nước hơn do chứa nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>). Sự sắp xếp theo cấu trúc PEO-PPO-PEO tạo ra một phân tử lưỡng tính với cả phần ưa nước và kỵ nước. Công thức hóa học của Pluronic F127 là HO(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>a</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)<sub>b</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>a</sub>H, trong đó a và b lần lượt là số đơn vị lặp lại trong chuỗi PEO và PPO. Với số lượng lớn đơn vị PEO so với PPO, Pluronic F127 thể hiện tính hòa tan cao trong nước.



Hình 1.4. Cấu trúc Pluronic F127

Trong môi trường dung dịch nước, các phân tử Pluronic F127 tự tổ chức để giảm thiểu sự tiếp xúc giữa khối PPO kỵ nước và nước, dẫn đến sự hình thành micelle. Trong cấu trúc này, các khối PPO tập hợp lại tạo lõi kỵ nước, còn các khối PEO tạo lớp vỏ ưa nước bao quanh lõi.

Quá trình hình thành gel của Pluronic F127 diễn ra thông qua một cơ chế phức tạp, chịu sự chi phối của sự tương tác giữa các khối PPO kỵ nước và PEO ưa nước trong môi trường dung dịch. Ở nhiệt độ thấp, các phân tử Pluronic F127 tự sắp xếp để tạo thành micelle, với lõi là tập hợp các khối PPO và lớp vỏ là các khối PEO tiếp xúc với nước. Sự hình thành micelle này giúp tối thiểu hóa sự tiếp xúc giữa các khối PPO kỵ nước và môi trường nước, qua đó tăng cường tính ổn định của hệ thống. Khi nhiệt độ tăng, độ hòa tan của khối PPO giảm xuống, làm tăng cường tương tác kỵ nước giữa các micelle. Kết quả là, các micelle tập hợp lại, tạo thành một mạng lưới ba chiều, dẫn đến sự gia tăng độ nhớt của dung dịch và hình thành gel<sup>28</sup>. Hiện tượng này được biết đến như quá trình chuyển đổi sol-gel.



Hình 1.5. Quá trình tạo gel dưới ảnh hưởng nhiệt độ của F12729

Nhiệt độ đóng vai trò quyết định trong quá trình hình thành gel của Pluronic F127. Ở nhiệt độ thấp, dung dịch duy trì trạng thái lỏng. Khi nhiệt độ đạt đến một ngưỡng cụ thể, được gọi là nhiệt độ gel hóa, dung dịch chuyển sang trạng thái gel. Đáng chú ý, nhiệt độ gel hóa phụ thuộc vào nồng độ của Pluronic F127; nồng độ càng cao, nhiệt độ gel hóa càng thấp. Nồng độ của Pluronic F127 cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình này. Ở nồng độ thấp, gel có thể không hình thành ngay cả khi nhiệt độ tăng. Khi nồng độ tăng, số lượng micelle tăng lên, dẫn đến sự gia tăng tương tác kỵ nước và hình thành mạng lưới gel. Nồng độ cao hơn tạo ra gel với độ cứng cao hơn.

# 1.3.2. Úng dụng của Pluronic F127 trong ngành y sinh

Với những đặc tính lý hóa đặc trưng, F127 đóng vai trò quan trọng trong nhiều ứng dụng của ngành y sinh hiện đại. Khả năng tạo gel thuận nghịch theo nhiệt độ của nó mở ra tiềm năng lớn trong việc phát triển các hệ thống phân phối thuốc tiên tiến. Khi được tích hợp vào mạng lưới gel, thuốc có thể được giải phóng một cách kiểm soát, giúp duy trì nồng độ ổn định trong cơ thể và tối ưu hóa hiệu quả điều trị. Đặc biệt, khả năng hình thành micelle của F127 còn giúp tăng cường độ hòa tan của các loại thuốc kỵ nước, từ đó mở rộng phạm vi ứng dụng của chúng.

Trong lĩnh vực kỹ thuật mô và tái tạo mô, F127 được sử dụng như một vật liệu giàn giáo, tạo môi trường lý tưởng cho sự phát triển và phân hóa của tế bào. Cấu trúc gel độc đáo của nó cung cấp sự hỗ trợ cơ học và môi trường dinh dưỡng cần thiết cho tế bào. Ngoài ra, tính tương thích sinh học cao của vật liệu này giúp giảm thiểu nguy cơ kích ứng. Có thể kể tới 1 số ứng dụng như: trong nhãn khoa, F127 giúp kéo dài thời gian lưu trú của thuốc trên bề mặt mắt, cải thiện hiệu quả điều trị nhờ khả năng tạo gel; trong điều trị bỏng, F127 tạo ra các gel giữ ẩm, bảo vệ vết thương và thúc đẩy quá trình tái tạo da<sup>30</sup>.

# 1.4. Tổng quan về bioglass

# 1.4.1. Tổng quan về bioglass 58S

Bioglass 58S là cải tiến của vật liệu thủy tinh sinh học, nổi bật với thành phần hóa học được tối ưu hóa với tỷ lệ mol thành phần khoảng 58% SiO<sub>2</sub>, 33% CaO và 9% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Tỷ lệ này đóng vai trò quyết định trong việc hình thành cấu trúc mạng lưới silica và sự phân bố của các ion, từ đó ảnh hưởng đến tính chất vật lý, hóa học và sinh học của vật liệu. Cấu trúc mạng lưới silica của Bioglass 58S cho phép sự tương tác linh hoạt với môi trường sinh học, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình hình thành hydroxyapatite (HA) trên bề mặt khi tiếp xúc với dịch sinh học. Quá trình điều chế, bao gồm phương pháp sol-gel và nung chảy, có ảnh hưởng đáng kể đến cấu trúc và tính chất của Bioglass 58S, đặc biệt là độ xốp và kích thước hạt<sup>10</sup>.

Về tính chất vật lý, BG 58S thường được điều chế dưới dạng bột hoặc hạt, với kích thước và độ xốp có thể được kiểm soát thông qua quá trình sản xuất. Độ xốp của vật liệu này đóng vai trò quan trọng trong việc tạo điều kiện cho sự xâm nhập của tế bào và sự hình thành mạch máu, từ đó thúc đẩy quá trình tái tạo mô. Độ bền cơ học của BG 58S, mặc dù không cao như vật liệu kim loại hay gốm sứ truyền thống, nhưng vẫn đủ đáp ứng cho nhiều ứng dụng trong tái tạo xương và mô mềm.

Khi tiếp xúc với dịch cơ thể, BG 58S giải phóng các ion canxi, natri và phosphate, tạo môi trường kiềm cục bộ và kích thích sự hình thành lớp hydroxyapatite (HA) trên bề mặt. Lớp HA này có thành phần tương tự như khoáng chất trong xương tự nhiên, giúp tạo liên kết hóa học với mô xương và thúc đẩy quá trình tái tạo. Khả năng hòa tan của vật liệu cũng đóng vai trò quan trọng, vì quá trình hòa tan kiểm soát tốc độ giải phóng các ion và ảnh hưởng đến tốc độ hình thành HA. Ngoài ra, các ion giải phóng từ BG 58S có thể ảnh hưởng đến hoạt động của tế bào, kích thích sự phát triển và biệt hóa của tế bào xương, cũng như quá trình tạo mạch máu<sup>31</sup>.

#### 1.4.2. Phương pháp điều chế

Bioglass 58S có thể được điều chế bằng nhiều phương pháp khác nhau, trong đó phương pháp sol-gel và phương pháp nung chảy (melt-quenching) là hai phương pháp phổ biến nhất.

> Phương pháp Sol-gel: phương pháp này mang lại ưu điểm về độ tinh khiết, diện tích bề mặt riêng và độ xốp, đồng thời cho phép điều chế vật liệu ở nhiệt độ tương đối thấp, mặc dù quy trình có phần phức tạp và chi phí nguyên liệu cao (Hình 1.6). Bước đầu trong quy trình là chuẩn bị

dung dịch tiền chất, trong đó các tiền chất như TEOS, canxi nitrat và triethyl phosphate được hòa tan trong ethanol, với tỷ lệ mol được kiểm soát chính xác và bổ sung chất xúc tác như axit nitric. Tiếp theo, phản ứng thủy phân và ngưng tụ diễn ra, trong đó các tiền chất silicat tạo thành mạng lưới oxit silic, kết hợp với các ion canxi và phốt phát. Quá trình này dẫn đến sự hình thành gel, gel sau đó được sấy khô để loại bỏ dung môi và nung kết ở nhiệt độ cao.



Hình 1.6. Quy trình sol-gel điều chế bioglass<sup>32</sup>

Phương pháp nung chảy: là quy trình nhiệt đơn giản nhưng hiệu quả, được sử dụng để điều chế bioglass bằng cách nung chảy hỗn hợp các oxit hoặc cacbonat ở nhiệt độ cao, sau đó làm nguội nhanh để tạo thành thủy tinh. Quá trình bắt đầu bằng việc trộn lẫn các tiền chất theo tỷ lệ mol mong muốn để đạt được thành phần. Hỗn hợp này được nung nóng trong lò nung ở nhiệt độ cao, thường trên 1300°C, cho đến khi tan chảy hoàn toàn. Sau đó, chất lỏng nóng chảy được làm nguội nhanh chóng, chẳng hạn như bằng cách đổ vào khuôn kim loại lạnh hoặc lăn qua các con lăn làm lạnh, để ngăn chặn sự kết tinh và tạo thành cấu trúc thủy tinh vô định hình (Hình 1.7). Mặc dù phương pháp này có ưu điểm về quy trình đơn giản và khả năng sản xuất hàng loạt, nhưng việc kiểm soát chính xác thành phần và cấu trúc của vật liệu có thể gặp khó khăn, và sản phẩm thường có diện tích bề mặt riêng thấp và độ xốp nhỏ hơn so với

phương pháp sol-gel.



Hình 1.7. Quy trình nung chảy điều chết bioglass<sup>32</sup>

#### 1.5. Tổng quan về dopamine

#### 1.5.1. Cấu trúc của dopamine

Dopamine là một hợp chất hữu cơ có công thức hóa học C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>, bao gồm một vòng catechol-một vòng benzen mang hai nhóm hydroxyl ở vị trí ortho liên kết với chuỗi ethylamine. Cấu trúc này tạo nên tính chất phân cực và khả năng tương tác đa dạng của dopamine với các phân tử khác thông qua liên kết hydro và tương tác  $\pi$ - $\pi$ .



Hình 1.8. Quá trình oxi hóa dopamine

Nhóm catechol trong dopamine dễ bị oxy hóa thành dạng quinone trong môi trường giàu oxy hoặc dưới sự xúc tác của các tác nhân oxy hóa (Hình 1.8). Quá trình oxy hóa này mở đường cho các phản ứng liên kết cộng hóa trị như phản ứng Schiff base hoặc Michael addition với các nhóm chức có mặt trong polymer hoặc mô sinh học<sup>33</sup>. Bên cạnh đó, dopamine còn tham gia vào các liên kết không cộng hóa trị như liên kết hydro và tương tác tĩnh điện, góp phần tạo nên mạng lưới liên kết đa chiều trong vật liệu.

#### 1.5.2. Khả năng tạo liên kết hóa học và củng cố mạng lưới hydrogel

Dopamine đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành liên kết chéo trong các hệ polymer chức năng. Dopamine còn có thể được biến tính thông qua gắn các nhóm chức khác như acrylate hoặc PEG, nhằm tăng cường khả năng tương tác và điều chỉnh đặc tính vật liệu. Tính tương thích sinh học cao và khả năng bám dính mạnh mẽ giúp dopamine trở thành thành phần thiết yếu trong thiết kế các vật liệu hướng đích, các hệ hydrogel chức năng và các vật liệu tái tạo mô, góp phần cải thiện hiệu quả điều trị và khả năng tương tác với môi trường sinh học.

Cụ thể, dopamine có khả năng tạo liên kết chéo hiệu quả thông qua xúc tác của

enzyme HRP. Trong phản ứng này, HRP xúc tác quá trình oxy hóa nhóm catechol của dopamine thành các gốc tự do dạng quinone hoặc các gốc phenoxy, từ đó thúc đẩy phản ứng kết nối cộng hóa trị giữa các phân tử dopamine hoặc giữa dopamine với các dẫn xuất chứa nhóm chức tương thích như amino, thiol hoặc hydroxyl<sup>34</sup> (Hình 1.9). Quá trình tạo liên kết chéo này không chỉ giúp hình thành mạng polymer ba chiều bền vững mà còn góp phần cải thiện tính cơ học và khả năng đàn hồi của vật liệu. Ngoài ra, việc sử dụng HRP làm xúc tác cho phép kiểm soát phản ứng liên kết chéo diễn ra nhẹ nhàng trong điều kiện sinh lý, phù hợp với các ứng dụng trong y sinh học và tái tạo mô.



Hình 1.9. Hydrogel cellulose carboxymethyl biến tính dopamine (CMC-DA) được liên kết chéo bởi enzyme HRP<sup>34</sup>

# 1.6. Tổng quan về hemin

Hemin, còn được biết đến với tên gọi clorohemin, là một phức chất sắt porphyrin có vai trò sinh học thiết yếu. Cấu trúc hóa học của hemin bao gồm một ion sắt (Fe<sup>3+</sup>) nằm ở trung tâm của vòng porphyrin, liên kết với một ion clorua, tạo nên màu đỏ sẫm đặc trưng (Hình 1.8). Do tính chất này, hemin thể hiện tính không tan trong nước ở môi trường pH trung tính, nhưng lại có khả năng hòa tan trong các dung dịch kiềm hoặc axit. Sự hòa tan này phụ thuộc vào sự tương tác giữa ion sắt và các phối tử trong dung dịch.

Hemin có thể được chiết xuất từ máu động vật hoặc tổng hợp hóa học. Quá trình chiết xuất từ máu đòi hỏi các bước tinh chế nghiêm ngặt để đảm bảo độ tinh khiết và an toàn của sản phẩm.

Trong lĩnh vực y học, hemin được ứng dụng để điều trị một số bệnh lý liên quan đến rối loạn chuyển hóa porphyrin, đặc biệt là porphyria cấp tính ngắt quãng (AIP). AIP là một bệnh di truyền hiếm gặp gây ra các cơn đau bụng, rối loạn thần kinh và các triệu chứng khác do sự tích tụ của các tiền chất porphyrin. Hemin hoạt động bằng cách ức chế enzyme ALA synthase, giúp giảm sản xuất các tiền chất porphyrin và làm giảm triệu chứng của bệnh. Ngoài ra, hemin cũng đang được nghiên cứu về tiềm năng ứng dụng trong điều trị các bệnh lý khác như ung thư và các bệnh thần kinh, dựa trên khả



Hình 1.10. Cấu trúc hemin

Hemin thể hiện hoạt tính sinh học, sở hữu trung tâm xúc tác tương đồng với HRP<sup>36</sup>. Đặc tính xúc tác ưu việt của hemin đã thu hút sự quan tâm đáng kể trong lĩnh vực nghiên cứu các enzyme mô phỏng peroxidase. Thông qua tiếp cận "từ dưới lên", các nhà nghiên cứu đã thiết kế thành công các chất xúc tác mô phỏng peroxidase dựa trên cấu trúc của hemin. Phương pháp này không chỉ tái hiện các chức năng xúc tác mà còn tái tạo các vị trí hoạt động đặc trưng của peroxidase tự nhiên, từ đó mở ra những hiểu biết sâu sắc hơn về cơ chế hoạt động và nguồn gốc tiến hóa của các enzyme tự nhiên.

Trong điều kiện có mặt chất oxy hóa như H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hemin xúc tác quá trình oxy hóa nhóm catechol của dopamine thành quinone hoạt hóa, từ đó thúc đẩy hình thành liên kết chéo cộng hóa trị giữa các phân tử dopamine hoặc giữa dopamine và các polymer chức năng. Cơ chế này giúp hình thành mạng lưới polymer bền vững và tăng cường tính chất cơ học của hydrogel.

# 1.7. Tổng quan về tình hình nghiên cứu

#### 1.7.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Lĩnh vực nghiên cứu nội nha trên thế giới đang ngày càng tập trung vào việc phát triển các phương pháp điều trị an toàn, hiệu quả, ít gây đau đớn cho bệnh nhân. Các nhà khoa học nỗ lực tập trung vào việc nghiên cứu khả năng tái tạo 1 phần hoặc toàn bộ chiếc răng hư tổn từ kỹ thuật vật liệu tế bào gốc, vật liệu sinh học, scaffolds, sinh trưởng tế bào. Trong đó, các hệ vật liệu phát triểu từ nguồn gốc canxi silicat, bioglass đã nhận được sự quan tâm đáng kể từ các nhà khoa học.

Trong lĩnh vực sử dụng vật liệu sinh học nghiên cứu ứng dụng điều trị nội nha, các nhà khoa học tập trung chính vào các nhóm vật liệu chính như vật liệu có nguồn gốc tự nhiên (chitosan, elastin, collagen,..), cấu trúc nền ECM-ma trận ngoại bào và vật liệu tổng hợp. Do những hạn chế trong việc ứng dụng vật liệu nguồn gốc từ tự nhiên như tính sẵn có hạn chế và khả năng nhiễm bệnh từ vị trí lấy tế bào, các polymer tổng hợp như polylactic acid (PLA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polyglycolic acid (PGA) được ưa chuộng và ứng dụng rộng rãi hơn<sup>3</sup>. Việc kết hợp hệ

poymer và các nano ions kim loại cũng được nghiên cứu tiền lâm sàng trên mô hình động vật và cho thấy nhiều tiềm năng trong việc tái tạo mô răng.

Composite HA-BG từ hydroxyapatite và bioglass tổng hợp bằng nhiều kỹ thuật khác nhau bao gồm sol-gel, đồng kết tủa được chứng minh kết hợp được ưu điểm của HA và BG, thúc đẩy tăng trưởng tế bào xương tốt hơn so với HA hoặc BG đơn lẻ<sup>37</sup>. Ngoài tái tạo, vật liệu từ bioglass có khả năng điều trị bệnh khi kết hợp với thuốc thích hợp.

Năm 2019, M. Ravanbakhsh và cộng sự công bố hệ Mesoporous bioglass (MBGs) được nạp thuốc doxorubicin để cung cấp thuốc chống ung thư, hỗ trợ sự hình thành mô xương mới<sup>38</sup> (Hình 1.11). Kết quả cho thấy MBGs có diện tích bề mặt lớn (~300 m²/g), đảm bảo khả năng tải thuốc cao, kích thước lỗ xốp trung bình khoảng 4-6 nm, phù hợp cho việc nạp và phóng thích thuốc. Các thử nghiệm trên mô hình chuột bị ung thư xương cho thấy MBGs giảm kích thước khối u đáng kể và thúc đẩy quá trình tái tạo mô xương tại vị trí khối u, khả năng tải DOX lên đến 25% trọng lượng<sup>38</sup>.



Hình 1.11. Hình ảnh SEM về sự hình thành hydroxycarbonated apatite trên bề mặt các hạt MBG sau 5 ngày trong SBF<sup>38</sup>

Theo nghiên cứu của Purohit và cộng sự năm 2019, scaffold nanocomposite bao gồm gelatin, alginate và nanoceria tăng cường khả năng gắn kết, tăng sinh khả năng sống của tế bào xương, răng, thúc đẩy biệt hóa tế bào, có đặc tính bắt gốc tự do, giảm quá trình oxy hóa<sup>4</sup>. Khả năng tồn tại của tế bào biệt hóa xương, răng MG63 trên scaffolds Gelatin-alginate và Gelatin-alginate-nanoceria cho thấy khả năng tồn tại của tế bào tăng dần theo thời gian, sau 7 ngày gieo hạt tế bào, các mẫu đều cho thấy khả năng sống của tế bào trên 150%<sup>4</sup> (Hình 1.12).



Hình 1.12. Đặc tính sinh học của scaffold GA và GA-NCs: Khả năng sống sót tế bào được đánh giá bằng phương pháp phân tích MTT (A), sự tăng sinh tế bào được định lượng bằng phương pháp phân tích Picogreen (B), hình ảnh huỳnh quang của scaffold biểu thị tế bào sống/chết (C)<sup>4</sup>

Cuối năm 2020 trên tạp chí Biomaterials, Yosif Almoshari công bố kết quả nghiên cứu phát triển đánh giá hiệu quả của hydrogel Pluronic có chứa chất ức chế GSK3 trong việc giảm thiểu tổn thương mô nha chu liên quan đến viêm nha chu<sup>5</sup>. Hệ gel từ pluronic được nạp GSK3 tạo hệ dẫn truyền thuốc giúp nhắm đích và giải phóng thuốc tại các vùng xương răng bị ảnh hưởng. Thử nghiệm lâm sàng và mô học được thực hiện đánh giá mức độ tổn thương mô và hiệu quả của điều trị, các chỉ số như độ sâu vết thương, mức độ tiêu xương và viêm nhiễm. Kết quả cho thấy hệ làm giảm đáng kể độ sâu túi nha chu, giảm sự tiêu xương cũng như mức độ viêm và tổn thương mô liên kết, thúc đẩy quá trình phục hồi mô xương răng<sup>5</sup>.

#### 1.7.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Xu hướng nghiên cứu tại Việt Nam về lĩnh vực chữa lành tổn thương xương, răng bằng vật liệu sinh học đang chứng kiến sự phát triển mạnh mẽ. Các nghiên cứu trong nước thể hiện sự đa dạng trong phương pháp tiếp cận, tập trung vào việc ứng dụng các vật liệu tiên tiến nhằm nâng cao hiệu quả điều trị. Cụ thể, các nhà khoa học Việt Nam đặc biệt quan tâm đến việc sử dụng hydrogel và nanogel, những vật liệu có khả năng tạo môi trường ẩm, hỗ trợ sự phát triển của tế bào và thúc đẩy quá trình tái tạo mô, các hướng chính: hydrogel-nanogel, bioglass, vật liệu nano composite có khả năng giải phóng thuốc, tăng khoáng hóa. Từ năm 2016, nhóm nghiên cứu của PGS.TS Trần Ngọc Quyển (Viện Khoa học vật liệu ứng dụng) đã công bố nhiều loại hydrogel hay nanocomposite hydrogel về lĩnh vực trên:

- Hydrogel dạng tiêm kết hợp gelatin-PEG (polyethylene glyco) kết hợp các hạt

nano canxi phosphate có khả năng tạo môi trường hỗ trợ tái tạo xương, tạo cấu trúc tại vị trí cấy ghép nhờ khả năng tiêm tốt<sup>39</sup>. Hydrogel này được tạo thành nhanh chóng trong vài giây nhờ sự xúc tác của enzyme horseradish peroxidase và hydrogen peroxide. Khi kết hợp với các hạt nano canxi photphat lưỡng pha (biphasic calcium phosphate), bao gồm hydroxyapatite và  $\beta$ -tricalcium phosphate, hydrogel tạo thành một vật liệu composite có khả năng tiêm. Trong thí nghiệm in vitro, sau 2 tuần ngâm trong dung dịch mô phỏng dịch cơ thể (simulated body fluid), bề mặt của hydrogel composite cho thấy sự hình thành khoáng chất sinh học

- Năm 2020, nhóm công bố nghiên cứu vật liệu bao gồm các microspheres từ PLGA, có đường kính trung bình 50-100 μm, với cấu trúc xốp giúp cải thiện khả năng giải phóng thuốc Simvastatin kiểm soát và hỗ trợ cấu trúc xương. Vật liệu này không chỉ giúp thay thế xương mà còn cung cấp tác dụng điều trị từ Simvastatin, làm tăng hiệu quả tái tạo xương<sup>40</sup>

- Năm 2021 nhóm công bố bài báo "Multifunctional injectable pluroniccystamine-alginate-based hydrogels for enhanced bone tissue engineering" giới thiệu một hệ thống hydrogel nhạy cảm nhiệt mới dựa trên alginate chức năng hóa với cystamine và ghép với Pluronic F127 (ACP)<sup>8</sup>. Hydrogel này có khả năng chuyển từ trạng thái lỏng sang gel ở nhiệt độ cơ thể (~37 °C) và trở lại trạng thái lỏng khi nhiệt độ giảm xuống dưới 25 °C. Các thí nghiệm cho thấy hydrogel ACP có khả năng hút nước khoảng 200% trong 6 ngày và hoàn toàn phân hủy sau 12 ngày trong môi trường sinh lý. Khi nuôi cấy tế bào nguyên bào sợi trong hydrogel ACP, các tế bào duy trì khả năng sống sót trên 90% trong 7 ngày, chứng tỏ tính tương thích sinh học cao của hydrogel này đối với việc nuôi cấy tế bào dài hạn. Ngoài ra, trong nuôi cấy ba chiều, các tế bào nguyên bào sợi bám vào hydrogel và mô phỏng thành công cấu trúc xốp của hydrogel ACP sau 5 ngày nuôi cấy. Các tế bào này có thể di chuyển từ cụm tế bào ACP và hình thành một lớp tế bào liên tục trên bề mặt đĩa nuôi cấy.

- Trong công bố "Cytocompatible dendrimer G3.0-hematin nanoparticle with high stability and solubility for mimicking horseradish peroxidase activity in in-situ forming hydrogel", nhóm giới thiệu chất xúc tác sinh học nanoparticle hematin được gắn trên dendrimer polyamidoamine thế hệ thứ ba (G3.0-He) nhằm thay thế enzyme horseradish peroxidase trong quá trình hình thành hydrogel tại chỗ<sup>41</sup>. G3.0-He có kích thước nhỏ hơn 100 nm và độ phân tán tốt hơn đáng kể so với hematin nguyên chất trong môi trường axit và trung tính. Nó thể hiện hoạt tính tương tự HRP trong việc xúc tác quá trình gel hóa gelatin liên kết với nhóm phenolic hydroxyl (tyramine) dưới điều kiện sinh lý nhẹ nhàng. Ngoài ra, G3.0-He có tính ổn định cao, không bị mất hoạt tính ngay cả ở nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cao, cho thấy khả năng ứng dụng bền vững trong các điều kiện sinh lý.



Hình 1.13. Cấu trúc hệ G3.0-He<sup>41</sup>

- Thí nghiệm in vitro cho thấy hydrogel Gel-Tyr được tạo thành nhờ G3.0-He có khả năng tương thích sinh học cao, với tỷ lệ sống sót của nguyên bào sợi đạt trên 90%. Đồng thời, hydrogel cũng tạo điều kiện thuận lợi cho sự bám dính và phát triển của tế bào nguyên bào sợi, chứng minh tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh học. Những kết quả này cho thấy G3.0-He là một chất xúc tác hiệu quả, có thể thay thế HRP trong các ứng dụng tạo hydrogel y sinh tại chỗ.

Nhiều nhóm nghiên cứu khác trong nước cũng đã phát triển nhiều loại vật liệu cho mục đích ứng dụng trên:

- Năm 2019, nhóm nghiên cứu của PGS.TS Bùi Xuân Vương tại trường Đại học Sài Gòn công bố nghiên cứu quá trình tổng hợp bioglass 58S bằng phương pháp solgel cải tiến, thu được bioglass 58S có diện tích bề mặt lớn và cấu trúc lỗ xốp đồng nhất, với diện tích bề mặt đạt hơn 300 m²/g, kích thước lỗ xốp trung bình khoảng  $5nm^{10}$ .

- Phát triển từ đó, năm 2020 nhóm công bố trên Tạp chí khoa học-Đại học Quốc gia Hà Nội nghiên cứu "Synthesis and Characterization of a Highly Ordered Mesoporous Bio-glass" trình bày việc tổng hợp bioglass mesoporous với cấu trúc lỗ xốp đều đặn và trật tự cao, bằng phương pháp sol-gel và sử dụng tác nhân tạo khuôn pluronic P123<sup>42</sup>. Kết quả cho thấy diện tích bề mặt của bioglass đạt hơn 500 m²/g và kích thước lỗ xốp trung bình khoảng 4-6 nm. Ảnh SEM và TEM xác nhận cấu trúc lỗ xốp đồng nhất trên bề mặt vật liệu. Vật liệu này có độ bền cơ học cao, phù hợp cho kỹ thuật mô xương, hỗ trợ sự bám dính và phát triển của tế bào xương. Ngoài ra, mesoporous bioglass có khả năng phóng thích ion canxi và phosphat, thúc đẩy quá trình khoáng hóa và hình thành xương.

Nhìn chung, các vật liệu sinh học hỗ trợ điều trị tổn thương xương và tái tạo mô đã và đang được phát triển nghiên cứu tại Việt Nam. Nhiều dự án khoa học đã tập

trung vào việc ứng dụng các vật liệu tiên tiến như hydrogel, bio-glass, composite nano và scaffold sinh học để cải thiện hiệu quả điều trị, đồng thời giảm thiểu chi phí so với các sản phẩm nhập khẩu. Các nghiên cứu không chỉ dừng lại ở việc phát triển vật liệu có tính tương thích sinh học cao, khả năng phân hủy sinh học và hỗ trợ tái tạo xương hiệu quả, mà còn hướng đến việc kết hợp với các hoạt chất sinh học như yếu tố tăng trưởng, peptide kháng khuẩn hoặc thuốc điều trị để tăng cường chức năng trị liệu. Bên cạnh đó, việc ứng dụng công nghệ in 3D, công nghệ nano và các phương pháp tổng hợp tiên tiến đã góp phần tạo ra những sản phẩm có cấu trúc mô phỏng chính xác môi trường ngoại bào của xương, từ đó hỗ trợ quá trình hình thành mô mới. Đồng thời, các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng cũng ngày càng được chú trọng để đánh giá hiệu quả thực tế của các vật liệu này. Nhiều cơ sở nghiên cứu và bệnh viện tại Việt Nam đã phối hợp thực hiện các dự án thử nghiệm ứng dụng vật liệu sinh học trong điều trị chấn thương xương và các bệnh lý liên quan. Tiếp nối những kết quả đã đạt được, việc phát triển các vật liệu sinh học mới với hiệu năng vượt trội và khả năng ứng dụng cao trong y học tái tạo là một hướng đi phù hợp với tình hình hình hiện nay.

# CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

# 2.1. Đối tượng – phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu:

- Nghiên cứu tổng hợp hệ vật liệu Bioglass 58S tích hợp Hemin (BG 58S-Fe) kết hợp với Hydrogel dẫn xuất kép Dopamine (DA) từ Alg và F127 (PDA, ADA) và đánh giá các đặc tính sinh hóa lý phù hợp hướng đến ứng dụng tái tạo mô, định hướng điều trị nội nha.

Phạm vi nghiên cứu:

- Nghiên cứu quy trình tổng hợp nano hemin, bioglass 58S, bioglass 58S tích hợp hemin (BG 58S-Fe) và đánh giá hoạt tính cấu trúc, khả năng bắt chước xúc tác HRP của vật liệu.

- Tổng hợp và đánh giá cấu trúc hóa học dẫn xuất dopamine từ Alg, F127 (PDA, ADA)

 Khảo sát khả năng liên kết PDA, ADA với BG 58S-Fe và tổng hợp, đánh giá vật liệu hydrogel

- Khảo sát độc tính, khả năng khoáng hóa trong môi trường giả sinh học SBF và tế bào gốc trung mô MSC.

# 2.2. Dụng cụ, hóa chất và thiết bị

Bảng 2.1. Nguyên liệu – hóa chất

STT	Tên nguyên liệu-hóa chất	Xuất xứ	Mục đích sử dụng
1	Ethanol	VN-Chemsol	Dung môi
2	Isopropyl alcohol	VN-Chemsol	Dung môi
3	Khí nitơ tinh khiết phân tích	VN-Chemsol	Dung môi
4	Peroxidase from horseradish (HRP enzyme, P6782)	Sigma Aldrich	Enzyme thử nghiệm
5	Môi trường nuôi cấy tế bào MEM, Gibco	Gibco	Nguyên liệu nuôi cấy tế bào
6	Penicillin Streptomycin	Gibco	Nguyên liệu nuôi cấy tế bào
7	Phosphata buffer	Gibco	Nguyên liệu nuôi cấy tế bào
8	Cell proliferation kit (SRB Assay Kit, ab235935)	Abcam	Nguyên liệu nhuộm tế bào

9	Acridine orange	Alfa Aesar	Nguyên liệu nhuộm tế bào
10	Alizarin red S	Mackun	Nguyên liệu nhuộm tế bào
11	Propidium iodide	Sigma Aldrich	Nguyên liệu nhuộm tế bào
12	Hoechst 33342	Thermo Scientific	Nguyên liệu nhuộm tế bào
13	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3 ethylcarbodiimide (EDC, ≥97%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
14	3-Hydroxytyramine hydrochloride (DOPA, >99%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
15	Ammonium hydroxide (28-30 wt%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
16	Calcium nitrate tetrahydrate (CaNT, >99%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
17	Hemin (>98%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
18	Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB, >99%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
19	N-Hydroxysuccinimide (NHS, ≥98%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
20	p-nitrophenylchloroformate (p NPC, ≥97%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
21	Pyrogallol (>99%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
22	Tetraethyl orthosilicate (TEOS, >98%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
23	Triethyl phosphate (TEP, 99%)	Acros Organics	Nguyên liệu tổng hợp
24	Sodium alginate (Alg, Mn ~ 120,000- 190,000 g/mol)	Fisher Scientific	Nguyên liệu tổng hợp
25	Sodium alginate (A2033, medium viscosity)	Sigma Aldrich	Nguyên liệu tổng hợp
26	Nước cất	VN-Chemsol	Nguyên liệu tổng hợp
27	Pluronic F127 (F127, Mn~ 12600 g/mol)	VN-Chemsol	Nguyên liệu tổng hợp

STT	Tên thiết bị
1	Bình cầu 1 cổ
2	Bình định mức, ống đong
3	Bình tam giác
4	Cá từ
5	Đầu típ 1000µl , 100µl
6	Đĩa petri
7	Giấy bạc
8	Giấy đo pH
9	Giấy lọc
10	Màng cellulose tái sinh
11	Micro pipet
12	Nhiệt kế
13	Ông falcon ly tâm 50ml
14	Dụng cụ khác

Bảng 2.2. Danh mục dụng cụ

Bảng 2.3. Danh mục trang thiết bị

STT	Tên thiết bị
1	Bể siêu âm
2	Cân phân tích 5 số lẻ
3	Kính hiển vi đảo ngược 2 thị kính
4	Máy cô quay
5	Máy đo kích thước hạt
6	Máy đọc bảng giếng tự động
7	Máy đông khô
8	Máy khuấy từ gia nhiệt
9	Máy li tâm lạnh
10	Máy quang phổ hồng ngoại FTIR
11	Máy quang phổ tử ngoại khả kiến UV-Vis
12	Máy sấy
13	Nồi hấp tiệt trùng
14	Tủ ấm
15	Dụng cụ khác

Các thiết bị được sử dụng trong quá trình nghiên cứu có sẵn ở phòng thí nghiệm thuộc Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng.

#### 2.3. Các phương pháp nghiên cứu

# 2.3.1. Tổng hợp và đánh giá nano hemin, bioglass 58S, bioglass 58S tích hợp hemin

#### 2.3.1.1. Tổng hợp nano Hemin (HNP)

Hạt nano Hemin được tổng hợp bằng phương pháp thủy nhiệt. 25 mg Hemin được hòa tan trong 50ml methanol, đánh siêu âm trong để đảm bảo hòa tan hoàn toàn. Dung dịch sau đó được chuyển vào bình phản ứng thủy nhiệt và đặt trong tủ sấy chân không tại 150°C trong 2 giờ (VOS-210C). Sau phản ứng, bình phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách bay hơi, và sản phẩm thô được hòa tan trong nước. Dung dịch thu được được lọc qua màng để loại bỏ tạp chất. Hạt nano hemin được thu nhận bằng cách ly tâm thực hiện ba lần để đảm bảo độ tinh khiết và đồng nhất. Quy trình tổng hợp dựa trên quy trình của Viện Khoa học vật liệu Ứng dụng – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.<sup>35, 43</sup>



Hình 2.1 Sơ đồ tổng hợp HNP

#### 2.3.1.2. Tổng hợp nano bioglass 58S (BG)

Nano bioglass 58S được tổng hợp bằng phương pháp sol-gel với xúc tác kiềm. Đầu tiên, CTAB nồng độ 0,05M được hòa tan trong hỗn hợp ethanol và nước (tỉ lệ thể tích 70:30), sau đó thêm 5ml ammonium hydroxide để tạo thành micelle ổn định. Dung dịch được khuấy ở tốc độ 450 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ.

Tiếp theo, 0,064 mol TEOS được thêm vào để bắt đầu quá trình thủy phân và ngưng tụ silica. Sau 30 phút, 0,005 mol TEP được thêm vào làm nguồn phosphorus. Sau đó 0,031 mol CaNT hòa tan trong nước được thêm dần vào hỗn hợp. Phản ứng

được duy trì ở 60°C với tốc độ khuấy mạnh (~1000 vòng/phút) trong 48 giờ. Gel tạo thành được làm khô bằng phương pháp bay hơi.

Lớp gel thu được được sấy trong lò chân không VOS-210C ở 120°C trong 12 giờ để loại bỏ hoàn toàn nước. Tiếp theo, mẫu gel được nung ở 700°C trong 10 giờ với tốc độ gia nhiệt 5°C/phút và làm nguội đến nhiệt độ phòng với cùng tốc độ. Sản phẩm thu được được rửa bằng ethanol để loại bỏ các vùng giàu canxi và sấy khô trong không khí trước khi thực hiện các bước tiếp theo.



Hình 2.2. Sơ đồ tổng hợp BG 58S

# 2.3.1.3. Tổng hợp Bioglass 58S tích hợp Hemin (BG 58S-Fe)

Các hạt BG sau đó được phân tán đồng đều trong dung dịch HNP bằng phản ứng one-pot trong bình phản ứng thủy nhiệt ở 150°C trong 2 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, dung dịch tiếp tục được khuấy mạnh trong 48 giờ. Kết tủa thu được được tách bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút và rửa bằng nước khử ion. Sản phẩm cuối cùng được sấy đông khô và bảo quản ở nhiệt độ phòng để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

# 2.3.1.4. Đánh giá hoạt tính BG 58S-Fe

Vật liệu BG 58S-Fe tổng hợp được đánh giá trên 2 phương diện: cấu trúc hóa học và hoạt tính bắt chước xúc tác HRP.

Đặc trưng cấu trúc:

Phương pháp đánh giá đặc điểm đặc trưng cấu trúc của vật liệu HNP, BG 58S, BG 58S-Fe được sử dụng trong luận văn gồm: Xác định hình thái bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM), được thực hiện trên thiết bị: JSM IT-200 Jeol kết hợp với phổ tán xạ năng lượng (EDS) để xác định sự phân bổ nguyên tố; Xác định dạng tinh thể bằng phương pháp phổ nhiễu xạ tia X (XRD) sử dụng thiết bị D8 Advance ECO (Bruke AXS – Đức)

Hoạt tính bắt chước enzym HRP:

Để đánh giá khả hoạt tính bắt chước xúc tác HRP, sử dụng phản ứng oxy hóa Pyrogaollol và phổ hấp thụ UV-Vis, ghi nhận bằng máy quang phổ UV-1900, Shimadzu, Nhật Bản.

Phương pháp thử hoạt tính bằng Pyrogallol được sử dụng để đánh giá hoạt tính bắt chước enzyme HRP của các chất như hemin. Trong môi trường có  $H_2O_2$ , pyrogallol bị oxy hóa thành purpurogallin đưới xúc tác của chất có hoạt tính peroxidase. Sự hình thành purpurogallin được theo dõi bằng phép đo hấp thụ UV-Vis tại bước sóng khoảng 420 nm, từ đó xác định mức độ hoạt tính xúc tác của mẫu.<sup>44</sup>



Hình 2.3. Sơ đồ mô tả phương pháp thử hoạt tính bằng pyrogallol<sup>44</sup>

Dung dịch pyrogallol được chuẩn bị trong nước siêu tinh khiết với nồng độ 30 mM và bảo quản trong lọ thủy tinh tránh sáng làm dung dịch gốc. Nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cố định ở mức 20 mM, được lựa chọn dựa trên các nghiên cứu trước đó<sup>41</sup>. Dung dịch gốc enzyme HRP có nồng độ 1 mg/ml, được pha trong nước cất và pha loãng xuống 40  $\mu$ g/ml trước khi sử dụng.

Trong thí nghiệm, hỗn hợp gồm 0,15 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> được pha loãng với 3 ml nước tinh khiết và 0,3 ml pyrogallol trong cuvet thạch anh, để cân bằng ở 25 °C trong điều kiện tối nhằm tránh sự phân hủy của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pyrogallol dưới tác động của ánh sáng. Sau đó, 0,05 ml HRP và các mẫu thử được thêm vào để xúc tác phản ứng oxy hóa pyrogallol, tạo thành purpurogallin – một sản phẩm có màu nâu đặc trưng và hấp thụ mạnh ở bước sóng 420 nm.

Quá trình phản ứng được theo dõi bằng máy quang phổ UV-Vis ở chế độ động học (kinetic mode) để ghi nhận sự thay đổi độ hấp thụ theo thời gian trong 5 phút. Vận tốc ban đầu (V<sub>0</sub>) được tính toán bằng phần mềm UVProbe. Hoạt tính oxy hóa pyrogallol được xác định thông qua lượng Purpurogallin tạo thành, dựa vào hệ số hấp

thụ mol  $\epsilon=2460~M^{-1}.cm^{-1}.$ 

# 2.3.2. Tổng hợp và đánh giá cấu trúc hóa học dẫn xuất dopamine từ Alg, pluronic F127 (PDA, ADA)

# 2.3.2.1. Tổng hợp dẫn xuất dopamin

Tổng hợp Alginate-Dopamine (ADA)

Quá trình gắn dopamine lên alginate được thực hiện bằng cơ chế ghép nối EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide).

Đầu tiên, 1 g sodium alginate được hòa tan trong 50 ml dung dịch Mes buffer (pH 6.0). Tiếp theo, 5.22 mmol EDC được thêm vào dung dịch alginate và khuấy liên tục trong 30 phút để kích hoạt nhóm carboxyl. Sau đó, một lượng dopamine tương đương với EDC được thêm vào dung dịch và tiếp tục khuấy trong 3-4 giờ. Sau phản ứng, dung dịch được nhỏ giọt vào hỗn hợp ethanol và IPA (tỷ lệ 50:50) để kết tủa sản phẩm. Kết tủa được hòa tan trong nước deionized (DI) và kết tủa lại ba lần để loại bỏ các tạp chất còn sót lại. Sản phẩm ADA được sấy khô trong chân không và bảo quản ở 4 °C.



Hình 2.4. Sơ đồ tổng hợp ADA

Tổng hợp Pluronic-Dopamine

Pluronic-Dopamine (PDA) được tổng hợp thông qua phản ứng một bước sử dụng p-nitrophenyl chloroformate (NPC) làm tác nhân ghép nối.



Hình 2.5. Sơ đồ tổng hợp PDA

20 g Pluronic F-127 được hòa tan trong 50 ml DCM (dichloromethane). Sau đó, 2,5 mol NPC (tương đương với Pluronic F-127) được thêm từ từ vào dung dịch và phản ứng trong 24 giờ. Tiếp theo, 4,8 mmol dopamine được thêm vào và phản ứng tiếp tục trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung môi DCM được loại bỏ bằng cô quay chân không, dopamine tự do được kết tủa bằng chloroform. Sản phẩm được rửa bằng cách nhỏ giọt vào ether lạnh (-20 °C), sau đó kết tủa được lọc và rửa sạch nhiều lần. Mẫu PDA được cô quay chân không để thu sản phẩm cuối cùng.

# 2.3.2.2. Xác định mức độ thế dopamine

Để xác định sự hiện diện của dopamin và mức độ thế dopamine trên alginate và pluronic được xác định bằng cách sử dụng phổ hấp thụ UV-Vis (thiết bị UV-1900, Shimadzu, Nhật Bản) tại bước sóng 280 nm. Giá trị hấp thụ quang tại bước sóng này phản ánh trực tiếp lượng dopamine đã gắn kết thành công vào khung polymer.

# 2.3.3. Khảo sát khả năng liên kết PDA, ADA với BG 58S-Fe và tổng hợp, đánh giá vật liệu hydrogel

# 2.3.3.1. Khảo sát khả năng liên kết PDA, ADA với BG 58S-Fe

Sự hình thành liên kết dopamin giữa PDA, ADA dưới dự hỗ trợ của BG 58S-Fe được khảo sát bằng phương pháp theo dõi tiến trình phản ứng theo thời gian thực, sử dụng phổ UV-Vis. PDA, ADA có nhóm catechol dễ bị oxy hóa thành quinone khi có mặt hemin, tạo ra sự thay đổi hấp thụ đặc trưng trên phổ UV-Vis, thường trong vùng 280–400 nm.

30



Hình 2.6. Phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch dopamine trong quá trình oxy hóa thành polydopamine theo thời gian<sup>45</sup>

Cụ thể, khi các liên kết được hình thành, cấu trúc điện tử của dopamine và các dẫn xuất thay đổi, dẫn đến sự biến đổi rõ rệt trong phổ hấp thụ UV-Vis, đặc biệt trong vùng 280–400 nm. Quá trình hình thành liên kết dopamine được biểu hiện bằng sự giảm hấp thụ tại bước sóng ~280 nm, trong khi sự hình thành các sản phẩm trung gian hoặc liên kết mới làm xuất hiện hoặc tăng cường tín hiệu ở các vùng 320–390 nm hoặc xa hon<sup>45</sup> (Hình 2.6). Phương pháp này cho phép theo dõi phản ứng một cách liên tục, không phá hủy mẫu, từ đó đánh giá được động học phản ứng, mức độ chuyển hóa và thời điểm ổn định của hệ.

# 2.3.3.2. Tổng hợp, đánh giá vật liệu hydrogel

Xác định nồng độ PDA, PDA kết hợp BG 58S-Fe trong môi trường H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> để tạo gel nhạy nhiệt

Nồng độ PDA cần thiết được xác định bằng cách sử dụng dung dịch PDA với các nồng độ khác nhau, trong khoảng 20-40 wt%, dựa trên khuyến nghị từ các nghiên cứu trước đây về Pluronic F127<sup>29</sup>. Dung dịch PDA được bảo quản ở 4 °C để đảm bảo hòa tan hoàn toàn.

Dung dịch PDA với các nồng độ khác nhau được trộn với BG 58S-Fe, sau đó thêm  $H_2O_2$  để kích hoạt phản ứng liên kết chéo. Sau khi  $H_2O_2$  được thêm vào, quan sát màu sắc của dung dịch để biết phản ứng đã diễn ra. Nếu dung dịch dần chuyển sang nâu đậm, cho thấy phản ứng oxy hóa dopamine đã diễn ra.

Xác định nồng độ ADA

Sử dụng nồng độ PDA thu được ở bước trước để xác định nồng độ ADA phù hợp tạo hệ. Dung dịch PDA và ADA (thay đổi nồng độ trong khoảng 0-3 wt%), được chuẩn bị riêng biệt và trộn lại với nhau. Quá trình khuấy được thực hiện ở tốc độ

khoảng 200 vòng/phút để tránh tạo bọt khí. Sau khi trộn đồng nhất, BG 58S-Fe được thêm vào hỗn hợp, tiếp theo là  $H_2O_2$  để bắt đầu quá trình liên kết chéo.

> Phương pháp xác định tạo gel và xác định cấu trúc hydrogel

Ảnh hưởng của nồng độ các chất tới khả năng tạo gel được đánh giá bằng cách quan sát sự chuyển đổi từ sol sang gel thông qua phương pháp đảo ngược ống nghiệm kết hợp phân tích lưu biến. Cấu trúc hydrogel được xác định bằng hình ảnh SEM bề mặt các mẫu sau khi đông khô.

#### 2.3.3. Khảo sát độc tính, khả năng khoáng hóa in vitro trên tế bào

#### 2.3.3.1. Khảo sát độc tính

Điều kiện nuôi cấy tế bào: tế bào gốc trung mô người (hMSCs) ở lần cấy chuyền thứ 6 được nuôi cấy trong môi trường MEM có bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh, duy trì trong điều kiện môi trường có 5% CO<sub>2</sub> và độ ẩm 90%.

Độc tính của hydrogel được thiết kế đối với tế bào hMSCs được đánh giá bằng hai phương pháp:

Phương pháp 1: Kiểm tra độc tính gián tiếp

+ Hydrogel được ngâm trong môi trường MEM với tỉ lệ khối lượng 1:5. Dịch chiết từ hydrogel được thu thập bằng bộ lọc tế bào (biologix, 40 μm). Môi trường trong các giếng 96-well chứa tế bào hMSCs (mật độ 1 x 10<sup>3</sup> tế bào/ml) được thay thế bằng dịch chiết. Tại các thời điểm định sẵn, thử nghiệm SRB được thực hiện để xác định khả năng sống sót của tế bào theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phương pháp 2: Kiểm tra độc tính trực tiếp trong mô hình 3D

+ Tế bào hMSCs (1 x 10<sup>4</sup> tế bào/ml) được phối trộn vào hydrogel trong giai đoạn dung dịch. Quá trình chuẩn bị hydrogel tuân theo quy trình tại mục 2.8, nhưng sử dụng môi trường MEM thay vì nước để hòa tan các polyme tiền chất. Sau khi tạo thành hỗn hợp đồng nhất giữa tế bào và hydrogel, hỗn hợp được tiêm vào đĩa nuôi cấy (35 mm, nunc) và ủ ở 37 °C để gel hóa. Sau 1 giờ, môi trường MEM ấm được thêm vào đĩa nuôi cấy để cung cấp dinh dưỡng và duy trì độ ẩm cho hydrogel.

+ Tại các thời điểm xác định, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và môi trường mới chứa thuốc nhuộm được thêm vào. Đầu tiên, Hoestch được sử dụng để nhuộm nhân tế bào, sau đó tiếp tục với nhuộm kép AO/PI. PBS (1X) được dùng để loại bỏ thuốc nhuộm dư thừa. Để cố định tế bào, glutaraldehyde (Sigma, 3%) được thêm vào đĩa nuôi cấy. Hành vi của tế bào hMSCs sau khi tương tác với mạng lưới hydrogel được quan sát bằng kính hiển vi Confocal.

#### 2.3.3.2. Khảo sát khả năng khoáng hóa

Đánh giá khả năng tạo khóa bề mặt

Để đánh giá quá trình tạo khoáng bề mặt, hydrogel được ủ trong dung dịch mô phỏng dịch cơ thể SBF. Sau thời gian ủ, các hydrogel còn lại được thu thập và làm khô bằng phương pháp đông khô.

Các mẫu khô sau đó được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét SEM để quan sát hình thái bề mặt. Đồng thời, thành phần hóa học của các sản phẩm khoáng hóa được xác định thông qua phép phân tích phổ tán xạ năng lượng tia X EDS trong quá trình quan sát SEM.

Dánh giả khả năng biệt hóa xương với tế bào hMSCs cell

Tế bào gốc trung mô người (hMSCs) được gieo với mật độ 1 x 10<sup>4</sup> tế bào/mỗi giếng trong đĩa 24 giếng. Sau 24 giờ để tế bào bám dính, môi trường MEM hoàn chỉnh có bổ sung hydrogel (10 mg/ml) được thêm vào các giếng.

Quá trình lắng đọng của ma trận khoáng hóa được đánh giá bằng phương pháp nhuộm đỏ alizarin. Tế bào được rửa bằng dung dịch PBS 0.15 M (pH 7.2) và cố định bằng glutaraldehyde 3% (thể tích) trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau quá trình cố định, tế bào tiếp tục được rửa bằng PBS 0.15 M (pH 7.4) và nước siêu tinh khiết.

Sau đó, 1 ml thuốc nhuộm đỏ alizarin 2% được thêm vào và tế bào được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Phần thuốc nhuộm dư thừa được loại bỏ và tế bào được rửa lại bằng nước siêu tinh khiết. Tiếp theo, tế bào được rửa với PBS 0.15 M (pH 7.2) trong 15 phút, sau đó rửa nhanh bằng nước siêu tinh khiết và để khô ở nhiệt độ phòng.

Hình ảnh tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học. Mẫu đối chứng là tế bào hMSCs được nuôi cấy trong môi trường MEM bình thường.

# 2.3.4. Phân tích thống kê

Tất cả các kết quả đo lường được biểu diễn dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD). Sự khác biệt giữa các nhóm được phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai một chiều (ANOVA) kết hợp với kiểm định hậu kiểm Tukey.

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm OriginPro 2023 phiên bản dành cho sinh viên. Kết quả có giá trị \*P < 0.05 được coi là có ý nghĩa thống kê.

# CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

# 3.1. Kết quả cấu trúc BG 58S và BG 58S-Fe

Hình 3.1.A cho thấy rõ ràng hình thái học và sự phân bố của các hạt bioglass. Các hạt có hình dạng cầu đồng nhất và kích thước tương đối nhỏ, ước tính khoảng 150 nm. Kích thước nano này có thể mang lại diện tích bề mặt lớn, một yếu tố quan trọng trong các ứng dụng sinh học như tương tác tế bào và khả năng hình thành liên kết với mô xương.



Hình 3.1. Hình ảnh SEM, surface mapping EDS và phổ EDS tổng quát của bioglass BG 58S (A, B ,C) và BG 58S-Fe (D, E, F)

Sự phân bố đồng đều của các hạt cho thấy quy trình tổng hợp vật liệu có độ ổn định cao, đảm bảo tính nhất quán về đặc tính của vật liệu trên toàn bộ mẫu. Mật độ hạt cao cũng chứng minh về cấu trúc vật liệu đặc chắc.

Bản đồ phân bố nguyên tố EDS bề mặt (Hình 3.1.B) cung cấp thông tin trực quan về sự phân bố của các nguyên tố chính cấu thành BG 58S, bao gồm (Ca-K), (O-K), (Si-K) và (P-K). Hình ảnh cho thấy sự phân bố tương đối đồng nhất của cả bốn nguyên tố này trên bề mặt vật liệu được khảo sát. Điều này củng cố thêm nhận định về tính đồng nhất trong thành phần hóa học của vật liệu, đảm bảo tính chất sinh học và khả năng tương thích sinh học của bioglass. Sự phân bố đều của các nguyên tố tiền khoáng như Ca và Ps đóng vai trò then chốt trong quá trình hình thành lớp hydroxyapatite trên bề mặt bioglass khi tiếp xúc với môi trường sinh học, tạo điều kiện cho sự liên kết với mô xương.

Phổ EDS tổng quát (Hình 3.1.C) cung cấp phân tích định lượng về thành phần nguyên tố của BG 58S. Các đỉnh phổ tương ứng với các năng lượng đặc trưng của từng nguyên tố. Đỉnh Si-K có cường độ cao nhất, tiếp theo là đỉnh O-K, cho thấy Silicon và Oxygen là hai thành phần chính trong cấu trúc mạng lưới của bioglass. Sự hiện diện rõ ràng của các đỉnh Ca-K và P-K xác nhận sự có mặt của Ca và P trong vật liệu.

Đáng chú ý, việc bổ sung HNPs không làm thay đổi đáng kể kích thước hay hình thái của BG 58S (Hình 3.1.D) Hình ảnh SEM cho thấy rõ ràng sự tương đồng về hình thái và kích thước giữa bioglass ban đầu (Hình 3.1.A) và BG 58S-Fe. Các hạt vẫn giữ nguyên hình dạng cầu đặc trưng và kích thước nano, ước tính khoảng 150 nm. Điều này chứng tỏ rằng quy trình bổ sung HNPs đã được thực hiện tốt, không gây ra sự kết tụ hay làm thay đổi đáng kể cấu trúc vi mô của BG 58S.

So với BG 58S ban đầu, EDS mapping (Hình 3.1. E) và phổ EDS của BG 58S-Fe (Hình 3.1. F) đã cho thấy tín hiệu mới của nguyên tố Fe, xác nhận sự hiện diện của HNPs trong mạng lưới BG bên cạnh các đỉnh đặc trưng của các nguyên tố cấu tạo nên BG. Phân tích định lượng từ phổ EDS cho thấy hàm lượng Fe chiếm 0,77% khối lượng của vật liệu.

Bản đồ phân bố nguyên tố EDS (Hình 3.1.F) cung cấp thông tin về sự phân bố không gian của các nguyên tố trên bề mặt mẫu BG 58S-Fe. Hình ảnh Fe-K cho thấy sự phân tán của nguyên tố Fe trên khu vực khảo sát, cho thấy các HNPs đã được tích hợp vào mạng lưới. So sánh với bản đồ phân bố của các nguyên tố chính, có thể thấy rằng Fe có xu hướng phân bố tương đối đồng đều, cho thấy sự phân tán tốt của HNPs trong cấu trúc bioglass.



Hình 3.2. Giản đồ XRD của BG 58S và BG 58S-Fe

Dạng tinh thể mẫu BG 58S và BG 58S-Fe được so sánh bằng nhiễu xạ tia X (XRD) (Hình 3.2.). Cả giản đồ XRD của BG 58S và BG 58S-Fe đều cho thấy đặc điểm của vật liệu gần như vô định hình, được biểu thị bằng các đỉnh rộng thay vì các đỉnh sắc nét. Đặc điểm này là điển hình của BG, nơi cấu trúc mạng lưới silica không có trật tự tinh thể xa.

Tính chất vô định hình này đóng vai trò quan trọng trong khả năng tương tác sinh học của BG, đặc biệt là quá trình hòa tan và hình thành lớp hydroxyapatite trên bề mặt khi tiếp xúc với môi trường sinh học.

Về sự dịch chuyển hypsochromic (dịch chuyển về phía bước sóng ngắn hơn, tương ứng với góc 2θ lớn hơn) của đỉnh nhiễu xạ rộng trong phổ XRD của BG 58S từ vùng 20–25° sang 23–32° cho thấy sự thay đổi trong cấu trúc mạng lưới vô định hình của bioglass sau khi pha trộn các vùng tinh thể của hemin. Sự dịch chuyển của đỉnh rộng cho thấy sự thay đổi trong khoảng cách giữa các nguyên tử hoặc sự sắp xếp cấu trúc ở quy mô ngắn trong pha vô định hình của BG do sự tích hợp của HNP.

Từ các kết quả phân tích, có thể kết luận rằng BG 58S-Fe đã được tổng hợp thành công. Cả BG 58S và BG 58S-Fe đều chủ yếu có cấu trúc vô định hình.



3.2. Đánh giá khả năng giả xúc tác HRP của BG 58S và BG 58S-Fe

Hình 3.3. Hiệu quả xúc tác của BG 58S và BG 58S-Fe trên phản ứng oxy hóa pyrogallol của các mẫu thử với nồng độ khác nhau (A) Hình ảnh đổi màu của các mẫu và (B) Hình ảnh phổ UV-Vis

Hình 3.3.A cho thấy tín hiệu đặc trưng của purpurogallin không được ghi nhận trong mẫu BG 58S tinh khiết, cho thấy BG 58S không có hoạt tính peroxidase. Ngược lại, purpurogallin được tạo thành ngay khi bổ sung enzyme HRP, HNP hoặc BG 58S-Fe, xác nhận rằng hoạt tính giống enzyme peroxidase chỉ liên quan đến thành phần HNP.

Tương tự, kết quả UV-vis hình 3.3.B cho thấy mẫu BG 58S (5 mg/mL) không xuất hiện tín hiệu đặc trưng. Các mẫu BG 58S-Fe thể hiện sự hình thành purpurogallin rõ rệt, với cường độ tín hiệu tại 420 nm tăng dần theo nồng độ. Đặc biệt, mẫu BG 58S-Fe ở nồng độ 4–5 mg/mL cho phổ hấp thụ gần tương đương với enzyme HRP (40  $\mu$ g/mL), cho thấy hoạt tính xúc tác sinh học mạnh mẽ.

#### 3.3. Kết quả tổng hợp và đánh giá cấu trúc hóa học của PDA, ADA

Hình 3.4. Minh họa phương trình tổng hợp ADA và PDA theo cơ chế đã nêu ở chương trước.

Phổ UV-Vis (Hình 3.4.) cung cấp bằng chứng quang phổ rõ ràng về sự thành công của quá trình liên hợp dopamine với cả alginate và Pluronic F127. Việc xuất hiện các dải hấp thụ đặc trưng ở bước sóng cực đại ( $\lambda$ max) = 280 nm trong phổ của ADA và PDA, trong khi Alg và F127 nguyên bản không có bất kỳ dải hấp thụ đáng kể nào trong vùng 250-800 nm, cho thấy các nhóm catechol phenolic của dopamine đã được

gắn kết vào khung polyme. Bước sóng hấp thụ này phù hợp với các chuyển dời điện tử La–Lb đặc trưng của vòng benzen có các nhóm hydroxyl liền kề (catechol) trong phân tử dopamine.



Hình 3.4. Sơ đồ tổng hợp ADA và PDA

Sử dụng định luật Beer-Lambert để định lượng lượng nhóm catechol được gắn trên khung polyme thiết lập mối quan hệ tuyến tính giữa độ hấp thụ của dung dịch và nồng độ của chất hấp thụ, cùng với chiều dài đường đi của ánh sáng và hệ số hấp thụ mol.

Bằng cách đo độ hấp thụ tại bước sóng cực đại (280 nm) và sử dụng hệ số hấp thụ mol đã biết của nhóm catechol có thể tính toán nồng độ của nhóm catechol trong dung dịch ADA và PDA, từ đó suy ra hiệu suất liên hợp. Dữ liệu cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa alginate và Pluronic F127. Hiệu suất liên hợp dopamine với Pluronic F127 đạt giá trị rất cao 94,78  $\pm$  3,22%, gần như toàn bộ dopamine đã phản ứng và gắn kết thành công vào chuỗi polyme Pluronic.

Ngược lại, hiệu suất liên hợp với alginate thấp hơn đáng kể 13,91  $\pm$  2,55%. Việc biểu thị hàm lượng catechol dưới dạng mg catechol/g polyme dẫn xuất cung cấp một cách trực quan để so sánh mức độ gắn dopamine trên mỗi đơn vị khối lượng polyme. Pluronic dẫn xuất có hàm lượng catechol cao hơn (23,02  $\pm$  0,78 mg/g) so với alginate dẫn xuất (30,7  $\pm$  0,02 mg/g). Sự khác biệt này có thể được giải thích bởi một số yếu tố:

+ Alginate là một polysaccharide mang điện tích âm do các nhóm carboxylate, trong khi Pluronic F127 là một copolymer không ion hóa chứa các khối poly(ethylene oxide) (PEO) và poly(propylene oxide) (PPO).

+ Sơ đồ phản ứng (Hình 3.4. A) cho thấy alginate được hoạt hóa bằng EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) để tạo liên kết amide với nhóm amine của dopamine. Pluronic F127 được hoạt hóa bằng p-NPC (p-nitrophenyl chloroformate), tạo ra các nhóm carbonate có khả năng phản ứng với nhóm amine của dopamine dẫn đến hiệu quả liên hợp khác nhau.

+ Cấu trúc và độ linh động của chuỗi polyme có thể ảnh hưởng đến khả năng tiếp cận của các phân tử dopamine với các vị trí phản ứng. Pluronic F127 có cấu trúc micelle trong dung dịch, có thể tạo điều kiện thuận lợi hơn cho sự tương tác với dopamine so với cấu trúc chuỗi dài của alginate.

Nhìn chung Phổ UV-Vis và dữ liệu định lượng đã chứng minh thành công quá trình liên hợp dopamine với alginate và Pluronic F127 với hiệu suất liên hợp khác nhau đáng kể giữa hai polyme.

3.4. Kết quả khả năng liên kết PDA, ADA với BG 588-Fe và tổng hợp, đánh giá vật liệu hydrogel



3.4.1. Hiệu quả hình thành liên kết dopamin

Hình 3.5. Sự thay đổi theo thời gian của phổ UV-Vis đối với các dung dịch PDA, ADA và hỗn hợp ADA-PDA (tỉ lệ 1:1) khi bổ sung BG 58S-Fe và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> với nồng độ 5mg/ml, trong khoảng bước sóng 250nm-800nm

Kết quả phổ UV-Vis đã cung cấp bằng chứng mạnh mẽ về cơ chế tạo gel thông qua sự hình thành liên kết catechol-catechol giữa các polymer dẫn xuất dopamine khi có sự xúc tác của BG 58S-Fe (có khả năng xúc tác phản ứng oxy hóa) và chất oxy hóa  $H_2O_2$  có mặt trong hệ thống.

Quá trình oxy hóa các nhóm catechol trên chuỗi polymer DA tạo ra các quinone

và gốc tự do aryloxy, dẫn đến sự hình thành các liên kết chéo giữa các chuỗi polymer, tạo thành mạng lưới gel ba chiều.

Đối với PDA và ADA, sự xuất hiện nhanh chóng của đỉnh hấp thụ ở  $\lambda$ max = 401 nm ngay sau khi thêm BG 58S-Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cho thấy quá trình oxy hóa catechol thành quinone diễn ra rất nhanh chóng. Đỉnh này là đặc trưng cho các ortho-quinone, sản phẩm đầu tiên của quá trình oxy hóa catechol.

Sự dịch chuyển dần của đỉnh hấp thụ từ 401 nm đến khoảng 500 nm theo thời gian được cho là kết quả của sự hình thành dicatechol, cụ thể là sản phẩm dimer 5,5'di(3,4-dihydroxyphenylalanine). Cơ chế được đề xuất là sự tạo thành gốc aryloxy trên vòng phenyl của DA, sau đó các gốc này kết hợp với nhau tạo thành liên kết C-C giữa các vòng catechol, dẫn đến sự hình thành dimer. Sự hình thành dimer này là một bước quan trọng trong quá trình liên kết chéo và tạo gel.

Quá trình oxy hóa hỗn hợp ADA và PDA với sự hỗ trợ của BG 58S-Fe/ $H_2O_2$  cho thấy động học tương tự như các polymer đơn, nhưng sự dịch chuyển đỏ của đỉnh quinone diễn ra nhanh hơn.

Đáng chú ý, bên cạnh các đỉnh hấp thụ chính đặc trưng của DA, còn xuất hiện một đỉnh mới ở  $\lambda$ max = 300 nm trong hỗn hợp ADA-PDA. Đây được cho là tiền chất của sự hình thành melanin, một loại polymer có khối lượng phân tử cao được hình thành từ sự liên kết chéo của các catecholamine<sup>46</sup>. Sự xuất hiện của tiền chất melanin cho thấy một con đường liên kết chéo phức tạp hơn có thể xảy ra trong hỗn hợp polymer, góp phần vào quá trình tạo gel.

Tóm lại, các polymer dẫn xuất từ DA, bao gồm ADA và PDA, có khả năng tạo gel nhanh chóng tại chỗ trong điều kiện vật lý đơn giản.

# 3.4.2. Tổng hợp hydrogel

Hình 3.6 A mô tả sơ đồ chuyển đổi sol-gel của PDA có hoặc không có HNP BG/H2O2 và hỗn hợp PDA–ADA. Việc gắn DA vào F127 (tạo thành PDA) đã gây ra sự dịch chuyển đáng kể của quá trình chuyển đổi sol-gel sang trái trên biểu đồ pha nhiệt độ-nồng độ, cần nồng độ PDA cao hơn để hình thành gel so với F127 nguyên bản ở cùng một nhiệt độ (Hình 3.6.B).

Nguyên nhân là do nhóm catechol của dopamine, khi được gắn vào đầu PEO ưa nước của F127, đã làm thay đổi cân bằng ưa nước/kỵ nước của copolymer. Sự thay đổi này làm xáo trộn quá trình tập hợp micelle dựa trên tương tác kỵ nước của các khối PPO ở nhiệt độ cao, dẫn đến giảm mật độ đóng gói của micelle và do đó, cần nồng độ cao hơn để các micelle có thể tự sắp xếp đủ gần để tạo thành mạng lưới gel vật lý. Việc bổ sung BG 58S-Fe kết hợp với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đã cho thấy khả năng giảm nồng độ PDA cần thiết để hình thành gel. BG 58S-Fe xúc tác quá trình oxy hóa các nhóm DA trên chuỗi F127. Quá trình oxy hóa này dẫn đến sự hình thành các quinone và các gốc tự do aryloxy, tạo điều kiện cho quá trình tự liên kết chéo giữa các micelle PDA. Các liên kết chéo này là liên kết cộng hóa trị giữa các nhóm catechol đã bị oxy hóa trên các micelle khác nhau, tạo ra các nút mạng bền vững hơn so với các tương tác kỵ nước đơn thuần trong gel F127 vật lý. Sự hình thành các liên kết chéo này hình thành các nút liên kết vật lý và hóa học chặt chẽ, làm tăng độ bền cơ học của gel và cho phép hình thành gel ở nồng độ PDA thấp hơn.



Hình 3.6. Phương pháp đảo ống nghiệm để chuyển đổi sol-gel của PDA có hoặc không có HNP BG/H2O2 và hỗn hợp PDA–ADA: (A) sơ đồ minh họa (B) Hình ảnh thí nghiệm, x và y lần lượt biểu thị nồng độ của PDA và ADA.

Kết quả đảo ống nghiệm trên cùng (Hình 3.6.B) cho thấy sự thay đổi trạng thái sol-gel của PDA ở các nồng độ khác nhau (20%, 30%, 40%) tại hai nhiệt độ (<20°C và >20°C). Ở nhiệt độ thấp (<20°C), PDA ở tất cả các nồng độ đều ở trạng thái sol (dạng lỏng chảy tự do) do tương tác kỵ nước của PPO bị giảm. Khi nhiệt độ tăng lên (>20°C), PDA bắt đầu hình thành gel, và nồng độ càng cao thì gel càng bền vững hơn (khả năng chống chảy khi đảo ống nghiệm tốt hơn).

Phần thứ 2 của hình cho thấy ảnh hưởng của việc bổ sung BG 58S-Fe/H2O2 lên trạng thái sol-gel của PDA ở các nồng độ thấp hơn (12%, 15%, 20%, 30%) tại hai

nhiệt độ. So với PDA đơn thuần, sự hiện diện của BG 58S-Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đã thúc đẩy quá trình hình thành gel ở nồng độ thấp hơn và ở cả hai nhiệt độ. Điều này đặc biệt rõ ràng ở nồng độ 12% và 15%. Chứng tỏ cơ chế tạo gel hóa học thông qua liên kết chéo oxy hóa được xúc tác bởi BG 58S-Fe là hiệu quả.

Hình dưới cùng minh họa trạng thái sol-gel của hỗn hợp PDA-ADA (với nồng độ PDA cố định và nồng độ ADA thay đổi từ 0.1% đến 2%) khi có mặt BG 58S-Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tương tự với mẫu PDA có BG 58S-Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hỗn hợp PDA-ADA cũng cho thấy khả năng hình thành gel ở nồng độ thấp hơ. Sự có mặt của ADA có thể làm tăng mật độ nhóm catechol trong hệ, từ đó thúc đẩy quá trình liên kết chéo và hình thành gel hiệu quả hơn.



3.4.3. Cấu trúc hình thái và lưu biến của hệ vật liệu hydrogel

Hình 3.7. Hình ảnh SEM bề mặt (A) và biểu đồ thể hiện kết quả phân tích lưu biến theo nhiệt độ (B) của hydrogel thu được từ PDA 15%, PDA 15% + BG 58S-Fe và PDA 15%+0,5% ADA + BG 58S-Fe

Hình thái của các hydrogel thu được được đánh giá bằng kỹ thuật SEM bằng cách sử dụng các mẫu sau khi đông khô. Mặt cắt ngang của hydrogel PDA ở nồng độ 15% có kích thước lỗ xốp lớn. Hydrogel này thể hiện cấu trúc mạng dạng ống và lưới với các lỗ liên kết kém trong ma trận hydrogel.

Ngược lại, khi áp dụng liên kết chéo hóa học trong PDA ở nồng độ 15% trọng lượng dưới sự xúc tác của BG 58S-Fe (PDA<sub>15</sub>@ BG 58S-Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cấu trúc xốp ba chiều được hình thành tự phát (Hình 3.7. A). Cơ chế liên kết chéo kết hợp với sự tách pha do phản ứng gây ra đã tạo ra các hình thái đa dạng của cấu trúc xốp trong hydrogel liên kết chéo.

Khi dung dịch ADA 0,5% được thêm vào cùng với PDA 15% (PDA<sub>15</sub>-ADA<sub>0.5</sub>@ BG 58S-Fe /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cấu trúc mạng dạng bọt biển xuất hiện trong với kích thước lỗ nhỏ tương đối. Ngoài ra, thành của các lỗ xốp dày hơn đáng kể, cho thấy thời gian phân hủy có thể lâu hơn. Cấu trúc liên kết cao trong hydrogel (PDA<sub>15</sub>-ADA<sub>0.5</sub>@ BG 58S-Fe /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) cung cấp một bộ khung lý tưởng giúp giữ lại dịch mô và cho phép oxy cũng như chất dinh dưỡng thẩm thấu hiệu quả.

Ba biểu đồ (Hình 3.7.B) là kết quả phân tích lưu biến thể hiện sự thay đổi của các thông số cơ học theo nhiệt độ, bao gồm G', G" và Tan δ (G"/G'). Trong biểu đồ đầu tiên, mẫu PDA 15% cho thấy G' và G" duy trì ở mức thấp và không có sự thay đổi đáng kể trong khoảng nhiệt độ từ 10°C đến 50°C. Hệ PDA 15% tồn tại ở trạng thái bán gel hoặc dung dịch nhớt, với đặc tính nhớt chiếm ưu thế do Tan δ lớn hơn 1.

Ở biểu đồ thứ hai, khi bổ sung BG 58S-Fe, G' tăng mạnh đột ngột tại khoảng 30°C, vượt qua G", cho thấy quá trình chuyển pha từ dung dịch sang gel. Sự gia tăng G' chứng tỏ sự hình thành mạng lưới gel chắc chắn, trong khi Tan δ giảm xuống đưới 1, cho thấy đặc tính đàn hồi trở nên chiếm ưu thế.

Trong biểu đồ thứ ba, khi kết hợp thêm 0,5% ADA cùng PDA và BG 58S-Fe, G' tiếp tục tăng đáng kể so với mẫu chỉ có PDA và BG 58S-Fe. G" cũng có sự gia tăng, nhưng G' vẫn chiếm ưu thế, phản ánh đặc tính đàn hồi vượt trội. Sự hình thành mạng lưới gel ổn định và liên kết chặt chẽ hơn nhờ vào ADA trong việc tạo liên kết hóa học giữa các polymer. Hình ảnh minh họa các mẫu gel trong ống nghiệm cho thấy sự hình thành gel rõ ràng ở nhiệt độ cao, đặc biệt khi có sự kết hợp của BG 58S-Fe và ADA.

Tóm lại, thiết kế của các hydrogel này có thể phù hợp cho sự bám dính của tế bào và sự phát triển tế bào ba chiều.

# 3.5. Kết quả đánh giá tiềm năng ứng dụng trong nội nha

# 3.5.1. Khảo sát độc tính

# 3.5.1.1. Độc tính gián tiếp

Quá trình khoáng hóa xương do sự lắng đọng canxi được biết đến như một dấu hiệu trong quá trình biệt hóa tế bào xương. Tế bào gốc trung mô người hMSCs được sử dụng trong nghiên cứu khả năng lắng đọng xương vì chúng có tiềm năng biệt hóa thành tế bào tạo xương osteoblasts, cho phép đánh giá trực tiếp khả năng cảm ứng và hỗ trợ tái tạo xương của vật liệu.

Hình 3.8. cho thấy khả năng sống sót của hMSCs duy trì ở mức rất cao, trên 90% so với nhóm tế bào đối chứng không xử lý, tại tất cả các thời điểm khảo sát (5, 7, 14 và 20 ngày). Các sản phẩm phân hủy hoặc các chất hòa tan từ hydrogel (trong điều

kiện chiết xuất) không gây ra tác động độc hại đáng kể đến sự sống còn của tế bào hMSCs trong môi trường nuôi cấy 2D.

Việc duy trì khả năng sống sót cao của tế bào trong suốt thời gian nuôi cấy dài (lên đến 20 ngày) cho thấy rằng hydrogel không giải phóng các chất độc hại một cách tích lũy theo thời gian. Điều này rất quan trọng vì vật liệu hydrogel có thể tồn tại ổn định trong cơ thể trong thời gian dài sau khi cấy ghép.



Hình 3.8. Khả năng sống sót của tế bào gốc trung mô người (hMSCs) với dung dịch chiết xuất từ hydrogel (10 mg/ml) ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau

# 3.5.1.2. Độc tính trực tiếp

Hình 3.9. cho thấy phần lớn tế bào hMSCs được bao bọc trong hydrogel vẫn còn sống (hiển thị màu xanh lục do nhuộm Acridine Orange - AO) tại tất cả các thời điểm khảo sát, kéo dài đến 20 ngày. Số lượng tế bào chết (hiển thị màu đỏ do nhuộm Propidium Iodide - PI) là rất ít, cho thấy hydrogel không gây ra độc tính đáng kể cho tế bào trong môi trường 3D theo thời gian. Điều này phù hợp với kết quả về độc tính thấp thu được từ thí nghiệm với dịch chiết xuất hydrogel trong môi trường 2D (Hình 3.8) và cho thấy hydrogel có khả năng hỗ trợ sự sống sót của tế bào trong cấu trúc 3D của nó.

Hình thái tế bào và sự lan rộng:

+ Ngày 5: Một số tế bào vẫn giữ hình dạng tròn sau 5 ngày nuôi cấy. Điều này có thể là do tế bào cần thời gian để thích ứng với môi trường 3D và bám dính vào mạng lưới hydrogel. Hình dạng tròn thường là hình thái ban đầu của tế bào khi mới



được gieo cấy hoặc khi chúng chưa bám dính tốt vào bề mặt.



+ Theo thời gian nuôi cấy (ngày 7, 14 và 20), số lượng tế bào lan rộng tăng lên đáng kể. Điều này cho thấy tế bào hMSCs không chỉ sống sót mà còn có khả năng bám dính, di chuyển và mở rộng trên/trong cấu trúc hydrogel. Sự lan rộng của tế bào là một dấu hiệu tích cực cho thấy vật liệu hỗ trợ sự phát triển và tương tác của tế bào.

+ Đến ngày thứ 20, các tế bào trong hydrogel composite phát triển thành hình dạng thoi điển hình của tế bào trung mô, với các chân giả (pseudopods) hiện rõ ràng. Sự hình thành chân giả là một dấu hiệu của sự bám dính tốt và khả năng di chuyển của tế bào trong môi trường 3D, cho thấy hydrogel không cản trở các hoạt động sinh học cơ bản của tế bào.

Nhìn chung, PDA<sub>15</sub>-ADA<sub>0.5</sub>@ BG 58S-Fe cho thấy độ tương thích sinh học vượt trội. Vật liệu không gây độc hại đáng kể, cho phép tế bào sống sót tốt, bám dính, lan rộng và duy trì hình thái chức năng của chúng theo thời gian trong cấu trúc 3D.

#### 3.5.2. Khảo sát khoáng hóa

#### 3.5.2.1. Hiệu quả tạo khoáng bề mặt

Hiệu quả tạo khoáng bề mặt phản ánh khả năng của vật liệu kích thích hình thành lớp khoáng sinh học, thường là HA trên bề mặt khi tiếp xúc với môi trường sinh lý, phản ánh tiềm năng liên kết và tái tạo xương của vật liệu. Hình 3.10, thể hiện hình ảnh SEM bề mặt và phổ EDS của hydrogel PDA<sub>15</sub>-ADA<sub>0.5</sub>@ BG 58S-Fe sau 7 và 14 ngày ngâm trong dung dịch mô phỏng dịch cơ thể (SBF) để đánh giá khả năng khoáng hóa *in vitro*.



Hình 3.10. Hình ảnh SEM (A) bề mặt và Phổ EDS (B) thể hiện khả năng khoáng hóa in-vitro của PDA<sub>15</sub>-ADA<sub>0.5</sub>@ BG 58S-Fe

Hình ảnh SEM tại thời điểm 7 ngày cho thấy cấu trúc mạng lưới hydrogel xốp rõ rệt với các lỗ rỗng lớn và sự liên kết chặt chẽ giữa các thành phần. Cấu trúc xốp này có vai trò tạo ra một môi trường thuận lợi cho sự xâm nhập, bám dính, tăng sinh và biệt hóa của tế bào xương. Các lỗ rỗng lớn cho phép vận chuyển hiệu quả các chất dinh dưỡng, oxy và loại bỏ các chất thải tế bào.

Tại thời điểm 14 ngày, hình ảnh SEM vẫn cho thấy cấu trúc xốp, tuy nhiên, bề mặt có vẻ dày đặc hơn so với ngày 7. Sự thay đổi này là chứng tỏ quá trình khoáng hóa đang diễn ra và các khoáng chất, đặc biệt là canxi và phosphate, đang lắng đọng trên bề mặt và trong cấu trúc của hydrogel. Sự dày đặc hơn có thể là do sự hình thành các

tinh thể HA hoặc các tiền chất khoáng khác.

Cả hai phổ EDS đều cho thấy sự hiện diện của các đỉnh phổ đặc trưng cho các nguyên tố quan trọng trong quá trình khoáng hóa sinh học và sự hình thành hydroxyapatite.

Cường độ của các đỉnh Ca và P trong phổ EDS tại thời điểm 14 ngày cao hơn đáng kể so với cường độ của chúng tại thời điểm 7 ngày. Sự gia tăng này chứng minh sự lắng đọng ngày càng nhiều của các khoáng chất chứa canxi và phosphate trên bề mặt hydrogel theo thời gian ngâm trong SBF. Tỷ lệ Ca/P có thể được ước tính từ cường độ đỉnh để đánh giá sự hình thành của hydroxyapatite (tỷ lệ Ca/P lý tưởng trong HA là 1.67). Việc tỷ lệ này tiến gần đến giá trị lý tưởng theo thời gian sẽ là minh chứng cho sự hình thành HA.

#### 3.5.2.2. Khả năng biệt hóa xương

Hình 3.11, thể hiện kết quả nhuộm Alizarin Red của tế bào gốc trung mô người (hMSCs) được nuôi cấy trên hydrogel PDA15-ADA0.5@ BG 58S-Fe và nhóm đối chứng (hMSCs nuôi cấy trong môi trường biệt hóa tiêu chuẩn mà không có hydrogel) sau 3, 7 và 14 ngày biệt hóa hướng xương.

So sánh giữa nhóm đối chứng và nhóm hydrogel:

+ Ngày thứ 3: Ở cả nhóm đối chứng và nhóm hMSCs nuôi cấy trên hydrogel PDA<sub>15</sub>-ADA<sub>0.5</sub>@ BG 58S-Fe, không có hoặc có rất ít sự hình thành nốt canxi màu đỏ được quan sát thấy. Quá trình khoáng hóa thường chỉ bắt đầu rõ rệt sau một thời gian nuôi cấy trong môi trường biệt hóa.

+ Ngày thứ 7: Sự khác biệt đáng chú ý xuất hiện vào ngày thứ 7. Các cụm calcium màu đỏ đã bắt đầu hình thành rõ rệt trong nhóm hMSCs được nuôi cấy với hydrogel PDA<sub>15</sub>-ADA<sub>0.5</sub>@ BG 58S-Fe. Trong khi đó, ở nhóm đối chứng, hiện tượng này vẫn chưa rõ ràng hoặc chỉ có một vài nốt nhỏ xuất hiện, cho thấy hydrogel composite có khả năng thúc đẩy sớm quá trình khoáng hóa của tế bào hMSCs so với môi trường biệt hóa tiêu chuẩn.

+ Ngày thứ 14: Đến ngày thứ 14, cả hai nhóm đều cho thấy sự hình thành cụm calcium rõ rệt. Tuy nhiên, có sự khác biệt về mức độ và sự phân bố của quá trình khoáng hóa. Ở nhóm hMSCs nuôi cấy với hydrogel composite, mức độ khoáng hóa rộng hơn, với nhiều cụm calcium và phân bố khắp bề mặt quan sát được. Trong khi đó, ở nhóm đối chứng, quá trình khoáng hóa cũng diễn ra mạnh mẽ, với các cụm calcium gần như bao phủ toàn bộ giếng nuôi cấy.



Hình 3.11 Kết quả nhuộm Alizarin red của tế bào hMSCs nuôi cấy với hydrogel PDA<sub>15</sub>-ADA<sub>0.5</sub>@ BG 58S-Fe sau 3, 7, và 14 ngày nuôi cấy.

Sự xuất hiện sớm của các cụm calcium trong nhóm hydrogel vào ngày thứ 7 cho thấy vật liệu này có thể tạo ra một môi trường thuận lợi hơn cho sự biệt hóa xương và quá trình khoáng hóa ban đầu của tế bào hMSCs so với môi trường biệt hóa tiêu chuẩn một mình. Các đặc tính của hydrogel như cấu trúc 3D xốp, khả năng tương tác với tế bào, các ion từ BG 58S-Fe có tác dụng kích thích biệt hóa xương.

Vào ngày thứ 14, mặc dù nhóm đối chứng cũng cho thấy mức độ khoáng hóa cao, nhưng hình ảnh cho thấy nhóm hydrogel có thể có mức độ khoáng hóa tương đương hoặc thậm chí rộng hơn. Hydrogel không chỉ thúc đẩy quá trình khoáng hóa sớm mà còn duy trì, tăng cường quá trình này trong giai đoạn sau của quá trình biệt hóa. Môi trường 3D do hydrogel cung cấp có thể tạo điều kiện thuận lợi hơn cho sự tổ chức và biệt hóa của tế bào so với môi trường 2D phẳng trong nhóm đối chứng. Tế bào trong môi trường 3D có thể tương tác với nhau và với vật liệu theo cách phức tạp hơn, dẫn đến sự biệt hóa xương hiệu quả hơn. Những biểu hiện trên của tế bào trong nghiên cứu đã góp phần chứng minh hệ vật liệu chế tạo từ quy trình đề ra đã góp phần tăng hiệu quả biệt hóa, tạo khoáng hóa của tế bào.

# KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

#### KÊT LUÂN

Nghiên cứu đã thành công trong việc phát triển hệ vật liệu Bioglass 58S tích hợp Hemin kết hợp với Hydrogel dẫn xuất kép Dopamine từ Alg và F127 phù hợp cho ứng dụng điều trị nội nha, đề tài thu được những kết quả sau:

1. Tổng hợp thành công vật liệu bioglass tích hợp hemin có hoạt tính bắt chước enzym HRP, có khả năng xúc tác phản ứng oxy hóa dopamin tạo liên kết ngang.

2. Tổng hợp được hydrogel dẫn xuất dopamine từ Alg, F127 có cấu trúc liên kết ngang mạnh mẽ nhờ vào sự hỗ trợ từ bioglass tích hợp hemin.

3. Hydrogel thu được có tính nhạy nhiệt và đặc tính cấu trúc phù hợp với ứng dụng trong tái tạo mô, có khả năng tương thích sinh học tốt, khoáng hóa trong môi trường giả sinh học SBF và tác dụng hỗ trợ biệt hóa và tăng sinh tế bào gốc trung mô.

Hệ nanocomposite hydrogel trên cơ sở bioglass kết hợp polymer trên có triển vọng trong việc phát triển các hệ thống hydrogel tiêm tại chỗ và ứng dụng trong tái tạo nội nha.

# KIẾN NGHỊ

Dựa trên những kết quả đạt được từ nghiên cứu này, một số định hướng nghiên cứu được đề xuất, gồm:

- Đánh giá khả năng phân hủy sinh học, an toàn sinh học và phản ứng miễn dịch trong điều kiện thực tế và trên mô hình động vật.
- Đánh giá hiệu quả tái tạo nội nha trên mô hình động vật.

# DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amrollahi, P.; Shah, B.; Seifi, A.; Tayebi, L. J. M. S.; C, E., Recent advancements in regenerative dentistry: A review. **2016**, *69*, 1383-1390.

2. Uppuluri, V. N. V. A.; Sathanantham, S. T.; Bhimavarapu, S. K.; Elumalai, L. J. A. P. B., Polymeric hydrogel scaffolds: skin tissue engineering and regeneration. **2021**, *12* (3), 437.

3. Chen, F.-M.; Sun, H.-H.; Lu, H.; Yu, Q. J. B., Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. **2012**, *33* (27), 6320-6344.

4. Purohit, S. D.; Singh, H.; Bhaskar, R.; Yadav, I.; Chou, C.-F.; Gupta, M. K.; Mishra, N. C. J. M. S.; C, E., Gelatin—alginate—cerium oxide nanocomposite scaffold for bone regeneration. **2020**, *116*, 111111.

5. Almoshari, Y.; Ren, R.; Zhang, H.; Jia, Z.; Wei, X.; Chen, N.; Li, G.; Ryu, S.; Lele, S. M.; Reinhardt, R. A. J. B., GSK3 inhibitor-loaded osteotropic Pluronic hydrogel effectively mitigates periodontal tissue damage associated with experimental periodontitis. **2020**, *261*, 120293.

6. Han, G.-Y.; Park, J. Y.; Lee, T.-H.; Yi, M.-B.; Kim, H.-J. J. A. A. M.; Interfaces, Highly resilient dual-crosslinked hydrogel adhesives based on a dopamine-modified crosslinker. **2022**, *14* (32), 36304-36314.

7. Vo Le, T. V.; Tran, N. Q.; Le Hang, D.; Nguyen, T. T.; Bui, Q. A.; Dinh Trung, N.; Dat Thinh, N.; Thi Hien, D.; Kim Ngan, T. T.; Nguyen, N. H. J. I. J. o. P. A.; Characterization, Impacting different structures of injectable pluronic-conjugated alginate (chitosan) hydrogels on their physicochemical characteristics and morphological fibroblast behavior. **2022**, *27* (3), 205-219.

8. Doan, P.; Nhi, T. T. Y.; Nguyen, D. T.; Nguyen, B. T.; Nguyen, T. P.; Tran, N. Q. J. I. J. o. B. M., Multifunctional injectable pluronic-cystaminealginate-based hydrogel as a novel cellular delivery system towards tissue regeneration. **2021**, *185*, 592-603.

9. Zohourfazeli, M.; Tajer, M. H. M.; Moghanian, A. J. C. I., Comprehensive investigation on multifunctional properties of zirconium and silver co-substituted 58S bioactive glass. **2021**, *47* (2), 2499-2507.

10. Bui, X. V.; Dang, T. H. J. P.; ceramics, a. o., Bioactive glass 58S prepared using an innovation sol-gel process. **2019**, *13* (1), 98-103.

11. Global Status Report on Oral Health 2022. https://www.who.int/team/noncommunicable-diseases/global-status-report-onoral-health-2022/.

12. Khusanovich, C. F. J. J. o. n. c. i., ANALYSIS OF ERRORS AND COMPLICATIONS FOUND IN THE USE OF ENDOCANAL CONSTRUCTIONS USED IN DENTISTRY. **2024**, *51* (2), 45-50.

13. Patel, J.; Wallace, J.; Doshi, M.; Gadanya, M.; Yahya, I. B.; Roseman, J.; Srisilapanan, P. J. T. L. H. L., Oral health for healthy ageing. **2021**, *2* (8), e521-e527.

14. Bệnh về răng miệng gây hậu quả ở nhiều mức độ khác nhau đối với sức khoẻ. <u>https://moh.gov.vn/tin-noi-bat/-</u>

/asset\_publisher/3Yst7YhbkA5j/content/thu-truong-bo-y-te-benh-ve-rangmieng-gay-hau-qua-o-nhieu-muc-o-khac-nhau-oi-voi-suc-khoe.

15. Nguyễn, T. H. M.; Trịnh, Đ. H. J. T. c. Y. h. V. N., TÌNH TRẠNG SÂU RĂNG VĨNH VIỄN Ở TRỂ EM VIỆT NAM NĂM 2019. **2021,** *502* (1).

16. Thanh, P. T. M.; Thanh, T. N. P.; Thủy, T. P. B.; Hiền, H. H. T. J. T. c. N. c. Y. h., 27. Tình trạng và nhu cầu điều trị răng miệng của bệnh nhân tại Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh. **2024**, *174* (1), 234-241.

17. New Trends in Endodontics and Treatment Planning. https://www.dentistrytoday.com/new-trends-in-endodontics-and-treatmentplanning/.

18. Drukteinis, S.; Rajasekharan, S.; Widbiller, M. J. J. o. f. b., Advanced Materials for Clinical Endodontic Applications: Current Status and Future Directions. **2024**, *15* (2), 31.

19. Aderibigbe, B. A.; Buyana, B. J. P., Alginate in wound dressings. **2018**, *10* (2), 42.

20. Smidsrød, O.; Skja, G. J. T. i. b., Alginate as immobilization matrix for cells. **1990**, *8*, 71-78.

21. Abka-Khajouei, R.; Tounsi, L.; Shahabi, N.; Patel, A. K.; Abdelkafi, S.; Michaud, P. J. M. d., Structures, properties and applications of alginates. **2022**, *20* (6), 364.

22. Abourehab, M. A.; Rajendran, R. R.; Singh, A.; Pramanik, S.; Shrivastav, P.; Ansari, M. J.; Manne, R.; Amaral, L. S.; Deepak, A. J. I. J. o. M. S., Alginate as a promising biopolymer in drug delivery and wound healing: A review of the state-of-the-art. **2022**, *23* (16), 9035.

23. Haug, A.; Larsen, B. In *A study on the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis*, Proceedings of the Fifth International Seaweed Symposium, Halifax, August 25–28, 1965, Elsevier: 1966; pp 271-277.

24. Lee, K. Y.; Mooney, D. J. J. P. i. p. s., Alginate: properties and biomedical applications. **2012**, *37* (1), 106-126.

25. Augst, A. D.; Kong, H. J.; Mooney, D. J. J. M. b., Alginate hydrogels as biomaterials. **2006**, *6* (8), 623-633.

26. Paredes Juárez, G. A.; Spasojevic, M.; Faas, M. M.; de Vos, P. J. F. i. b.; biotechnology, Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. **2014**, *2*, 26.

27. Mørch, Ý. J. u. d. N. U. o. S.; Technology, T., Norway, Novel alginate microcapsules for cell therapy. **2008**.

28. Akash, M. S. H.; Rehman, K. J. J. o. C. R., Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. **2015**, *209*, 120-138.

29. Lupu, A.; Gradinaru, L. M.; Rusu, D.; Bercea, M. J. G., Self-healing of Pluronic® F127 hydrogels in the presence of various polysaccharides. **2023**, *9* (9), 719.

30. Huỳnh Thị Ngọc, T. Nghiên cứu điều chế Hydrogel nhạy cảm với nhiệt độ cơ thể từ dẫn xuất Gelatin để mang nhả chậm Curcumin ứng dụng trong chữa lành vết thương. Đại học Trà Vinh, 2017.

31. Joughehdoust, S.; Manafi, S. J. M. S.-P., Synthesis and in vitro investigation of sol-gel derived bioglass-58S nanopowders. **2012**, *30*, 45-52.

32. Zhang, K.; Van Le, Q. J. J. o. C.; Compounds, Bioactive glass coated zirconia for dental implants: a review. **2020**, *2* (2), 10-17.

33. Pei, D.; Zeng, Z.; Geng, Z.; Cai, K.; Lu, D.; Guo, C.; Guo, H.; Huang, J.; Gao, B.; Yu, S. J. I. J. o. B. M., Modulation of macrophage polarization by secondary cross-linked hyaluronan-dopamine hydrogels. **2024**, *270*, 132417.

34. Zhong, Y.; Wang, J.; Yuan, Z.; Wang, Y.; Xi, Z.; Li, L.; Liu, Z.; Guo, X. J. C.; Biointerfaces, S. B., A mussel-inspired carboxymethyl cellulose hydrogel with enhanced adhesiveness through enzymatic crosslinking. **2019**, *179*, 462-469.

35. Estarreja, J.; Caldeira, G.; Silva, I.; Mendes, P.; Mateus, V. J. B., The pharmacological effect of hemin in inflammatory-related diseases: a systematic review. **2024**, *12* (4), 898.

36. Jin, S.; Wu, C.; Ye, Z.; Ying, Y. J. S.; Chemical, A. B., Designed inorganic nanomaterials for intrinsic peroxidase mimics: A review. **2019**, *283*, 18-34.

37. Sevari, S. P.; Shahnazi, F.; Chen, C.; Mitchell, J. C.; Ansari, S.; Moshaverinia, A. J. J. o. b. m. r. P. A., Bioactive glass-containing hydrogel delivery system for osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. **2020**, *108* (3), 557-564.

38. Ravanbakhsh, M.; Labbaf, S.; Karimzadeh, F.; Pinna, A.; Houreh, A. B.; Nasr-Esfahani, M. J. M. S.; C, E., Mesoporous bioactive glasses for the combined application of osteosarcoma treatment and bone regeneration. **2019**, *104*, 109994.

39. Van, T. D.; Tran, N. Q.; Nguyen, D. H.; Nguyen, C. K.; Tran, D. L.; Nguyen, P. T. J. J. o. E. M., Injectable hydrogel composite based gelatin-PEG and biphasic calcium phosphate nanoparticles for bone regeneration. **2016**, *45*, 2415-2422.

40. Tran, N. M.-P.; Dang, N. T.-N.; Nguyen, N. T.-P.; Nguyen, L. V.-H.; Quyen, T. N.; Tran, P. A.; Lee, B.-T.; Hiep, N. T. J. I. J. o. P. M.; Biomaterials, P., Fabrication of injectable bone substitute loading porous simvastatin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. **2020**, *69* (6), 351-362.

41. Nguyen, V. T.; Le, T. P.; Ton, T. P.; Nguyen, D. T.; Dang, N. N.; Nguyen, B. T.; Van Van, V.; Nguyen, T. H.; Tran, N. Q. J. I. J. o. B. M., Cytocompatible dendrimer G3. 0-hematin nanoparticle with high stability and solubility for mimicking horseradish peroxidase activity in in-situ forming hydrogel. **2021**, *177*, 360-369.

42. Bui, X. V.; Ngo, T. M. T. J. V. J. o. S. N. S.; Technology, Synthesis and characterization of a highly ordered mesoporous bio-glass. **2020**, *36* (1).

43. Ton, T. P.; Nguyen, V. T.; Doan, P.; Nguyen, D. T.; Nguyen, T. P.; Huynh, C. K.; Ngo, T. C. Q.; Dang, L. H.; Tran, N. Q. J. N. J. o. C., Hematin-conjugated gelatin as an effective catalyst for preparing biological hydrogels. **2021**, *45* (39), 18327-18336.

44. Li, X. J. J. o. a.; chemistry, f., Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. **2012**, *60* (25), 6418-6424.

45. Breczko, J.; Plonska-Brzezinska, M. E.; Echegoyen, L. J. E. A., Electrochemical oxidation and determination of dopamine in the presence of uric and ascorbic acids using a carbon nano-onion and poly (diallyldimethylammonium chloride) composite. **2012**, *72*, 61-67.

46. Fan, C.; Fu, J.; Zhu, W.; Wang, D.-A. J. A. b., A mussel-inspired double-crosslinked tissue adhesive intended for internal medical use. **2016**, *33*, 51-63.