

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Hoàng Kim Hùng**

**NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ HỆ NANO OXIT KẼM BIÊN TÍNH BỀ  
MẶT VỚI AXIT TANNIC VÀ GLUCOSE OXIDASE ĐỊNH HƯỚNG  
TĂNG CƯỜNG HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ UNG THƯ**

110

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT**

**Ngành: Hóa hữu cơ**

**Mã số: 8440114**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

**Người hướng dẫn 1**

*(Ký, ghi rõ họ tên)*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lê Thị Phương'.


**TS. Lê Thị Phương**

***Thành phố Hồ Chí Minh - Năm 2026***

## 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 toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

**Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên**

  
Hoàng Kim Hương

## LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin chân thành cảm ơn Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi có thể theo học chương trình cao học. Sự hỗ trợ và tạo cơ hội từ phía Học viện đã giúp tôi mở rộng kiến thức chuyên môn và phát triển kỹ năng nghiên cứu trong lĩnh vực mình theo đuổi.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất đến các quý thầy cô trong Học viện, những người đã tận tình giảng dạy và truyền đạt kinh nghiệm quý báu trong suốt quá trình tôi học tập và nghiên cứu tại đây. Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới TS. Lê Thị Phương - người đã trực tiếp hướng dẫn, định hướng và đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn. Với sự chỉ dẫn tận tình, những góp ý chuyên môn sâu sắc và sự khích lệ kịp thời của Cô, tôi đã có thể vượt qua những khó khăn trong quá trình nghiên cứu để hoàn thành luận văn này một cách tốt nhất. Những bài học về tư duy khoa học và tác phong làm việc nghiêm túc mà Cô truyền dạy sẽ là hành trang quý báu cho con đường sự nghiệp của tôi về sau.

Bên cạnh đó, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các anh chị đồng nghiệp trong phòng Công nghệ hoạt chất tự nhiên và các phòng ban khác thuộc Viện công nghệ tiên tiến. Sự hỗ trợ nhiệt tình của anh chị trong quá trình thực nghiệm, chia sẻ kinh nghiệm cũng như trao đổi học thuật đã giúp tôi hoàn thành tốt các nội dung nghiên cứu. Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn gia đình và bạn bè đã luôn ở bên, động viên và tạo điều kiện tốt nhất để tôi yên tâm học tập và nghiên cứu. Sự ủng hộ về tinh thần là nguồn động lực to lớn giúp tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Tp Hồ Chí Minh, ngày 24 tháng 04 năm 2026

Học viên cao học



Hoàng Kim Hương

## MỤC LỤC

<b>MỤC LỤC</b> .....	<b>i</b>
<b>DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT</b> .....	<b>iv</b>
<b>DANH MỤC CÁC BẢNG</b> .....	<b>v</b>
<b>DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ</b> .....	<b>vi</b>
<b>TÓM TẮT</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>4</b>
1.1. Tổng quan về ung thư .....	4
1.1.1. Định nghĩa và tình hình ung thư .....	4
1.1.2. Phương pháp điều trị ung thư truyền thống và thách thức .....	5
1.2. Tổng quan về vật liệu nano oxit kẽm trong điều trị ung thư .....	6
1.2.1. Giới thiệu về hạt nano oxit kẽm.....	6
1.2.2. Ứng dụng tiêu diệt tế bào ung thư của hạt nano oxit kẽm.....	8
1.3. Tổng quan về axit tannic .....	11
1.4. Tổng quan về glucose oxidase .....	13
1.5. Tình hình nghiên cứu .....	15
1.5.1. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	15
1.5.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước .....	17
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>21</b>
2.2.1. Hoá chất, dụng cụ và thiết bị .....	21
2.2.2. Tổng hợp ZnO-TA@GOx NPs.....	22
2.2.3. Đánh giá đặc tính hoá lý của hệ nano .....	22
2.2.4. Đánh giá khả năng tiêu thụ glucose và sản sinh H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> của hệ nano trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	23
2.2.5. Đánh giá khả năng xúc tác tạo NO của ZnO-TA@GOx NPs trong <i>in vitro</i> .....	24
2.2.6. Đánh giá độc tính tế bào của hệ nano trong <i>in vitro</i> .....	25
2.2.7. Đánh giá tính tương thích máu của hệ nano trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	26
2.2.8. Đánh giá khả năng giải phóng và tích lũy ion kẽm trong tế bào ..	26

2.2.9. Khảo sát sự tạo thành ROS nội bào .....	27
2.2.10. Đánh giá khả năng ức chế khối u của hệ nano trên mô hình chuột <i>in vivo</i> .....	28
2.2.11. Phân tích thống kê .....	28
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>30</b>
3.1. Kết quả tổng hợp và đánh giá đặc tính hoá lý của hệ nano .....	30
3.1.1. Kết quả đo UV-Vis của ZnO-TA NPs .....	31
3.1.2. Kết quả định lượng TA và GOx trên bề mặt vật liệu .....	31
3.1.3. Kết quả đo kích thước, chỉ số đa phân tán và thế zeta của hệ nano .....	33
3.1.4. Kết quả đo TEM và SEM của hệ nano .....	34
3.1.5. Kết quả đo FTIR của hệ nano .....	36
3.1.6. Kết quả đo XRD của hệ nano .....	37
3.2. Kết quả đánh giá khả năng tiêu thụ glucose và sản sinh H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> của hệ nano trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	38
3.3. Kết quả đánh giá khả năng xúc tác tạo NO của hệ nano trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	40
3.4. Kết quả đánh giá độc tính tế bào và khả năng tương thích sinh học của hệ nano trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	42
3.4.1. Kết quả đánh giá sự tương thích máu của hệ nano trong điều kiện <i>in vitro</i> .....	47
3.5. Kết quả đánh giá sự giải phóng và tích lũy ion kẽm trong tế bào .....	49
3.6. Kết quả đánh giá khả năng ức chế khối u của hệ nano trên mô hình chuột <i>in vivo</i> .....	52
3.6.1. Kết quả đánh giá khả năng ức chế khối u trên chuột .....	52
3.6.2. Kết quả nhuộm H&E của khối u trên chuột sau 21 ngày thử nghiệm .....	55
3.6.3. Kết quả phân tích huyết học toàn phần của chuột .....	57
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>60</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ .....</b>	<b>62</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>76</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>a</b>
Phụ lục 1: Đường chuẩn axit tannic trong nước cất .....	a
Phụ lục 2: Đường chuẩn glucose oxidase .....	a

Phụ lục 3: Đường chuẩn $H_2O_2$ .....	b
Phụ lục 4: Đường chuẩn $NaNO_2$ .....	b
Phụ lục 5: Đường chuẩn Kẽm .....	c
Phụ lục 6: Biểu đồ biểu diễn thông số huyết học của các nhóm chuột được xử lý với PBS, ZnO-TA và ZnO-TA@GOx NPs .....	c

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT**

<b>Tên viết tắt</b>	<b>Tên đầy đủ Tiếng Anh</b>	<b>Tên Tiếng Việt</b>
BCA	Bicinchoninic Acid	Axit bicinchoninic
DCFH-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DLS	Dynamic Light Scattering	Tán xạ ánh sáng động
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường nuôi cấy tế bào
FDA	Food and Drug Administration	Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
GOx	Glucose Oxidase	Enzyme glucose oxidase
GSH	Glutathione	Glutathione
GSNO	S-nitrosoglutathione	S-nitrosoglutathione
hDFBs	Human Dermal Fibroblasts	Tế bào nguyên bào sợi da người
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7	Dòng tế bào ung thư vú MCF-7
MDR	Multidrug Resistance	Đa kháng thuốc
PBS	Phosphate Buffered Saline	Dung dịch đệm phosphate
RNS	Reactive Nitrogen Species	Các gốc nitơ tự do
RONS	Reactive Oxygen and Nitrogen Species	Các gốc oxy và nitơ tự do
ROS	Reactive Oxygen Species	Các gốc oxy tự do
TA	Tannic Acid	Axit tannic
UV-Vis	Ultraviolet-Visible Spectroscopy	Phổ hấp thụ tử ngoại – khả kiến
ZnO NPs	Zinc Oxide Nanoparticles	Hạt nano oxit kẽm

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

<b>Bảng 3.1.</b> Đường kính thủy động học, chỉ số đa phân tán và thế zeta của hệ nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx.....	33
<b>Bảng 3.2.</b> Phân tích huyết học toàn phần của chuột được điều trị và không được điều trị. ....	58

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

<b>Hình 1.1.</b> (A) Dữ liệu thống kê về số ca mắc và tử vong do ung thư trên toàn cầu qua các năm. (B) Phân bố tỷ lệ các loại ung thư phổ biến tại Việt Nam ở cả 2 giới vào năm 2022 (theo GLOBOCAN).....	5
<b>Hình 1.2.</b> Các cơ chế kháng thuốc của tế bào ung thư [11] .....	6
<b>Hình 1.3.</b> Các ứng dụng y sinh học đa dạng của hạt nano kim loại [14] .....	7
<b>Hình 1.4.</b> Cơ chế chống ung thư của hạt nano ZnO [19] .....	9
<b>Hình 1.5.</b> Cấu trúc axit tannic (A) và cơ chế khử ion $Zn^{2+}$ của axit tannic tạo thành hạt nano ZnO (B).....	12
<b>Hình 1.6.</b> Cơ chế kháng ung thư của axit tannic [59] .....	13
<b>Hình 1.7.</b> Liệu pháp bổ đôi tế bào trong điều trị ung thư dựa trên GOx [66] .....	15
<b>Hình 1.8.</b> Hệ nano $Fe_3O_4@CTS-mPEG$ ứng dụng mang thuốc paclitaxel [70] .....	16
<b>Hình 1.9.</b> Hệ nano bạc biến tính bề mặt với HA mang thuốc doxorubicin [75] .....	17
<b>Hình 1.10.</b> Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của hệ nano oxit sắt từ biến tính với GOx và polydopamine [76].....	18
<b>Hình 1.11.</b> Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của hệ nano PCL-b-PArg mang chất cho $\bullet NO$ [35] .....	19
<b>Hình 1.12.</b> Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của hệ hạt nano ZnO trong cấu trúc khung cơ kim Cu-MOF [77] .....	20
<b>Hình 3.1.</b> Sơ đồ minh họa quá trình tổng hợp hạt nano ZnO-TA@GOx nhằm tạo ra hiệu quả hiệp đồng trong điều trị ung thư. (A) Quy trình tổng hợp hạt nano ZnO-TA@GOx. (B) Sau khi tích lũy tại mô khối u thông qua hiệu ứng tăng tính thấm và lưu giữ, các hạt nano ZnO-TA@GOx kích hoạt quá trình giải phóng $H_2O_2$ và NO thông qua phản ứng phân hủy glucose được xúc tác bởi GOx và quá trình phân hủy chất cho nội sinh S-nitrosoglutathione do ZnO xúc tác. 30	
<b>Hình 3.2.</b> Phổ UV-Vis của ZnO-TA NPs.....	31
<b>Hình 3.3.</b> Ảnh hưởng của nồng độ TA đến mức độ liên hợp của TA lên bề mặt ZnO NPs.....	32
<b>Hình 3.4.</b> Ảnh hưởng của nồng độ GOx đến mức độ liên hợp của GOx lên bề mặt ZnO-TA NPs .....	33

<b>Hình 3.5.</b> Kết quả đo đường kính thủy động học và thế zeta của hệ nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx .....	35
<b>Hình 3.6.</b> Hình ảnh quan sát được thông qua kính hiển vi điện tử truyền qua của ZnO-TA (bên trái) và ZnO-TA@GOx (bên phải).....	36
<b>Hình 3.7.</b> Phổ FTIR của hệ nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx.....	37
<b>Hình 3.8.</b> Phổ nhiễu xạ tia X của ZnO-TA và ZnO-TA@GOx .....	38
<b>Hình 3.9.</b> Sự tạo thành H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>in vitro</i> theo (A) nồng độ hạt nano và (B) mức độ liên hợp của GOx trên bề mặt hạt nano.....	39
<b>Hình 3.10.</b> Sự thay đổi giá trị pH do phản ứng giữa các hạt nano ZnO-TA@GOx với các nồng độ glucose khác nhau.....	40
<b>Hình 3.11.</b> Khả năng xúc tác phân huỷ GSNO tạo thành NO của hệ nano ZnO-TA@GOx ở các nồng độ khác nhau .....	41
<b>Hình 3.12.</b> Thử nghiệm độc tính tế bào định lượng WST-1 trên tế bào bình thường (hDFBs) khi tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của hạt nano. ....	43
<b>Hình 3.13.</b> Thử nghiệm độc tính tế bào định lượng WST-1 trên tế bào tế bào bình thường (hDFBs) khi tiếp xúc với các nồng độ khác nhau của hạt nano. ....	45
<b>Hình 3.14.</b> Hình ảnh nhuộm sống/chết của tế bào MCF-7 và hDFBs .....	47
<b>Hình 3.15.</b> Tỷ lệ tan huyết của hồng cầu sau khi tiếp xúc với ZnO-TA@GOx NPs ở các nồng độ khác nhau. ....	48
<b>Hình 3.16.</b> Hình ảnh đại thể của hồng cầu sau xử lý với các mẫu hạt nano. .	49
<b>Hình 3.17.</b> Biểu đồ giải phóng ion Zn <sup>2+</sup> từ ZnO-TA và ZnO-TA@GOx NPs .....	50
<b>Hình 3.18.</b> Định lượng sự tích lũy kẽm nội bào trong tế bào bình thường (hDFBs) và tế bào ung thư (MCF-7). ....	51
<b>Hình 3.19.</b> (B) Hình ảnh huỳnh quang biểu thị sự tạo thành ROS, được phát hiện bằng phương pháp nhuộm DCFH-DA, trong tế bào hDFBs và MCF-7 sau 6 giờ xử lý với các công thức khác nhau. Thước tỷ lệ tương ứng 100 μm. ....	52
<b>Hình 3.20.</b> Sự thay đổi thể tích khối u theo thời gian .....	53
<b>Hình 3.21.</b> Sự thay đổi khối lượng cơ thể chuột theo thời gian. ....	54
<b>Hình 3.22.</b> Hình ảnh đại thể của chuột mang khối u ở ngày thứ 16 điều trị. .	55
<b>Hình 3.23.</b> Lát cắt mô khối u nhuộm H&E của các nhóm điều trị khác nhau. Thanh tỷ lệ: 100 μm. ....	56

## TÓM TẮT

Các hạt nano oxit kẽm đã được biết đến với tiềm năng trong điều trị ung thư nhờ khả năng gây độc chọn lọc và tính tương thích sinh học cao. Dựa vào những đặc tính hoá-lý độc đáo, một hệ nano kim loại trên nền ZnO đã được phát triển trong nghiên cứu này. Hệ nano dự kiến có khả năng chọn lọc khối u, tiêu diệt tế bào ung thư bằng cơ chế gây stress oxy hóa thông qua các gốc oxy và nitơ tự do kết hợp với liệu pháp bổ đôi tế bào. Cụ thể, các hạt nano ZnO được tổng hợp và ổn định bằng axit tannic, sau đó enzyme glucose oxidase được cố định lên bề mặt ZnO-TA thông qua liên kết hydro hoặc liên kết cộng hóa trị giữa các nhóm chức của TA và enzyme. Đặc tính cấu trúc và hình thái của các hạt nano được phân tích bằng phổ hồng ngoại biến đổi Fourier, nhiễu xạ tia X, kính hiển vi điện tử truyền qua và kính hiển vi điện tử quét. Hệ nano ZnO-TA@GOx thu được có đường kính thủy động lực học khoảng 200 nm và có khả năng tiêu thụ các phân tử nội sinh trong tế bào, đồng thời tạo ra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và NO thúc đẩy quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư. Các thí nghiệm *in vitro* cho thấy ZnO-TA@GOx có tính chọn lọc cao, làm giảm mạnh khả năng sống của tế bào ung thư vú (MCF-7) khi có sự hiện diện của glucose nhưng không gây độc đáng kể đối với tế bào thường (hDFBs). Ngoài ra, trong mô hình *in vivo*, ZnO-TA@GOx thể hiện khả năng ức chế hiệu quả sự phát triển khối u mà không gây ra những thay đổi đáng kể về khối lượng cơ thể hay các chỉ số huyết học trong suốt 2 tuần điều trị. Tóm lại, ZnO-TA@GOx là một vật liệu nano tiềm năng hứa hẹn góp phần thúc đẩy sự phát triển của các chiến lược điều trị đa cơ chế nhằm nâng cao hiệu quả điều trị ung thư.

**ABSTRACT**

Zinc oxide nanoparticles exhibit a promising agent in anticancer therapy. Based on the unique properties of ZnO NPs, a tumor-selective ZnO-based nanomaterial was developed in this study that integrates RONS-mediated oxidative stress with starvation therapy. Specifically, ZnO NPs were synthesized and stabilized with tannic acid, followed by immobilization of glucose oxidase onto the ZnO-TA surface by hydrogen or covalent bonding. Structural and morphological features of NPs were characterized using Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. The resulting ZnO-TA@GOx NPs simultaneously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO, significantly enhancing cancer cell apoptosis through oxidative stress-induced damage. *In vitro* assays demonstrated selective cytotoxicity of ZnO-TA@GOx, with negligible effects on normal human dermal fibroblasts (hDFBs) and marked reduction in the viability of breast cancer cells (MCF-7), particularly in the presence of glucose. Moreover, in a subcutaneous xenograft mouse model, ZnO-TA@GOx effectively suppressed tumor growth without causing meaningful changes in body weight or hematological parameters over a 2-week treatment period. Overall, ZnO-TA@GOx represents a promising multifunctional nanoplatform for advancing multimodal therapeutic strategies to achieve improved anticancer efficacy.

## MỞ ĐẦU

### 1. Lý do chọn đề tài

Ung thư là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu và là rào cản trong việc tăng tuổi thọ trên toàn thế giới. Ung thư không chỉ ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe mà còn là gánh nặng lớn đối với hệ thống y tế và kinh tế xã hội. Mặc dù đã có nhiều phương pháp điều trị ung thư được nghiên cứu và ứng dụng, nhưng việc tối ưu hóa hiệu quả điều trị vẫn là một thách thức lớn. Các liệu pháp đơn trị liệu truyền thống như hóa trị và xạ trị thường gây ra nhiều tác dụng phụ nghiêm trọng do độc tính toàn thân cao, khả năng chọn lọc thấp và nguy cơ xuất hiện tình trạng kháng thuốc. Trong bối cảnh đó, công nghệ nano đang nổi lên như một hướng tiếp cận đầy tiềm năng nhờ khả năng thiết kế các hệ vật liệu sinh học đa chức năng có thể tăng cường sự tích lũy tại mô khối u, nâng cao hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư và đồng thời giảm thiểu tác dụng phụ đối với mô lành. Hạt nano oxit kẽm là một loại nano oxit kim loại có tính an toàn cao và có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư hiệu quả dựa vào việc kích thích sản sinh gốc oxy hóa mạnh có nguồn gốc từ Oxy và Nitơ (RONS). RONS bao gồm các gốc ROS (ví dụ  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$ ) và RNS ( $\text{NO}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ). Các gốc oxy hóa có thể tấn công trực tiếp vào màng tế bào, ty thể, protein và DNA, gây rối loạn chức năng, đứt gãy chuỗi DNA, biến tính enzyme, từ đó dẫn đến chết tế bào theo chương trình hoặc chết hoại tử. Ngoài ra, các hạt nano oxit kim loại thường được biến tính với các phân tử có hoạt tính sinh học nhằm nâng cao hiệu quả điều trị đồng thời tăng tính ổn định và tương thích sinh học.

Axit tannic là một polyphenol tự nhiên có cấu trúc giàu nhóm hydroxyl phenolic, có khả năng tương tác mạnh với bề mặt vật liệu thông qua liên kết hydro hoặc tương tác phối trí. Khi được phủ lên bề mặt ZnO, TA không chỉ giúp cải thiện độ phân tán và độ ổn định của hệ nano mà còn tạo nên tầng thuận lợi cho quá trình gắn kết các phân tử sinh học. Đồng thời, hợp chất này còn có thể góp phần nâng cao hiệu quả điều trị nhờ đặc tính sinh học và tiềm năng chống ung thư của các polyphenol tự nhiên. Bên cạnh đó, glucose oxidase được biết đến là enzyme có khả năng xúc tác quá trình oxy hóa glucose tạo thành axit gluconic và hydrogen peroxide. Phản ứng này vừa làm suy giảm nguồn glucose vốn là một cơ chất thiết yếu cho quá trình chuyển hóa năng lượng của tế bào ung thư, vừa góp phần làm gia tăng stress oxy hóa trong nội bào. Sự kết hợp giữa TA và GOx trên bề mặt hạt nano oxit kẽm được kỳ vọng sẽ tạo ra hệ nano

ZnO-TA@GOx có khả năng tăng cường hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư thông qua cơ chế hiệp đồng giữa liệu pháp bỏ đói và stress oxy hóa. Từ những cơ sở trên, hệ nano ZnO-TA@GOx được xem là một nền tảng nano đa chức năng đầy tiềm năng, hứa hẹn góp phần nâng cao hiệu quả điều trị ung thư.

Trước đây, ZnO, TA và GOx đã được nghiên cứu trong nhiều hệ vật liệu nano khác nhau phục vụ các ứng dụng y sinh. Tuy nhiên, việc tích hợp đồng thời ba thành phần này trong cùng một hệ nano đa chức năng nhằm khai thác hiệu quả điều trị ung thư theo cơ chế phối hợp vẫn còn rất hạn chế. Đây chính là khoảng trống nghiên cứu đáng chú ý, khi mà đến nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu làm rõ một cách có hệ thống hiệu ứng hiệp đồng giữa liệu pháp bỏ đói do GOx xúc tác tiêu thụ glucose và quá trình khuếch đại stress oxy hóa tại chỗ do ZnO cảm ứng trong vi môi trường khối u. Trên cơ sở đó, tính mới của đề tài nằm ở việc phát triển hệ nano ZnO-TA@GOx như một hệ vật liệu nano tích hợp đa cơ chế, có khả năng đồng thời gây thiếu hụt nguồn năng lượng của tế bào ung thư và thúc đẩy tổn thương oxy hóa nội bào, từ đó định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư.

## 2. Mục đích nghiên cứu

Mục đích của đề tài là phát triển hệ nano ZnO-TA@GOx đa chức năng có khả năng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư thông qua sự phối hợp giữa liệu pháp bỏ đói và stress oxy hóa tại chỗ.

## 3. Nội dung nghiên cứu

**Nội dung 1:** Tổng hợp và xác định các tính chất hóa lý, đặc điểm hình thái của hạt nano ZnO biến tính bề mặt với TA và GOx.

**Nội dung 2:** Khảo sát khả năng sản sinh RONS (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) của ZnO-TA@GOX.

**Nội dung 3:** Thử nghiệm *in vitro* đánh giá khả năng tương thích sinh học và gây độc tế bào ung thư của ZnO-TA@GOX.

**Nội dung 4:** Đánh giá khả năng tiêu diệt khối u của ZnO-TA@GOX trên mô hình động vật.

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

Cơ sở khoa học của hệ nano ZnO-TA@GOx dựa trên cơ chế phối hợp giữa liệu pháp bỏ đói và stress oxy hóa tại chỗ trong điều trị ung thư. Cơ chế tác động riêng lẻ của từng thành phần đối với tế bào ung thư đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu trước đây. Trong đó, ZnO có khả năng giải phóng ion

$Zn^{2+}$  trong môi trường pH thấp đặc trưng của khối u, từ đó gây rối loạn cân bằng nội môi ion và ảnh hưởng đến hoạt động của các protein phụ thuộc kẽm, dẫn đến sự gia tăng sản sinh các tác nhân oxy hóa mạnh (RONS) và cuối cùng gây chết tế bào ung thư. GOx có khả năng tiêu thụ glucose, xúc tác quá trình oxy hóa glucose để tạo thành axit gluconic và  $H_2O_2$ . Cuối cùng axit tannic đóng vai trò là chất khử và chất ổn định cho ZnO NPs, giúp kiểm soát quá trình hình thành hạt, hạn chế hiện tượng kết tụ, đồng thời tạo nền tảng thuận lợi cho việc gắn GOx lên bề mặt ZnO. Sự kết hợp ZnO, TA và GOx trong hệ ZnO-TA@GOx được kỳ vọng tạo ra hiệu ứng hiệp đồng, phù hợp với xu hướng phát triển các hệ nano trị liệu đa cơ chế.

Về tính thực tiễn, ung thư đang là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu tại Việt Nam, trong khi hiệu quả điều trị vẫn còn bị hạn chế bởi độc tính, tác dụng phụ và hiện tượng kháng thuốc của các phương pháp truyền thống. Việc nghiên cứu và phát triển hệ nano ZnO-TA@GOx có ý nghĩa thực tiễn trong việc định hướng tạo ra một nền vật liệu điều trị mới có khả năng tác động đa cơ chế, nâng cao hiệu quả điều trị và mở rộng tiềm năng ứng dụng của công nghệ nano trong y sinh học và điều trị ung thư.

## **5. Những đóng góp của luận văn**

Luận văn có một số đóng góp chính như sau:

- Xây dựng quy trình điều chế hệ nano ZnO-TA@GOx.
- Bổ sung cơ sở khoa học cho chiến lược điều trị ung thư phối hợp giữa liệu pháp bỏ đói và stress oxy hóa tại chỗ.
- Làm rõ tiềm năng của hệ nano trong điều trị ung thư theo cơ chế đáp ứng vi môi trường khối u, qua đó góp phần nâng cao tính chọn lọc sinh học đối với tế bào ung thư so với tế bào bình thường.
- Đặt nền tảng khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về phát triển vật liệu nano kim loại thông minh trong điều trị ung thư.

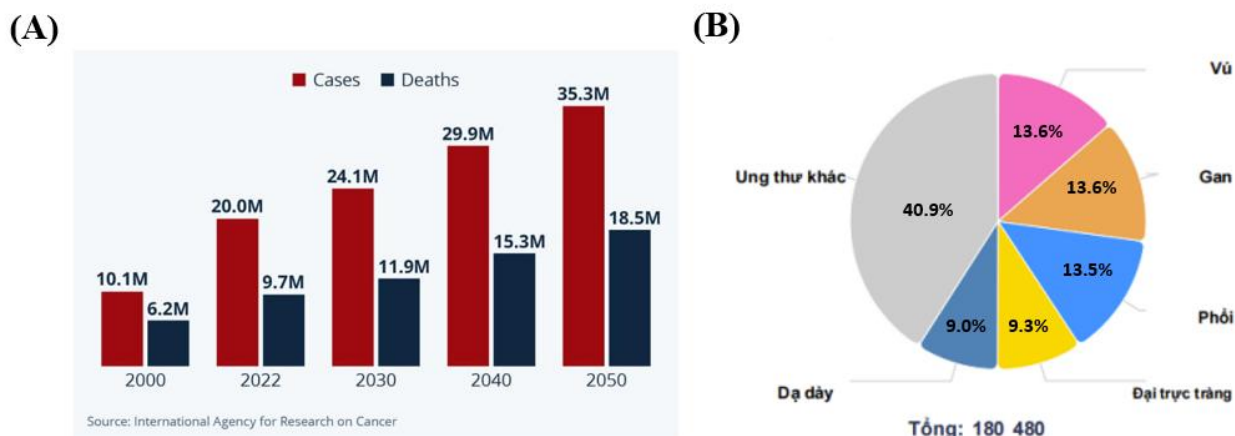
## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Tổng quan về ung thư

#### 1.1.1. Định nghĩa và tình hình ung thư

Ung thư là một trong những căn bệnh nguy hiểm và có tỷ lệ tử vong cao trên toàn thế giới. Nguồn gốc của bệnh bắt nguồn từ sự đột biến ngẫu nhiên trong các tế bào, khiến chúng phát triển và tăng sinh mất kiểm soát và hình thành nên khối u [1]. Nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời, các tế bào ung thư có thể tiếp tục xâm lấn và di căn đến các mô hoặc cơ quan khác thông qua hệ tuần hoàn và hệ bạch huyết. Khoảng 90% ca bệnh tử vong do ung thư có liên quan trực tiếp đến quá trình di căn [2]. Do đó, việc nghiên cứu chuyên sâu về ung thư cùng với các phương pháp điều trị vẫn đang mỗi quan tâm lớn đối với nền y học hiện đại.

Theo dữ liệu thống kê GLOBOCAN mới nhất từ Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế, năm 2022, toàn cầu ghi nhận khoảng 20 triệu ca mắc ung thư mới. Dự báo đến năm 2050, con số này sẽ tăng lên đến 35,3 triệu, tương đương với 76% so với năm 2022 (**Hình 1.1**). Trong số các ca mắc có khoảng 9,7 triệu ca tử vong do ung thư và ước tính cứ 5 bệnh nhân sẽ có 1 người mắc ung thư trong suốt cuộc đời, điều này phản ánh xu hướng gia tăng đáng kể gánh nặng ung thư trên toàn thế giới [3]. Riêng tại Việt Nam, ước tính số ca mắc ung thư mới theo GLOBOCAN năm 2022 là 180.480 ca và số ca tử vong là hơn 120.000 ca. So với năm 2020, tỷ lệ mắc và tử vong do ung thư đã giảm nhẹ nhưng không đáng kể (182.563 ca mới và 122.690 ca tử vong). Ung thư gan là loại ung thư phổ biến nhất ở nam giới, chiếm khoảng 20% tổng số ca mắc; trong khi đó, ung thư vú là loại phổ biến nhất ở nữ giới với tỷ lệ gần 30%. GLOBOCAN cũng cảnh báo Việt Nam xếp thứ 90 trong số 185 quốc gia về tỷ lệ ca mắc ung thư mới và tỷ lệ tử vong do ung thư xếp thứ 50 trong số 185 quốc gia [4,5]. Những số liệu thống kê trên đã nhấn mạnh mức độ nguy hiểm của căn bệnh ung thư, đồng thời cho thấy tầm quan trọng của việc nâng cao nhận thức cộng đồng về tầm soát, phát hiện sớm và điều trị kịp thời.



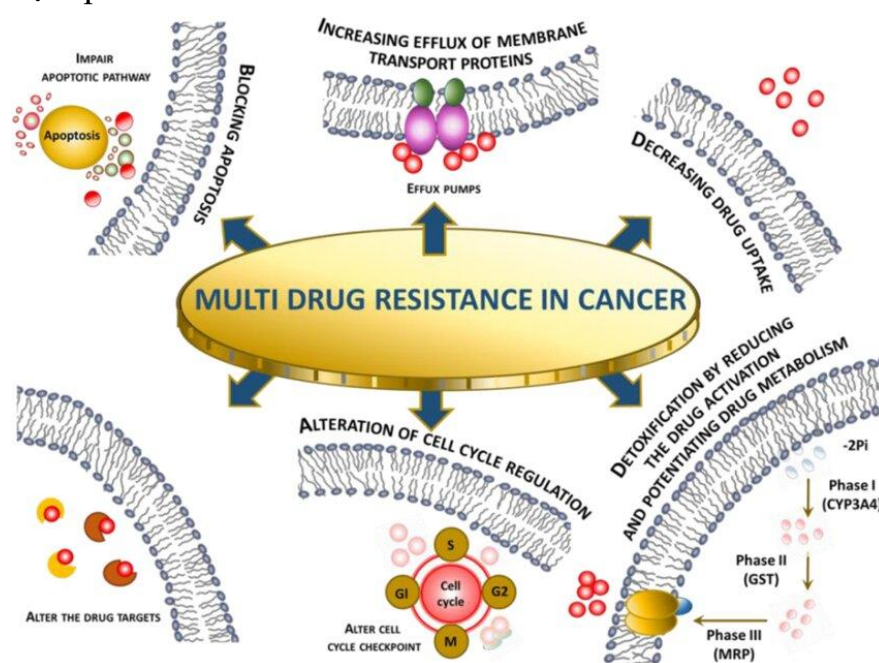
**Hình 1.1.** (A) Dữ liệu thống kê về số ca mắc và tử vong do ung thư trên toàn cầu qua các năm. (B) Phân bố tỷ lệ các loại ung thư phổ biến tại Việt Nam ở cả 2 giới vào năm 2022 (theo GLOBOCAN)

### 1.1.2. Phương pháp điều trị ung thư truyền thống và thách thức

Việc điều trị ung thư là một thách thức lớn, đòi hỏi sự phối hợp của nhiều liệu pháp khác nhau tùy thuộc vào loại ung thư và giai đoạn tiến triển của bệnh. Các phương pháp điều trị ung thư phổ biến hiện nay bao gồm: phẫu thuật, xạ trị, hoá trị, liệu pháp gene, liệu pháp hormone, liệu pháp miễn dịch, ghép tế bào gốc ngoại vi,... [1]. Trong số các phương pháp trên, hóa trị là một phương pháp điều trị ung thư dễ tiếp cận do giá thành rẻ và dễ thực hiện [6]. Đây là phương pháp sử dụng các loại thuốc có tác dụng gây độc tế bào ung thư như: Doxorubicin, Cisplatin, Paclitaxel, Trabectedin,... Cơ chế tác động đến tế bào ung thư của các loại thuốc này chủ yếu dựa trên sự alkyl hoá, ức chế phân tử sinh học như enzyme topoisomerase, quá trình hình thành tubulin, phá vỡ cấu trúc phân tử như DNA, protein, ức chế các con đường dẫn truyền tín hiệu hoặc gây ngừng chu kỳ tế bào dẫn đến apoptosis [7]. Ưu điểm của hoá trị là khả năng gây độc tế bào mạnh nhưng tính sinh khả dụng kém, thiếu tính đặc hiệu là nhược điểm lớn nhất của phương pháp này. Thuốc hoá trị có xu hướng tấn công tế bào lành tính có tốc độ phân chia nhanh tương tự tế bào ung thư như: tế bào da, nang lông, tế bào máu, dạ dày, ruột, niêm mạc miệng,...[8]. Đây chính là nguyên nhân gây nên các tác dụng phụ nghiêm trọng ảnh hưởng đến người bệnh như: rụng tóc, thiếu máu, loét miệng, buồn nôn, tiêu chảy...[9]

Một trong những nguyên nhân khiến việc điều trị bằng thuốc thất bại là các tế bào khối u phát triển khả năng đề kháng đối với thuốc chống ung thư hay còn gọi là hiện tượng kháng đa thuốc ở khối u (MDR). MDR ở khối u có thể

được hình thành thông qua nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm: đột biến oncogene, những biến đổi trong vi môi trường khối u, biến đổi điều hoà chu kỳ tế bào, tính không đồng nhất của khối u, đột biến tại vị trí đích tác dụng của thuốc, ngăn cản kích hoạt apoptosis hoặc thay đổi mức độ biểu hiện gen (**Hình 1.2**) [10,11]. Để khắc phục những hạn chế về tính đặc hiệu của hoá trị truyền thống, việc phát triển các chiến lược hướng đích là vô cùng quan trọng để tối ưu hoá khả năng phân phối thuốc tới khối u mục tiêu, nâng cao hiệu quả điều trị, đồng thời hạn chế sự tích tụ và giảm độc tính của thuốc tại các mô lành tính. Trong bối cảnh đó, y học nano - một lĩnh vực giao thoa giữa y sinh học, công nghệ nano và vật liệu sinh học đã nổi lên như một hướng tiếp cận đầy hứa hẹn nhằm khắc phục những hạn chế nêu trên. Trong đó, các hạt nano kim loại được xem là một bước tiến quan trọng hướng tới việc phát triển các chiến lược điều trị ung thư hiệu quả hơn.



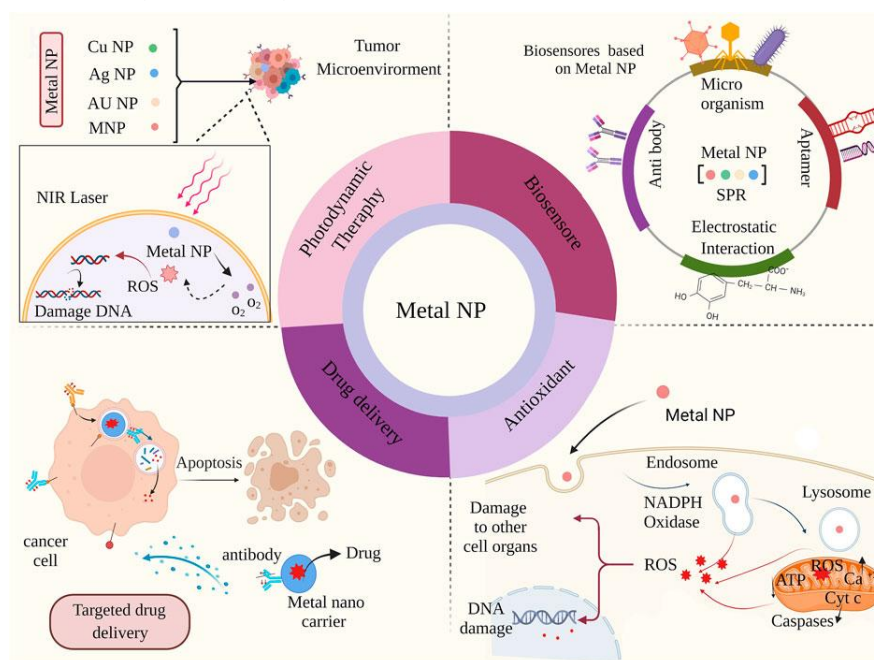
**Hình 1.2.** Các cơ chế kháng thuốc của tế bào ung thư [11]

## 1.2. Tổng quan về vật liệu nano oxit kẽm trong điều trị ung thư

### 1.2.1. Giới thiệu về hạt nano oxit kẽm

Trong nhiều thập kỷ qua, các hạt nano kim loại đã nhận được sự quan tâm đáng kể từ cộng đồng khoa học và ngày càng được khai thác mạnh mẽ trong các nghiên cứu liên quan đến điều trị ung thư. Ứng dụng của các hạt nano kim loại xuất phát từ những đặc tính hóa lý độc đáo của chúng, bao gồm khả năng kiểm soát chính xác hình dạng, kích thước, điện tích hay hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt... [12]. Các hạt nano kim loại có thể được tổng hợp với nhiều

hình dạng và kích thước khác nhau thông qua các phương pháp vật lý, hóa học hoặc sinh học. Đặc biệt, tỷ lệ diện tích bề mặt trên thể tích cao cho phép các hạt nano kim loại được biến tính bề mặt với nhiều nhóm chức, phân tử có hoạt tính sinh học khác nhau nhằm đáp ứng với các kích thích trong và ngoài tế bào, từ đó tăng hiệu quả điều trị ung thư [13]. Vật liệu nano kim loại được phân loại bao gồm các dạng kim loại nguyên chất (bạc, vàng, đồng) và dạng oxit kim loại ( $\text{TiO}_2$ , silicate, ZnO và  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) [14]. Các vật liệu này đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây về tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực dược phẩm và y sinh học (**Hình 1.3**).



**Hình 1.3.** Các ứng dụng y sinh học đa dạng của hạt nano kim loại [14]

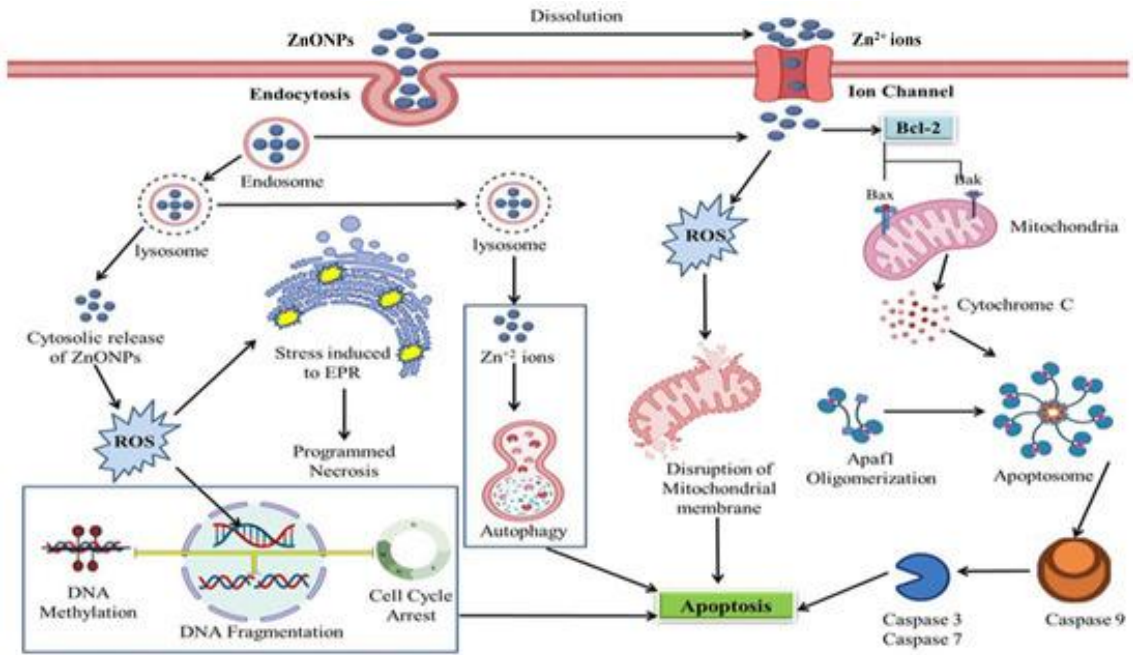
Trong số các hạt nano kim loại, hạt nano oxit kẽm (ZnO NPs) là một trong những ứng cử viên được khai thác nhiều nhất nhờ các đặc tính ưu việt như khả năng tương thích sinh học cao, quy trình tổng hợp đơn giản và gây độc tính tế bào chọn lọc. ZnO NPs là các hạt có kích thước từ 10-100 nm và có thể được tổng hợp bằng nhiều phương pháp khác nhau. Với thiết kế và kích thước phù hợp, ZnO NPs có thể dễ dàng di chuyển đến vị trí khối u thông qua hệ tuần hoàn và xâm nhập vào tế bào nhờ hiệu ứng EPR, kết quả làm tăng sự tích lũy ZnO NPs tại mô ung thư đồng thời tăng cường hiệu quả tiêu diệt khối u [15].

Về tính chất, kẽm là một kim loại chuyển tiếp có màu xám bạc, tồn tại ở trạng thái oxy hóa +2 và có năm đồng vị bền. Dạng khối của ZnO đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận là vật liệu an toàn và có thể dễ dàng bị phân hủy sinh học hoặc tham gia vào chu trình chuyển

hoá dinh dưỡng của cơ thể [16]. Kẽm đóng vai trò quan trọng trong điều hoà các hoạt động tế bào như sao chép, sửa chữa DNA, điều hoà chu kỳ tế bào và duy trì cân bằng nội môi của cơ thể [17,18]. Sự mất cân bằng nồng độ kẽm (nồng độ ion  $Zn^{2+}$  tự do nội bào  $> 100$  nM) có thể dẫn đến rối loạn nghiêm trọng đối với nhiều quá trình sinh học. Ngoài ra, sự thiếu hụt nồng độ kẽm có thể dẫn đến rối loạn cân bằng nội môi tế bào, gây tổn thương DNA và tăng nguy cơ ung thư. Ngược lại, khi lượng kẽm nội bào vượt quá khả năng điều hoà nội môi kẽm của cơ thể, nó sẽ phá vỡ hệ thống vận chuyển kẽm qua màng tế bào, dẫn đến tăng tích lũy kẽm nội bào, từ đó kích hoạt apoptosis và gây chết tế bào [19]. Dựa vào những phát hiện về tác động gây hại của hàm lượng kẽm dư thừa, các hạt nano ZnO đã được thiết kế nhằm khai thác cơ chế này để tiêu diệt tế bào ung thư.

### 1.2.2. Ứng dụng tiêu diệt tế bào ung thư của hạt nano oxit kẽm

Tiềm năng chống ung thư của ZnO NPs đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu trước đây [20–22]. Khả năng gây độc tế bào của ZnO NPs dựa trên 3 cơ chế chính: Sự hoà tan kẽm nội bào làm mất cân bằng hoạt tính protein phụ thuộc kẽm, sản sinh ROS gây stress oxy hoá và phá huỷ DNA dẫn đến apoptosis. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy ZnO NPs có xu hướng hoà tan và giải phóng ion  $Zn^{2+}$  mạnh hơn trong môi trường có pH thấp của tế bào ung thư (pH 5.5) so với môi trường ngoại bào (pH 7.4) [23–25]. Môi trường pH càng thấp, tốc độ hoà tan và giải phóng ion kẽm từ ZnO NPs càng mạnh. Như minh hoạ trong **hình 1.4**, ZnO NPs có thể xâm nhập tế bào một cách trực tiếp hoặc thông qua các túi nội bào như endosome. Ở giai đoạn sớm, endosome có pH khoảng 6.3 tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình bắt đầu giải phóng ion  $Zn^{2+}$ . Khi endosome trưởng thành đến giai đoạn muộn, pH tiếp tục giảm xuống 5.5 và đạt tới 4.7 sau khi hợp nhất với lysosome. Ở giai đoạn này, ZnO NPs bị hòa tan nhanh chóng dẫn đến sự giải phóng ồ ạt ion  $Zn^{2+}$  vào bào tương khi màng lysosome bị phá vỡ [19]. Tóm lại, môi trường pH thấp là yếu tố then chốt trong ứng dụng điều trị ung thư của ZnO NPs.



**Hình 1.4.** Cơ chế chống ung thư của hạt nano ZnO [19]

#### 1.2.2.1. Tiêu diệt tế bào ung thư dựa trên ROS

Sự giải phóng đột ngột của ion  $Zn^{2+}$  trong môi trường axit làm tăng nhanh hàm lượng kẽm nội bào, dẫn đến rối loạn hoạt tính của các protein phụ thuộc vào kẽm. Hệ quả là nhiều quá trình thiết yếu cho sự sống còn của tế bào ung thư bị ảnh hưởng, từ đó kích hoạt apoptosis [15,26]. Sự gia tăng ion  $Zn^{2+}$  nội bào cũng kéo theo quá trình sản sinh các gốc oxy và nitơ tự do (RONS) gây stress oxy hóa tổn thương tế bào [27]. Các hạt nano kim loại sản sinh ROS thông qua 2 cơ chế chính: (1) Phản ứng viêm do tế bào được kích hoạt nhằm đáp ứng với sự hiện diện của hạt nano, từ đó dẫn đến tăng sinh ROS. (2) Sự tích tụ electron trên bề mặt ZnO NPs xảy ra do tính chất bán dẫn cho phép chúng hoạt động như một hệ thống phản ứng oxy hóa-khử với các phân tử sinh học, trực tiếp tạo ra ROS trong điều kiện nội bào. Ngoài ra, ZnO NPs còn có thể kích hoạt quá trình sinh ROS thông qua cơ chế quang xúc tác dưới ánh sáng UV hoặc ánh sáng nhìn thấy, giúp tăng cường hiệu quả điều trị trong các liệu pháp kết hợp như liệu pháp quang động. [28,29]. Gốc oxy tự do (ROS) được biết đến là các gốc oxy hoá mạnh có nguồn gốc từ oxy đóng vai trò là tác nhân gây độc tế bào trong liệu pháp ung thư. ROS bao gồm các gốc tự do hoạt động mạnh như gốc hydroxyl ( $\bullet OH$ ), superoxide ( $O_2\bullet^-$ ) và phân tử không phải gốc tự do như hydrogen peroxid ( $H_2O_2$ ), và singlet oxygen ( $^1O_2$ ) [30]. Trong điều kiện sinh lý bình thường, ROS đóng vai trò như một phân tử tín hiệu sinh học, tham gia điều hòa quá trình truyền tín hiệu và cân bằng nội môi tế bào. Tuy

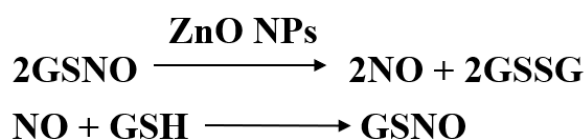
nhiên, khi ROS tích tụ quá mức làm phá vỡ sự cân bằng giữa các chất oxy hóa và hệ thống chống oxy hóa nội bào sẽ dẫn đến hiện tượng stress oxy hóa gây chết tế bào. Các phân tử ROS hoạt động mạnh có thể tấn công trực tiếp vào màng tế bào, ty thể, protein, và DNA của tế bào ung thư, gây ra rối loạn chức năng, đứt gãy chuỗi ADN, biến tính enzyme và dẫn đến chết tế bào apoptosis hoặc chết hoại tử [31,32].

#### 1.2.2.2. Tiêu diệt tế bào ung thư dựa trên RNS

Bên cạnh ROS, ZnO NPs còn được báo cáo về khả năng tạo ra các gốc nitơ tự do (RNS) như NO và ion peroxy nitrite  $\text{ONOO}^-$  nhờ hoạt tính xúc tác sinh học tương tự enzyme. Nghiên cứu của Yang và cộng sự (2020) [33] cho thấy ZnO NPs có thể mô phỏng chức năng của các enzyme như glutathione peroxidase và glycosidase trong cơ thể, từ đó xúc tác quá trình phân hủy các chất cho NO, bao gồm cả các hợp chất nội sinh như S-nitrosoglutathione (GSNO) và ngoại sinh như  $\beta$ -gal-NONOate. Quá trình này giải phóng NO - một gốc nitơ tự do có khả năng phản ứng mạnh với các loại ROS như superoxide ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) và  $\text{H}_2\text{O}_2$  để tạo thành  $\text{ONOO}^-$  một chất oxy hóa cực mạnh có thể phá hủy cấu trúc phân tử quan trọng trong tế bào ung thư [34,35]. Tác động sinh học của NO phụ thuộc mạnh vào nồng độ. Ở nồng độ thấp (100-500 nM), NO thúc đẩy sự tăng sinh và phát triển của tế bào; trong khi ở nồng độ cao ( $> 1 \mu\text{M}$ ), NO gây cảm ứng apoptosis tế bào thông qua các cơ chế như hoạt hóa p53, giải phóng cytochrome c và hình thành peroxy nitrite trong điều kiện stress oxy hoá [36]. Tuy nhiên, liệu pháp điều trị bằng NO vẫn đối mặt với các thách thức lớn như thời gian bán hủy ngắn ( $< 5$  giây) và khả năng khuếch tán hạn chế (20-160  $\mu\text{m}$ ) trong khối u. Điều này đã thúc đẩy sự phát triển của các chất cho NO và các hệ dẫn truyền dựa trên công nghệ nano nhằm đạt được sự giải phóng NO có kiểm soát và tại vị trí chính xác.

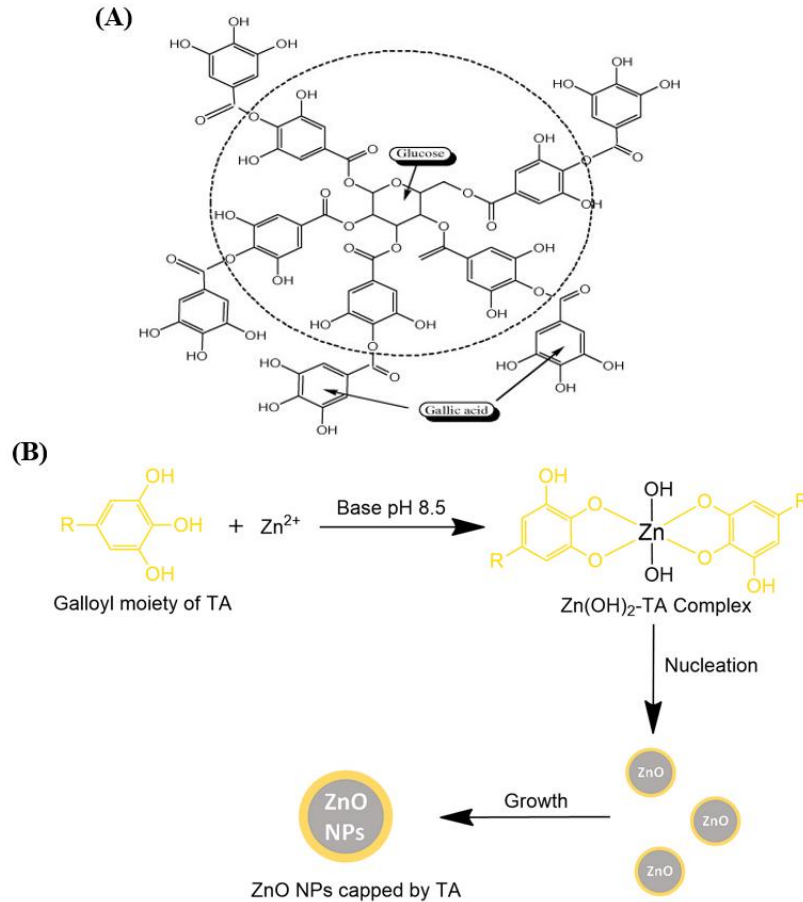
S-nitrosoglutathione được biết đến là một chất cho NO nội sinh được hình thành trong quá trình chuyển hóa NO trong cơ thể và nồng độ trong huyết tương người dao động khoảng 0,015-10  $\mu\text{M}$ . GSNO có thể giải phóng NO khi chịu các tác động như nhiệt, ánh sáng, thiol, chất oxy hóa khử hoặc enzyme. Khi có mặt GSH và ZnO NPs, GSNO cho thấy sự gia tăng trong tốc độ phân huỷ và giải phóng NO [33,37]. Ngoài ra, hàm lượng lớn NO sản sinh có thể phản ứng với glutathione để tái tạo GSNO [38,39]. Glutathione (GSH) là phân tử chống oxy hoá được tìm thấy chủ yếu trong bào tương với nồng độ dao động từ 1-10

mM, cao hơn khoảng 1000 lần so với nồng độ GSH ngoại bào (2-10  $\mu$ M). Phần lớn các tế bào có nồng độ GSH khoảng 1-2 mM. Tuy nhiên, trong tế bào gan (nơi sản xuất GSH) và tế bào ung thư, GSH có thể đạt nồng độ lên đến 10 mM hoặc thậm chí cao gấp 10 lần đối với các khối u kháng thuốc [40–43]. Mức độ GSH tăng cao trong tế bào ung thư góp phần vào khả năng kháng hoá trị bằng cách hoạt động như một chất chống oxy hóa mạnh, đồng thời cho phép loại bỏ độc tố từ thuốc thông qua hoạt động của các enzyme như glutathione S-transferase [44,45]. Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự suy giảm GSH nội bào khiến tế bào ung thư trở nên dễ bị tổn thương trước stress oxy hoá và nhạy cảm với các tác nhân điều trị [46–48]. Vì thế, chiến lược dựa trên phản ứng giữa NO và GSH hứa hẹn trở thành một hướng tiếp cận đầy tiềm năng, giúp tiêu thụ GSH, làm suy yếu hệ thống phòng vệ chống oxy hoá của tế bào ung thư và tăng hiệu quả gây độc của hệ thống RONS.



### 1.3. Tổng quan về axit tannic

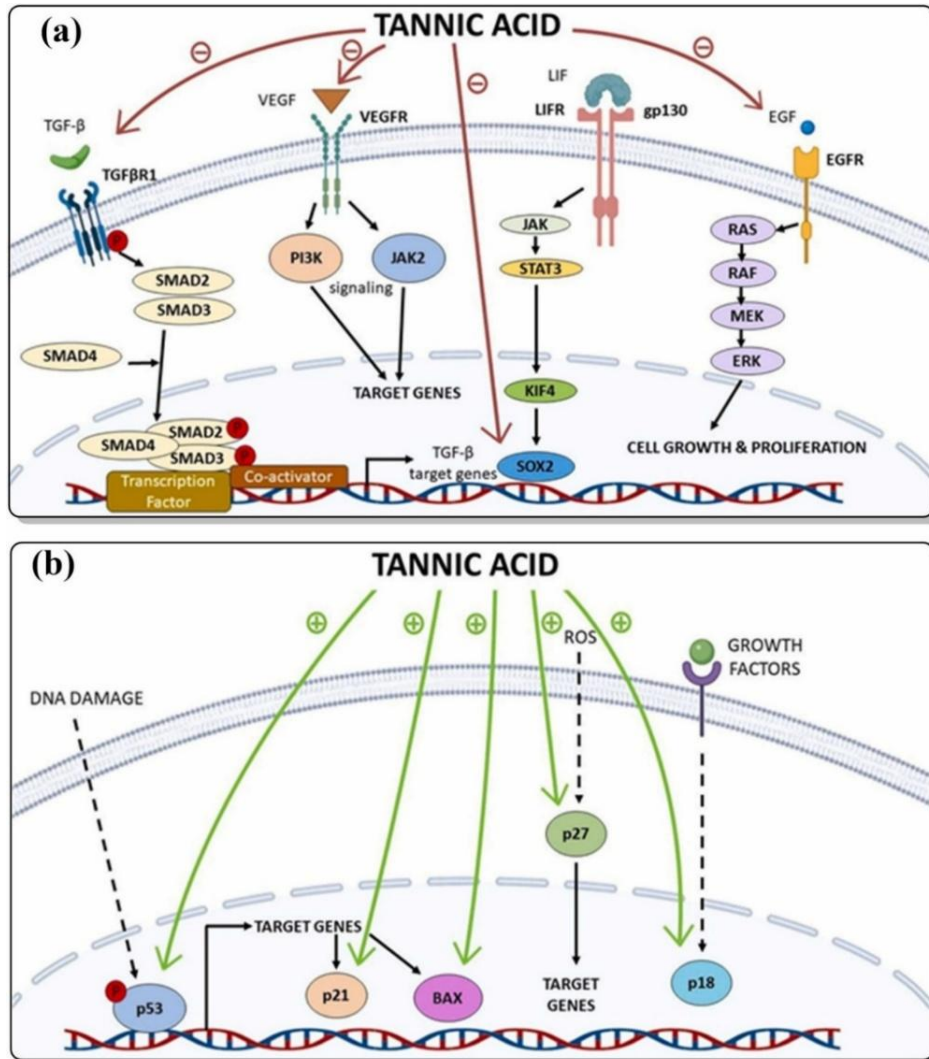
Cấu trúc catechol được biết đến là một loại phân tử bám dính ứng dụng trong phủ bề mặt vật liệu đang nhận được nhiều sự quan tâm trên toàn thế giới [49,50]. Cấu trúc catechol trong tự nhiên phần lớn các hợp chất phenolic có nguồn gốc từ thực vật. Ví dụ một dẫn xuất của pyrogallol có nguồn gốc từ thực vật là axit tannic (TA) cũng được sử dụng để phủ lên bề mặt của vật liệu. Cấu trúc phân tử của TA tương tự như một dendrimer với hai thế hệ (G0, G1) (**Hình 1.5A**). Năm phân tử axit gallic (G0) liên kết với một phân tử glucose nằm ở trung tâm, và các phân tử axit gallic khác (G1) được gắn nối tiếp vào từng phân tử axit gallic (G0) thông qua liên kết ester. Do sự hình thành liên kết ester này, các nhóm gallol bên trong thể hiện tính năng tương tự catechol, trong khi năm nhóm bên ngoài giữ nguyên đặc tính gallol [51]. Thông qua quá trình oxy hoá trong môi trường kiềm, các gallol bên trong có thể chuyển hoá thành quinone và bám lên bề mặt vật liệu giống polydopamine [52]. Ngoài ra, TA chứa nhóm gallol có khả năng tạo phức với ion  $\text{Zn}^{2+}$  trong môi trường kiềm và tham gia phản ứng oxy hoá khử điều chế hạt nano ZnO. Trong phản ứng này, TA vừa đóng vai trò là chất khử, vừa là tác nhân ổn định các hạt nano kim loại nhằm tránh hiện tượng kết tụ [53–55] (**Hình 1.5B**).



**Hình 1.5.** Cấu trúc axit tannic (A) và cơ chế khử ion  $Zn^{2+}$  của axit tannic tạo thành hạt nano ZnO (B)

Trong điều trị ung thư, TA được phát hiện có hoạt tính gây độc tế bào chống lại một số khối u ác tính như ung thư gan, phổi, vú, buồng trứng và đại trực tràng [56]. TA thể hiện khả năng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư thông qua việc ức chế các con đường tín hiệu liên quan đến tăng sinh tế bào (**Hình 1.6A**) và tăng biểu hiện các gen liên quan đến ngừng chu kỳ tế bào và giết chết tế bào ung thư (**Hình 1.6B**). Cụ thể, TA điều hòa hoạt động của nhiều con đường tín hiệu quan trọng như VEGF/VEGFR, RAS/RAF/mTOR, JAK/STAT, TGF- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ 1R và CXCL12/CXCR4. Sự điều hòa này góp phần ngăn chặn quá trình tăng sinh tế bào bằng cách ức chế pha G1 của chu kỳ tế bào, ức chế tín hiệu hình thành mạch máu trong khối u, và tăng cường phosphoryl hóa p53, từ đó hoạt hóa quá trình apoptosis và tiêu diệt tế bào ung thư. Hoạt tính chống ung thư của TA, khi được kết hợp với các tác nhân trị liệu khác như hạt nano oxit kim loại, đã được chứng minh mang lại hiệu ứng hiệp đồng đáng kể, đặc biệt trong các trường hợp khối u kháng thuốc [57,58]. Bên cạnh đó, nhờ khả năng bám dính tốt lên bề mặt vật liệu, TA được đánh giá là một ứng viên

tiềm năng trong việc tạo lớp phủ chức năng trên bề mặt hạt nano, góp phần nâng cao hiệu quả trong các chiến lược điều trị ung thư kết hợp.

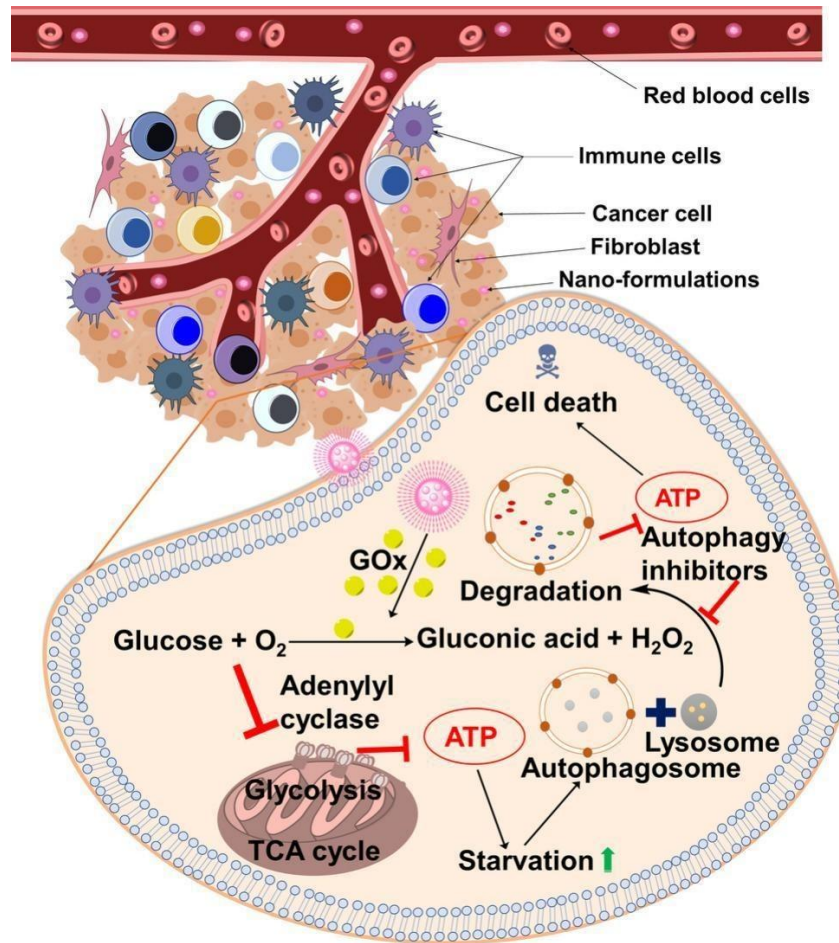


Hình 1.6. Cơ chế kháng ung thư của axit tannic [59]

#### 1.4. Tổng quan về glucose oxidase

Khác với tế bào bình thường, tế bào ung thư có nhu cầu sử dụng glucose và oxy cao hơn đáng kể nhằm đáp ứng năng lượng cho quá trình tăng sinh và di căn. Quá trình chuyển hoá glucose của khối u tuân theo “hiệu ứng Warburg” bằng cách sử dụng con đường đường phân kỵ khí ngay cả khi có mặt oxy để tạo ra năng lượng. Năng lượng tạo ra theo con đường này có tốc độ nhanh hơn so với đường phân thông thường. Do đó, liệu pháp bỏ đói tế bào ung thư đã nổi lên như một chiến lược hiệu quả bằng cách cắt nguồn cung glucose thiết yếu cho sự sống và phát triển của tế bào. Thay vì trực tiếp tiêu diệt tế bào ung thư, phương pháp này nhắm vào các con đường chuyển hóa quan trọng như đường, acid amin, lipid - những yếu tố mà tế bào ung thư đặc biệt phụ thuộc [60]

Glucose oxidase (GOx) là một enzyme oxy hóa-khử tự nhiên có nguồn gốc từ *Aspergillus niger* được sử dụng phổ biến như một tác nhân điều trị trong liệu pháp bổ đỏi. Bằng cách gắn GOx lên bề mặt hạt nano và vận chuyển đến tế bào ung thư, nó sẽ tiêu thụ glucose nội bào một cách nhanh chóng thông qua phản ứng oxy hoá glucose trong điều kiện oxy tạo ra D-gluconic acid và  $H_2O_2$  [61,62]. Phản ứng này gây thiếu hụt năng lượng cho tế bào ung thư đồng thời tăng nồng độ  $H_2O_2$  nội sinh và gây chết tế bào qua cơ chế stress oxy hóa (**Hình 1.7**). GOX hoạt động trong khoảng pH khá rộng từ 4-7, với giá trị pH tối ưu là 5.5 [63,64]. Do đó, môi trường pH axit đặc trưng của khối u tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt tính xúc tác của GOX. Tuy nhiên, phản ứng chuyển hoá glucose bởi GOx sẽ làm tiêu hao oxy và tăng tình trạng thiếu oxy trong tế bào, đặc biệt là ở các khối u rắn vốn đã thiếu oxy từ trước [65]. Các tế bào trong điều kiện thiếu oxy và dưỡng chất sẽ kích hoạt cơ chế tự thực bào nhằm bảo vệ tế bào khỏi tình trạng thiếu năng lượng. Qua thời gian, các tế bào này trở nên thích nghi với sự thay đổi của môi trường và kháng lại các liệu pháp điều trị. Giải pháp tối ưu trong trường hợp này là kết hợp liệu pháp bổ đỏi với liệu pháp khác như hệ thống phân phối nano giúp nâng cao tính hướng đích cũng như kích hoạt enzyme tại vị trí đặc hiệu [66]. Nhiều nghiên cứu trước đây đã thực hiện biến tính GOx lên các hệ nano như nano oxit sắt từ, silica xốp hay nano polymer để phối hợp 2 liệu pháp điều trị bổ đỏi và RONS [67–69]. Tuy nhiên, việc tích hợp GOx với ZnO NPs có khả năng tạo RONS nội sinh trong cùng một hệ thống vẫn chưa được khai thác triệt để.



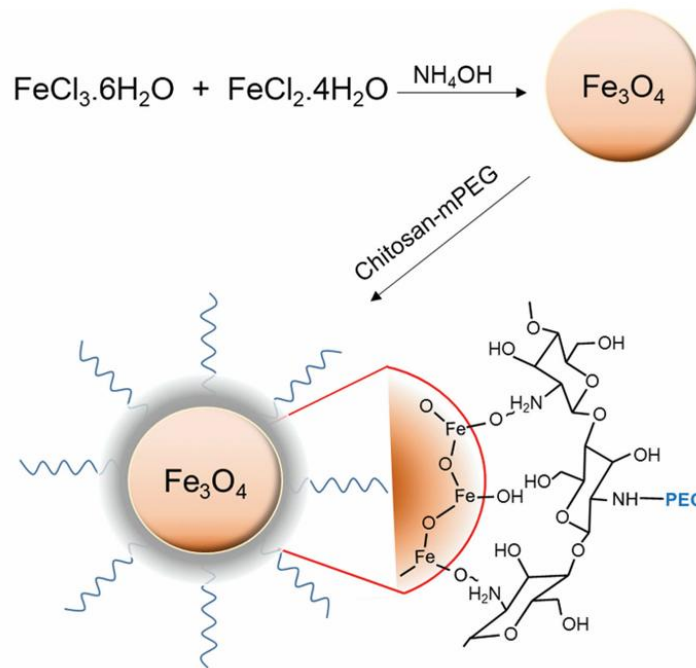
**Hình 1.7.** Liệu pháp bổ đói tế bào trong điều trị ung thư dựa trên GOx [66]

## 1.5. Tình hình nghiên cứu

### 1.5.1. Tình hình nghiên cứu trong nước

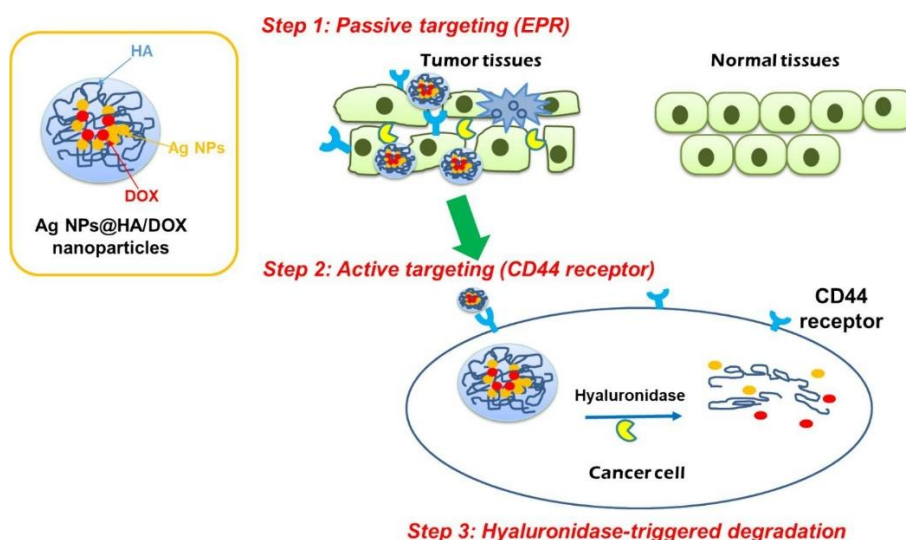
Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu đã được phát triển cho các hệ phân phối thuốc điều trị ung thư, bao gồm hạt kích thước nano, dendrimer, micelle, liposome,... như nghiên cứu từ các nhóm của PGS.TS. Hà Phương Thư, PGS. TS. Trần Ngọc Quyển, PGS. TS. Nguyễn Đại Hải và GS. TS. Nguyễn Cửu Khoa. Nhóm nghiên cứu PGS.TS. Nguyễn Đại Hải và PGS. TS. Trần Ngọc Quyển thuộc Viện Công nghệ tiên tiến đã phát triển hệ hạt nano từ tính  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được biến tính bề mặt bằng chitosan gắn với mPEG ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTS\text{-mPEG}$ ) để mang thuốc paclitaxel (PTX) (**Hình 1.8**). Kết quả cho thấy thuốc PTX không tan trong nước đã được nang hoá thành công vào hệ nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTS\text{-mPEG}$  và giải phóng trong vòng 96 giờ. Tương tự như nghiên cứu của PGS.TS. Hà Phương Thư, hệ  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTS\text{-mPEG}$  cũng thể hiện tiềm năng ứng dụng trong liệu pháp nhiệt trị ung thư ở nhiệt độ 42-45 °C. Những kết quả này chứng minh hệ nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@CTS\text{-mPEG}$  là một hệ dẫn truyền từ tính ổn định, có khả năng điều trị kép thông qua nhiệt trị và hoá trị, hứa hẹn ứng dụng trong điều trị ung

thư [70]. Nhóm tác giả này sau đó cũng phát triển thêm các hệ dẫn thuốc khác dựa trên vật liệu silica xốp hoặc dendrimer biến tính bề mặt với PEG, không những giúp cải thiện khả năng hòa tan thuốc mà còn tăng khả năng tương thích sinh học của hệ thống dẫn truyền thuốc so với thuốc ung thư tự do [71–74].



**Hình 1.8.** Hệ nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CTS-mPEG ứng dụng mang thuốc paclitaxel [70]

Gần đây, nhóm nghiên cứu của Lê Thị Phương và cộng sự (2025) [75] đã sử dụng phương pháp khử ion Ag<sup>+</sup> thành hạt nano bạc bởi dopamine liên hợp polymer axit hyaluronic, đồng thời mang Doxorubicin để tăng hiệu quả điều trị ung thư hiệp đồng (**Hình 1.9**). Hệ nano này có khả năng hướng đích chủ động nhờ tương tác đặc hiệu giữa vỏ HA và thụ thể CD44 biểu hiện quá mức trên bề mặt tế bào, đồng thời giải phóng thuốc tại chỗ trong môi trường pH thấp của khối u. AgNPs@HA/DOX đã cho thấy hiệu quả chống khối u vượt trội trong các thí nghiệm *in vitro*, *in vivo* và độ tương thích sinh học cao đối với tế bào bình thường.



**Hình 1.9.** Hệ nano bạc biến tính bề mặt với HA mang thuốc doxorubicin [75]

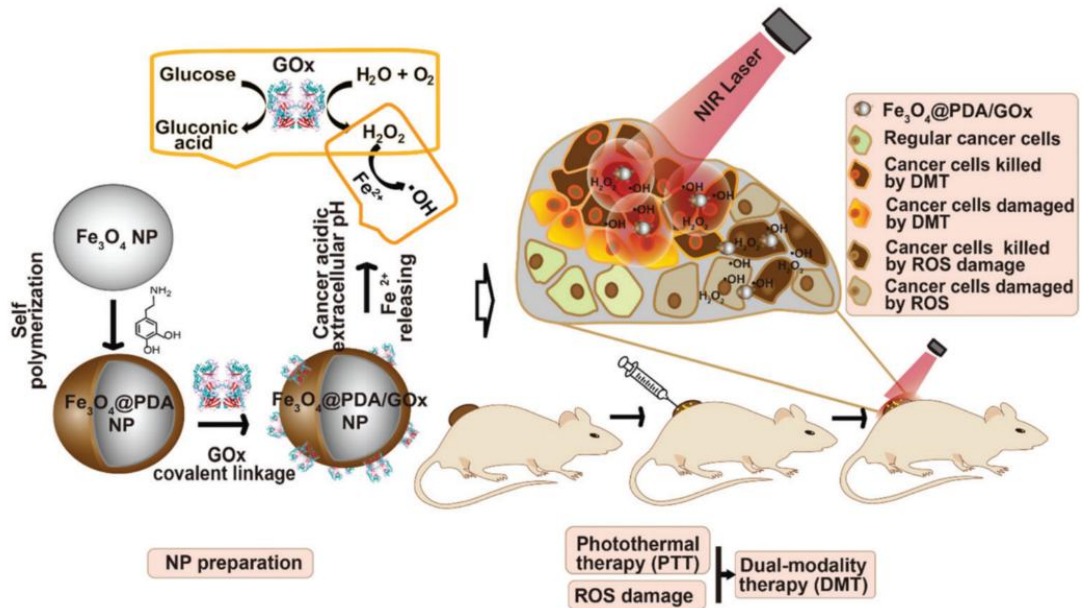
Tóm lại, phần lớn các nghiên cứu trong nước hiện nay về nano kim loại chủ yếu là các hệ nano mang thuốc hoá trị được biến tính bề mặt với các phân tử khác nhau để tăng khả năng điều trị và hướng đích tế bào ung thư. Đến thời điểm hiện tại, tại Việt Nam, chưa ghi nhận được nghiên cứu cũng như bài báo liên quan đến khả năng tiêu diệt tế bào ung thư kết hợp dựa trên phương pháp gốc tự do sản sinh bởi nano oxit kẽm và liệu pháp bổ đổi bởi GOx. Tuy nhiên, tính đến hiện tại chưa ghi nhận bất kỳ nghiên cứu cũng như bài báo liên quan đến việc phát triển các hệ nano oxit kim loại như ZnO NPs tạo ra các gốc tự do RONS kết hợp với liệu pháp bổ đổi dựa trên GOx. Do đó, đây là sẽ hướng nghiên cứu mới ở Việt Nam.

### 1.5.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã tập trung vào việc kết hợp các tác dụng hiệp đồng của liệu pháp bổ đổi và RONS để phát triển các hệ vật liệu nano tiên tiến cho hiệu quả cao trong điều trị ung thư.

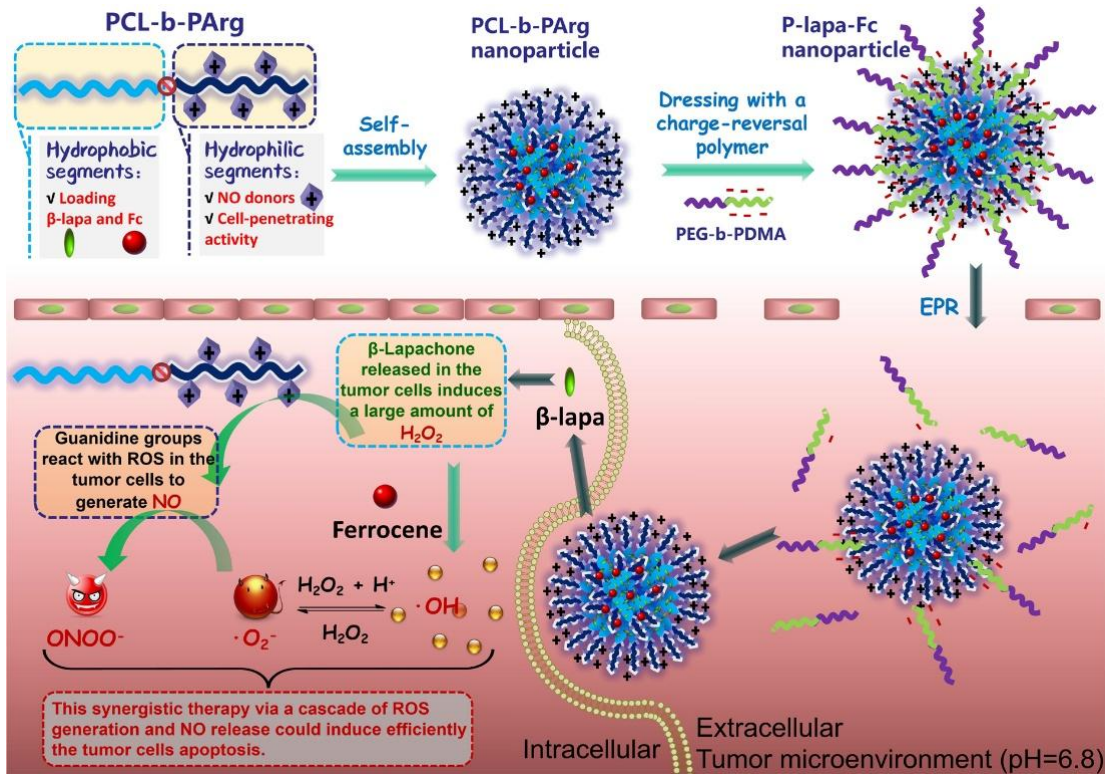
Năm 2019, Zhang và các cộng sự tại Đại học Shandong (Trung Quốc) cũng sử dụng kết hợp 3 liệu pháp bổ đổi, nhiệt và khí để tăng cường hiệu quả điều trị ung thư [76]. Trong hệ thống này, polydopamine (PDA) được gắn lên các hạt nano oxit sắt từ, đóng vai trò là vật liệu truyền quang nhiệt chuyển đổi bức xạ hồng ngoại gần (NIR) thành nhiệt (**Hình 1.10**). Sau đó, GOx được liên kết cộng hóa trị với bề mặt hạt nano có thể tiêu thụ một cách cạnh tranh glucose tạo ra  $H_2O_2$  và có thể được chuyển đổi bởi các nano oxit sắt thành gốc tự do  $\bullet OH$  độc hại hơn, gây ra quá trình chết rụng của tế bào ung thư. Bằng cách này,

họ đã tạo ra một hệ thống điều trị kép quang nhiệt và ROS để tăng hiệu quả điều trị chính xác đối với bệnh ung thư:



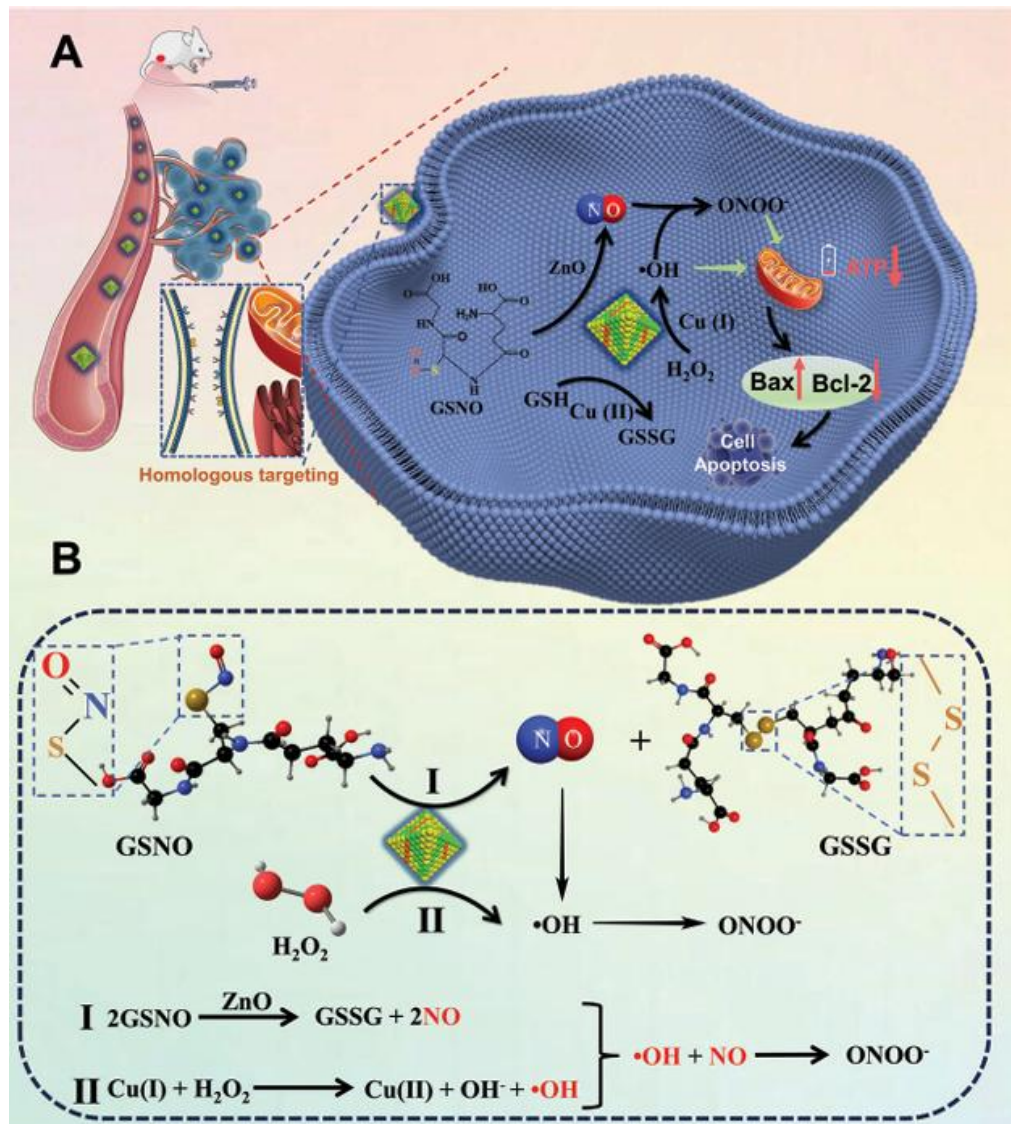
**Hình 1.10.** Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của hệ nano oxit sắt từ biến tính với GOx và polydopamine [76]

Năm 2020, Cao và các cộng sự [35] đã thiết kế hệ nano PCL-b-PArg mang chất cho  $\bullet\text{NO}$  có khả năng tự lắp ráp (**Hình 1.11**). Vật liệu này được bao bọc lớp polymer PEG-b-PDMA ưa nước mang điện tích âm và nhạy pH. Trong hệ thống này, L-Arg, một chất sinh  $\bullet\text{NO}$  phân tử nhỏ, đã được polymer hóa để tạo thành poly(L-arginine) (PArg) để cải thiện độ ổn định của quá trình bảo quản và kiểm soát sự giải phóng  $\bullet\text{NO}$ .  $\beta$ -lapa, một loại thuốc có tính chọn lọc cao đối với các tế bào khối u có thể được xúc tác bởi nicotinamide adenine dinucleotide (NAD(P)H), được nạp vào các hạt nano để tạo ra một lượng lớn  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sau đó,  $\text{H}_2\text{O}_2$  được tạo ra tiếp tục được xúc tác bởi ferrocene (Fc) để tạo thành  $\bullet\text{OH}$  thông qua phản ứng Fenton. Tóm lại, chiến lược này dựa trên chu trình Haber-Weiss, dự kiến sẽ tạo ra  $\text{H}_2\text{O}_2$  cục bộ từ  $\beta$ -lapa cho quá trình oxy hóa xúc tác Fc tiếp theo của các nhóm guanidine để tạo ra  $\text{ONOO}^-$ , chất có hoạt tính chống khối u mạnh hơn so với ROS thông thường. Phương pháp này cho kết quả điều trị hiệp đồng với khí  $\text{ONOO}^-$  và  $\bullet\text{NO}$ .



**Hình 1.11.** Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của hệ nano PCL-b-PArg mang chất cho •NO [35]

Nghiên cứu khác gần đây của Zichuang Xu và cộng sự (2024) [77] đã chứng minh hiệu quả xúc tác của hạt nano ZnO trong cấu trúc khung cơ kim Cu-MOF trong phản ứng phân hủy GSNO trong tế bào ung thư tạo ra •NO (**Hình 1.12**). Trong nghiên cứu này, xúc tác nano cấu trúc lõi/vỏ đã được tạo ra bằng cách phủ nano ZnO lên vật liệu khung cơ kim Cu-MOF có hình dạng khối bát diện và nguy trang bề mặt bằng màng tế bào khối u. Sự hiện diện của ZnO đóng vai trò xúc tác quá trình tạo ra •NO bền vững và liên tục từ nguồn GSNO nội sinh trong khối u mà không cần bổ sung •NO ngoại sinh. Đồng thời các ion đồng có thể xúc tác phản ứng oxy hoá-khử giữa glutathione và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tạo ra gốc •OH và làm cạn kiệt glutathione – một phân tử gây kháng thuốc phổ biến ở tế bào ung thư. Ngoài ra, nhóm tác giả đã chứng minh việc giải phóng đồng thời •NO và ROS dẫn đến sự hình thành của peroxyxynitrit (ONOO<sup>-</sup>).



**Hình 1.12.** Cơ chế tiêu diệt tế bào ung thư của hệ hạt nano ZnO trong cấu trúc khung cơ kim Cu-MOF [77]

Những nghiên cứu trên đã củng cố tính khả thi của việc tổng hợp vật liệu nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase cùng tiềm năng ứng dụng của vật liệu trong điều trị ung thư thông qua liệu pháp kết hợp giữa gốc tự do RONS và bỏ đói tế bào.

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

*Đối tượng nghiên cứu:* Vật liệu nano ZnO biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase

*Phạm vi nghiên cứu:* Đề tài được thực hiện trong phạm vi phòng thí nghiệm. Vật liệu được tổng hợp bằng phương pháp kết tủa trong môi trường kiềm, kết hợp với quá trình phân hủy nhiệt để tạo thành ZnO. Tiếp theo, axit tannic được phủ lên hạt nano để tăng độ ổn định hệ, đồng thời làm cầu nối giúp cố định enzyme glucose oxidase trên bề mặt hạt. Đặc tính hoá-lý và hình thái của hệ nano được xác định bằng các kỹ thuật như UV-Vis, DLS, TEM, SEM, FTIR, XRD. Khảo sát khả năng gây độc tế bào thông qua các thí nghiệm *in vitro* và *in vivo*.

### 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.2.1. Hoá chất, dụng cụ và thiết bị

##### 2.2.1.1. Hoá chất

Kẽm nitrat ngậm nước ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ); axit tannic (TA); enzyme glucose oxidase (nguồn gốc từ *Aspergillus niger*, type VII,  $\geq 100.000$  đơn vị/g chất rắn); hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , nồng độ 30%); thuốc thử Griess mua từ hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Hoa Kỳ); kháng sinh Penicillin–streptomycin (P/S); môi trường Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) và dung dịch đệm phosphate Dulbecco (DPBS) mua từ hãng Gibco BRL (Grand Island, NY, Hoa Kỳ). Bộ kit đánh giá khả năng sống tế bào EZ-Cytox (thuốc thử WST-1) được mua từ hãng ITSBIO (Seoul, Hàn Quốc). Bộ kit nhuộm sống/chết để đánh giá khả năng sống và độc tính tế bào được cung cấp bởi Invitrogen (California, Hoa Kỳ). Các hóa chất và dung môi khác được sử dụng trực tiếp mà không qua tinh chế thêm.

##### 2.2.1.2. Dụng cụ và thiết bị

Các dụng cụ sử dụng trong đề tài bao gồm: micropipette, đầu tip, bình cầu, cốc thủy tinh, ống đong, thìa sắt, giấy cân, con từ, nhiệt kế.

Các thiết bị sử dụng trong đề tài bao gồm:

- Cân phân tích 5 số, máy khuấy từ gia nhiệt, máy li tâm, tủ sấy, máy đông khô được cung cấp bởi Phòng Công nghệ Hoạt chất Tự nhiên tại Viện Công nghệ Tiên tiến.

- Máy đo quang phổ UV-Vis; máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier; máy đo quang phổ vi đĩa; máy phân tích kích thước hạt bằng tán xạ ánh sáng động được cung cấp bởi phòng phân tích hóa lý tại Viện Công nghệ Tiên tiến.

- Ngoài ra, một số thiết bị khác được sử dụng trong đề tài bao gồm: kính hiển vi điện tử quét SEM, kính hiển vi điện tử truyền qua TEM, máy quang phổ nhiễu xạ tia X XRD, máy quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS, kính hiển vi huỳnh quang.

### 2.2.2. Tổng hợp ZnO-TA@GOx NPs

Hạt nano oxit kẽm được tổng hợp bằng cách sử dụng đệm Tris làm tác nhân kết tủa và axit tannic làm chất ổn định bề mặt. Cụ thể, 6 g  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  được hòa tan trong 50 mL đệm Tris 0.3 M (pH 8.5) và khuấy ở 70 °C trong 30 phút. Sau khi hệ đạt đến nhiệt độ ổn định, 50 mL dung dịch TA với các nồng độ 2, 4 và 6 mg/mL được nhỏ giọt vào dung dịch kẽm và tiếp tục phản ứng trong 6 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm nguội về nhiệt độ phòng, ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút và rửa 3 lần bằng nước cất nhằm loại bỏ hoàn toàn các tác nhân chưa phản ứng. Cuối cùng, các hạt nano được sấy trong tủ sấy chân không ở 90 °C qua đêm để thu được ZnO-TA NPs dạng bột màu vàng nâu.

Để liên kết GOx lên bề mặt ZnO-TA, 40 mg ZnO-TA được phân tán trong 20 mL đệm Tris (pH 8.5). Sau đó, GOx được bổ sung vào hệ để đạt nồng độ cuối lần lượt là 0,5; 1; và 2 mg/mL. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, sau đó được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ đệm Tris. Các hạt nano ZnO-TA@GOx thu được tiếp tục được rửa ba lần bằng DIW nhằm loại bỏ GOx tự do, sau đó đông khô và bảo quản ở 4 °C cho đến khi sử dụng.

### 2.2.3. Đánh giá đặc tính hoá lý của hệ nano

Phương pháp phổ UV-Vis được sử dụng để xác định mức độ liên hợp của TA trên bề mặt ZnO NPs. Hàm lượng TA được tính toán dựa trên đường chuẩn được xây dựng từ dãy nồng độ đã biết (4-20 ppm) tại bước sóng 275 nm. Sự liên hợp enzyme GOx được đánh giá bằng bộ dụng cụ Micro BCA protein kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, 100  $\mu\text{L}$  ZnO-TA@GOx NPs (1 mg/mL) được trộn với 100  $\mu\text{L}$  hỗn hợp thuốc thử trong đĩa 96 giếng. Hỗn hợp thuốc thử được chuẩn bị theo tỷ lệ thể tích A:B:C = 25:24:1. Phản ứng được ủ trong bóng tối ở 37 °C trong 2 giờ, sau đó độ hấp thụ tối đa được đo ở 562 nm bằng máy đọc vi đĩa. Ngoài ra, hàm

lượng GOx liên hợp được tính toán dựa trên đường chuẩn GOx, được xây dựng theo quy trình tương tự trong khoảng nồng độ 2-40 ppm.

Cấu trúc hóa học của các hạt ZnO-TA và ZnO-TA-GOx được xác định bằng phổ FTIR. Kích thước và hình thái của các hạt nano được đánh giá thông qua các kỹ thuật TEM, SEM, và DLS. Cấu trúc tinh thể của vật liệu được phân tích bằng phổ XRD. Cuối cùng, điện tích bề mặt của hệ nano được xác định bằng phương pháp tán xạ ánh sáng điện di (ELS) sử dụng thiết bị phân tích thế zeta.

#### **2.2.4. Đánh giá khả năng tiêu thụ glucose và sản sinh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> của hệ nano trong điều kiện *in vitro***

Hoạt tính của enzyme GOx được khảo sát dựa trên khả năng xúc tác phản ứng oxy hóa glucose tạo thành axit gluconic và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sự giải phóng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> từ các hạt nano được định lượng bằng bộ kit định lượng peroxide (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA). Quá trình định lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> được thực hiện dựa trên phản ứng Fenton trong phép thử FOX có bổ sung sorbitol để tăng độ nhạy [78–80]. Trong phản ứng Fenton, peroxide oxy hóa ion Fe<sup>2+</sup> thành Fe<sup>3+</sup> trong môi trường axit sulfuric. Sau đó, Fe<sup>3+</sup> liên kết với thuốc nhuộm xylenol orange, hình thành phức màu xanh tím có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 595 nm.

Quy trình được tiến hành như sau: Các hạt nano ZnO-TA@GOx ở các nồng độ khác nhau (250, 500 và 1000 ppm) được ủ với 1 mL dung dịch PBS, có hoặc không bổ sung glucose (4,5 mg/mL). Tại các thời điểm xác định trước, 10  $\mu$ L dịch nổi được thu nhận và trộn với 100  $\mu$ L hỗn hợp gồm thuốc thử A và B trong đĩa 96 giếng (tỷ lệ thể tích thuốc thử A:B = 1:100). Sau đó, phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút trước khi đo độ hấp thụ tại bước sóng 595 nm bằng máy đọc vi đĩa. Lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giải phóng được tính toán dựa trên đường chuẩn được thiết lập từ dãy nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đã biết (0-50  $\mu$ M). Bên cạnh đó, khả năng giải phóng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> của các ZnO-TA NPs cũng được đánh giá như một mẫu đối chứng. Dung dịch glucose (4,5 mg/mL) được bổ sung lại vào phản ứng sau mỗi 24 giờ. Ảnh hưởng của nồng độ GOx cố định trên bề mặt đến khả năng giải phóng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cũng được đánh giá theo phương pháp tương tự, trong đó nồng độ ZnO-TA@GOx được cố định ở mức 1000 ppm.

Khả năng tiêu thụ glucose của ZnO-TA@GOx NPs được đánh giá gián tiếp thông qua sự hình thành axit gluconic, phản ánh qua sự thay đổi pH của môi

trường phản ứng. Cụ thể, ZnO-TA@GOx ở nồng độ 200  $\mu\text{g/mL}$  được ủ trong dung dịch PBS chứa các nồng độ glucose khác nhau (4,5 và 10  $\text{mg/mL}$ ). Hỗn hợp phản ứng được duy trì dưới điều kiện khuấy nhẹ ở 37 °C. Tại các thời điểm xác định trước, giá trị pH của dung dịch phản ứng được đo bằng máy đo pH. Các hạt nano ZnO-TA được sử dụng làm mẫu đối chứng.

### **2.2.5. Đánh giá khả năng xúc tác tạo NO của ZnO-TA@GOx NPs trong *in vitro***

Khả năng xúc tác phân hủy GSNO hình thành NO của ZnO NPs được đánh giá bằng thuốc thử Saviile–Griess (Sigma) dựa trên những nghiên cứu trước đây [81,82]. Khi hòa tan thuốc thử Griess trong nước với nồng độ 40  $\text{mg/mL}$ , dung dịch sẽ chứa phosphoric acid, 0,288% (w/v) sulfanilamide và 0,016% (w/v) naphthylethylene diaminedihydrochloride. Trong phản ứng phân hủy GSNO, NO được chuyển hoá thành nitrite trong điều kiện có oxy. Nitrite sẽ phản ứng với sulfanilamide trong dung dịch Griess tạo muối diazoni, sau đó ghép cặp với N-(1-naphthyl)ethylenediamine tạo thành phức azo có màu tím. Hàm lượng NO giải phóng được xác định bằng cách đo độ hấp thụ phức hợp tại bước sóng 540 nm.

Quy trình được tiến hành như sau: Các hạt nano ZnO-TA@GOx được phân tán trong dung dịch PBS ở các nồng độ từ 250 đến 1000 ppm, trong điều kiện có hoặc không bổ sung chất cho NO (GSNO 10  $\mu\text{M}$  và GSH 10  $\mu\text{M}$ ). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37 °C trong điều kiện tối và khuấy nhẹ. Tại các thời điểm xác định trước, 75  $\mu\text{L}$  môi trường phản ứng được thu nhận và trộn với 75  $\mu\text{L}$  dung dịch Griess (40 g/L). Sau 15 phút ủ ở nhiệt độ phòng, độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng được đo tại bước sóng 540 nm bằng máy đọc vi đĩa. Nồng độ NO được tạo thành từ hệ ZnO-TA@GOx được tính toán dựa trên đường chuẩn  $\text{NaNO}_2$  được chuẩn bị theo quy trình tương tự với dãy nồng độ 0-40  $\mu\text{M}$ . Để đánh giá khả năng xúc tác phân hủy GSNO của GSH, thí nghiệm đối chứng không chứa hạt nano đã được tiến hành tương tự với dung dịch PBS chỉ chứa GSNO 100  $\mu\text{M}$  và dung dịch PBS chứa GSNO (100  $\mu\text{M}$ ) và GSH (10 mM) nhằm khảo sát khả năng xúc tác phân hủy GSNO của GSH. Lưu ý rằng nguồn NO nội sinh GSNO và GSH được bổ sung lại mỗi 4 giờ kể từ thời điểm bắt đầu phản ứng.

### 2.2.6. Đánh giá độc tính tế bào của hệ nano trong *in vitro*

Độc tính tế bào của các hạt nano ZnO-TA@GOx được đánh giá trên cả tế bào nguyên bào sợi da người (hDFBs) và tế bào ung thư vú (MCF-7) ở các nồng độ hạt nano khác nhau (100-500 ppm), dựa trên thử nghiệm WST-1 và phương pháp nhuộm sống/chết acridine orange/ethidium bromide (AO/EB).

Nguyên tắc thử nghiệm WST-1 dựa trên phản ứng khử muối tetrazolium WST-1 thành formazan (màu cam) bởi enzyme dehydrogenase trong ty thể của tế bào sống. Khả năng sống của tế bào được đo bằng phương pháp quang phổ tại bước sóng 450 nm [83,84]. Cụ thể, tế bào hDFBs và MCF-7 được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ  $10^4$  tế bào/giếng trong 200  $\mu$ L môi trường DMEM bổ sung 10% FBS và 1% P/S dưới điều kiện nuôi cấy tiêu chuẩn (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Sau 24 giờ ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào tiếp tục được ủ trong môi trường nuôi cấy chứa ZnO-TA hoặc ZnO-TA@GOx trong 24 giờ tiếp theo. Môi trường nuôi cấy được bổ sung glucose (4,5 mg/mL) và các chất cho NO (GSNO 10  $\mu$ M và GSH 10  $\mu$ M). Các tế bào được xử lý bằng môi trường nuôi cấy thông thường được sử dụng làm mẫu đối chứng. Khả năng sống của tế bào được xác định bằng bộ kit WST-1 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi xử lý, các tế bào được ủ với môi trường chứa 10% (v/v) thuốc thử WST-1 trong tủ ấm trong 30 phút, sau đó độ hấp thụ quang của dung dịch phản ứng được đo tại bước sóng 450 nm. Độc tính tế bào của các mẫu được biểu thị thông qua tỷ lệ phần trăm khả năng sống của tế bào, được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ Sống sót tế bào} = \frac{A_{\text{mẫu}} - A_{\text{trắng}}}{A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{trắng}}} \times 100$$

Trong đó,  $A_{\text{mẫu}}$  và  $A_{\text{đối chứng}}$  lần lượt là độ hấp thụ quang học của các tế bào được xử lý với môi trường có hoặc không có vật liệu.  $A_{\text{mẫu trắng}}$  đại diện cho độ hấp thụ quang học của môi trường DMEM nguyên chất.

Hình thái và khả năng sống sót của tế bào cũng được đánh giá bằng bộ kit sống/chết, sử dụng thuốc nhuộm tế bào calcein-AM và ethidium homodimer-1. Nhuộm sống/chết là phương pháp kết hợp các thuốc nhuộm huỳnh quang, trong đó một thuốc nhuộm đánh dấu tế bào sống (thường là màu xanh lá) và thuốc nhuộm khác đánh dấu tế bào chết (thường là màu đỏ). Calcein-AM là thuốc nhuộm polyanion có khả năng thấm qua màng, được các esterase trong tế bào sống cắt thành calcein phát huỳnh quang xanh lá trong bào tương. Trong

khi đó, EthD-1 không thể thấm qua màng, chỉ đi vào các tế bào có màng bị tổn thương và gắn với acid nucleic, tạo ra huỳnh quang đỏ trong tế bào chết. Việc xác định khả năng sống của tế bào dựa trên các đặc tính sinh hóa (hoạt tính esterase nội bào) và vật lý (tính toàn vẹn màng tế bào) [85]. Sau khi nhuộm, khả năng sống tế bào thể hiện qua màu huỳnh quang được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang. Quy trình được tiến hành bằng cách ủ các tế bào sau khi xử lý với các mẫu với 100  $\mu\text{L}$  dung dịch PBS chứa 2  $\mu\text{M}$  calcein-AM (dẫn xuất acetomethoxy của calcein) và 4  $\mu\text{M}$  ethidium homodimer-1 trong 15 phút. Sau đó, tế bào được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang (Nikon, Nhật Bản).

### 2.2.7. Đánh giá tính tương thích máu của hệ nano trong điều kiện *in vitro*

Tính tương thích máu của các hạt nano cũng được đánh giá thông qua phép thử tán huyết. Khi các hạt nano tương tác với máu, chúng có thể gây phá vỡ tế bào hồng cầu (tán huyết), dẫn đến sự giải phóng hemoglobin. Hàm lượng hemoglobin tự do có thể được xác định bằng cách đo độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 540 nm [86].

Quy trình được tiến hành như sau: Mẫu máu toàn phần của chuột được thu vào các ống có phủ heparin, sau đó ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 10 phút để thu hồng cầu. Mẫu hồng cầu sau đó được pha loãng 50 lần bằng dung dịch đệm PBS (pH 7.4). Sau đó, 200  $\mu\text{L}$  huyền phù hạt nano ở các nồng độ 100-400 ppm được trộn với 800  $\mu\text{L}$  huyền phù hồng cầu trong ống eppendorf 1,5 mL và ủ ở 37 °C trong 1 giờ. Sau đó, các mẫu phản ứng được ly tâm ở 2500 vòng/phút trong 5 phút, và độ hấp thụ quang ( $A$ ) của dịch nổi được đo tại bước sóng 540 nm. Triton X-100 (0,1%) và PBS lần lượt được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm. Tỷ lệ tán huyết được tính theo công thức sau:

$$\text{Phần trăm tán huyết (\%)} = \frac{A_{\text{mẫu}} - A_{\text{chứng âm}}}{A_{\text{chứng dương}} - A_{\text{chứng âm}}}$$

Trong đó,  $A_{\text{mẫu}}$ ,  $A_{\text{đối chứng dương}}$  và  $A_{\text{đối chứng âm}}$  lần lượt là độ hấp thụ quang học của mẫu hồng cầu được xử lý với NPs, dung dịch Triton và đệm PBS.

### 2.2.8. Đánh giá khả năng giải phóng và tích lũy ion kẽm trong tế bào

Thử nghiệm giải phóng ion  $\text{Zn}^{2+}$  được tiến hành để chứng minh khả năng hoà tan ưu tiên của ZnO trong môi trường ung thư. Đầu tiên, ZnO-TA và ZnO-TA@GOx được hoà tan trong nước cất với nồng độ 1000 ppm. Sau đó, 1 mL mỗi mẫu được cho vào túi thẩm tách (MWCO  $\sim$ 3,5 kDa) và ngâm trong 20 mL dung dịch đệm PBS pH 5.5 và pH 7.4. Phản ứng được khuấy với tốc độ 100

rpm ở 37 °C. Tại các thời điểm xác định, 1 mL dung dịch đệm được lấy ra và thay thế bằng 1 mL dung dịch đệm mới. Hàm lượng ion  $Zn^{2+}$  giải phóng trong dung dịch đệm được xác định bằng máy đo quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS (Agilent Technologies, Malaysia).

Mức độ tích lũy kẽm trong tế bào bình thường và tế bào ung thư được đánh giá bằng bộ kit định lượng kẽm (Abcam). Bộ kit này là một phép thử so màu, trong đó kẽm liên kết với một phối tử và tạo thành phức có thể phát hiện bằng đo độ hấp thụ tại bước sóng 560 nm. Cụ thể, tế bào ung thư MCF-7 và tế bào bình thường hDFB được ủ với các nồng độ khác nhau của hạt nano ZnO-TA@GOx (100-400 ppm). Sau 8 giờ nuôi cấy trong tủ ấm (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào được rửa ba lần bằng PBS. Sau đó, tế bào được thu gom và xử lý bằng dung dịch ly giải không chứa EDTA. Tiếp theo, 50  $\mu$ L mẫu được chuyển vào đĩa 96 giếng và bổ sung 200  $\mu$ L hỗn hợp phản ứng định lượng kẽm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó độ hấp thụ của dung dịch phản ứng được đo tại bước sóng 560 nm bằng máy đọc vi đĩa. Nồng độ kẽm trong mỗi mẫu được tính toán dựa trên đường chuẩn được thiết lập từ dãy dung dịch chuẩn kẽm có nồng độ trong khoảng 0-5 nmol.

### 2.2.9. Khảo sát sự tạo thành ROS nội bào

Ảnh hưởng của các hạt nano lên sự tạo thành ROS nội bào ở tế bào bình thường (hDFBs) và tế bào ung thư (MCF-7) được đánh giá bằng đầu dò 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Nguyên lý của phương pháp dựa trên việc DCFH-DA bị oxy hóa thành 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) là một chất phát huỳnh quang và đã được ứng dụng rộng rãi trong phát hiện các gốc oxy tự do. Về cơ chế, DCFH-DA được tế bào hấp thu, sau đó các enzyme esterase nội bào sẽ cắt bỏ các nhóm acetyl để tạo thành 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH). Dưới tác động của ROS, DCFH bị oxy hóa thành DCF, phát huỳnh quang màu xanh lục với bước sóng kích thích khoảng 485 nm và phát xạ khoảng 530 nm [87,88].

Quy trình được tiến hành như sau: Tế bào hDFBs và MCF-7 ( $3 \times 10^4$  tế bào/mL) được gieo vào đĩa 24 giếng và nuôi cấy trong tủ ấm (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) trong 24 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào được xử lý với các mẫu khác nhau, bao gồm ZnO-TA, ZnO-TA@GOx và ZnO-TA@GOx có bổ sung glucose (4,5 mg/mL), ở cùng nồng độ tương đương 400

ppm trong 6 giờ. Các tế bào không xử lý với mẫu được sử dụng làm nhóm đối chứng. Sau thời gian ủ, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào được rửa ba lần bằng PBS để loại bỏ lượng mẫu dư thừa. Tiếp theo, tế bào được ủ với đầu dò DCFH-DA (10  $\mu$ M) ở 37 °C trong 30 phút trong tối. Sau đó, các tế bào được rửa nhẹ bằng PBS nhằm loại bỏ phần đầu dò dư. Cường độ huỳnh quang, tương ứng với mức độ ROS nội bào, được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang.

### **2.2.10. Đánh giá khả năng ức chế khối u của hệ nano trên mô hình chuột *in vivo***

Tất cả các thí nghiệm trên động vật được thực hiện theo quy trình đã được phê duyệt bởi Hội đồng Đạo đức trong Chăm sóc và Sử dụng Động vật của Trường Đại học Trà Vinh (118/GCN.ĐC-HĐĐĐ). Đầu tiên, chuột đực C57BL/6 (6-8 tuần tuổi) được gây suy giảm miễn dịch bằng cách tiêm phúc mạc cyclophosphamide với liều 50 mg/kg thể trọng. Sau đó, mô hình ung thư được thiết lập bằng cách cấy tế bào ung thư MCF-7 ( $10^6$  tế bào/mL) thông qua đường tiêm dưới da. Khi thể tích khối u đạt khoảng 200 mm<sup>3</sup>, các chuột mang khối u MCF-7 được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm (n = 6 mỗi nhóm): (1) nhóm đối chứng không điều trị, (2) nhóm điều trị bằng hạt nano ZnO-TA và (3) nhóm điều trị bằng hạt nano ZnO-TA@GOx. Tiếp theo, chuột được tiêm trực tiếp vào khối u ZnO-TA hoặc ZnO-TA@GOx với liều 5 mg/kg, hai lần mỗi tuần trong vòng 3 tuần. Tại các thời điểm xác định trước, khối lượng cơ thể của chuột được theo dõi và kích thước khối u được đo bằng thước kẹp. Thể tích khối u (mm<sup>3</sup>) được tính theo công thức sau:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Chiều dài} \times (\text{Chiều rộng})^2}{2} \times 100$$

Kết thúc ngày thứ 16, tất cả chuột được hi sinh và mổ lấy khối u để phân tích mô bệnh học. Các chỉ số huyết học tương ứng với từng nhóm điều trị cũng được ghi nhận vào ngày thứ 16. Đồng thời, hình ảnh nhuộm H&E vùng khối u ở mỗi nhóm cũng được chụp lại vào ngày thứ 16.

### **2.2.11. Phân tích thống kê**

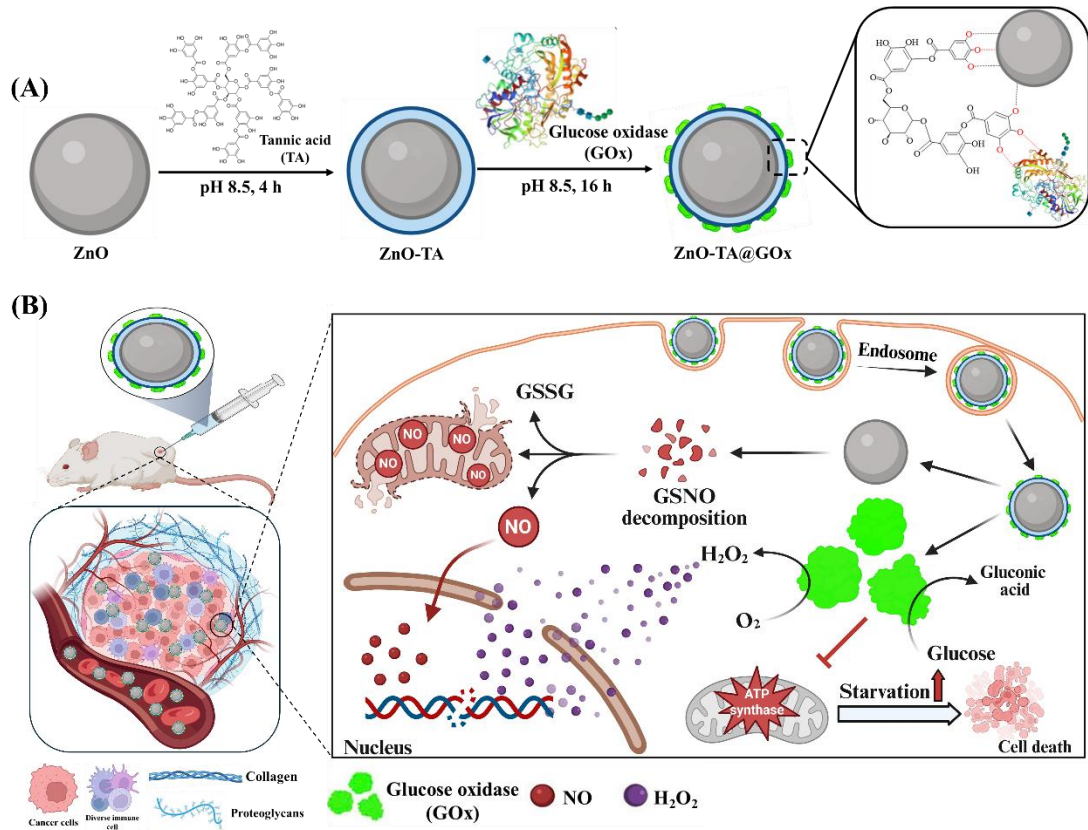
Mỗi thí nghiệm trong nghiên cứu này được thực hiện lặp lại ba lần. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD), và các biểu đồ được xây dựng bằng phần mềm Origin 2018 (OriginLab Corporation, Hoa Kỳ). Phân tích thống kê được thực hiện bằng phép kiểm định t của Student

(không ghép cặp, hai phía) hoặc phân tích phương sai ANOVA một hoặc hai yếu tố, sau đó sử dụng phép kiểm định hậu nghiệm Tukey. Giá trị  $p < 0,05$  được xem là có ý nghĩa thống kê và được biểu diễn dưới dạng kí hiệu \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ) và \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả tổng hợp và đánh giá đặc tính hoá lý của hệ nano

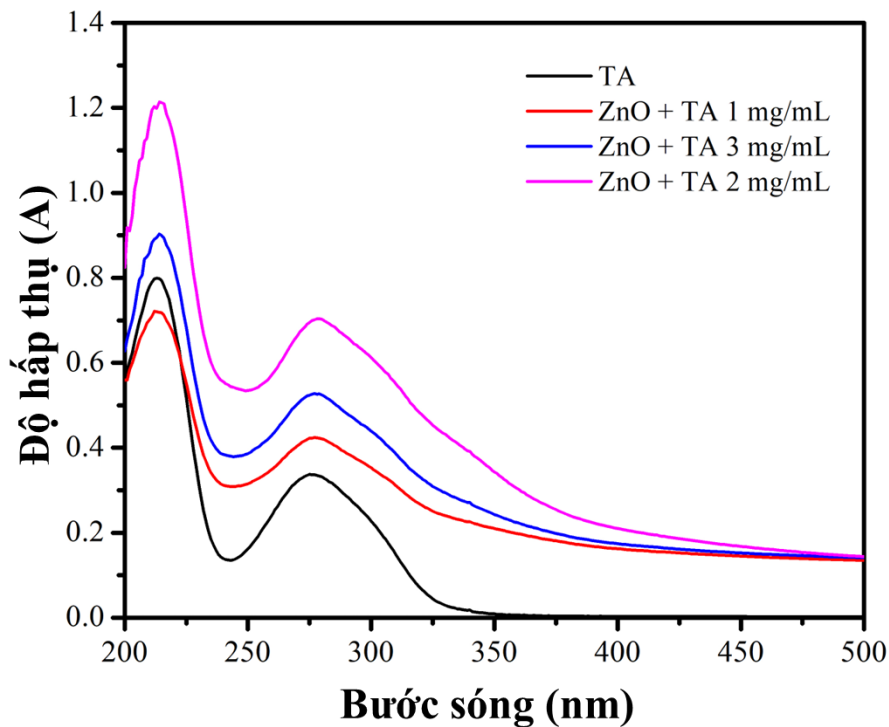
Quy trình tổng hợp và biến tính hạt nano ZnO bằng TA và GOx được minh họa trong **Hình 3.1**. Trong phương pháp này, TA được sử dụng như một lớp phủ sơ cấp, cho phép ổn định hạt nano và cố định GOx lên bề mặt ZnO thông qua nhiều cơ chế liên kết khác nhau.



**Hình 3.1.** Sơ đồ minh họa quá trình tổng hợp hạt nano ZnO-TA@GOx nhằm tạo ra hiệu quả hiệp đồng trong điều trị ung thư. (A) Quy trình tổng hợp hạt nano ZnO-TA@GOx. Trước tiên, vật liệu được tổng hợp bằng phương pháp kết tủa trong môi trường kiềm, kết hợp với quá trình phân hủy nhiệt để tạo thành ZnO. Sau đó, axit tannic được phủ lên hạt nano để tăng độ ổn định hệ, đồng thời làm cầu nối giúp cố định enzyme glucose oxidase trên bề mặt hạt. (B) Sau khi tích lũy tại mô khối u thông qua hiệu ứng tăng tính thấm và lưu giữ, các hạt nano ZnO-TA@GOx kích hoạt quá trình giải phóng  $H_2O_2$  và NO thông qua phản ứng phân hủy glucose được xúc tác bởi GOx và quá trình phân hủy chất cho nội sinh S-nitrosoglutathione do ZnO xúc tác. Hai cơ chế này phối hợp tạo nên hiệu quả chống ung thư hiệp đồng.

### 3.1.1. Kết quả đo UV-Vis của ZnO-TA NPs

Phổ hấp thụ UV-Vis của các mẫu ZnO-TA được tổng hợp với các nồng độ axit tannic khác nhau được trình bày trong **Hình 3.2**. Tất cả các mẫu được phân tán trong nước cất ở nồng độ 1 mg/mL và quét UV-Vis trong khoảng bước sóng 200-500 nm. Kết quả cho thấy các mẫu đều xuất hiện hai đỉnh hấp thụ đặc trưng tại 213 nm và 275 nm, tương ứng với các chuyển dời điện tử  $\pi-\pi^*$  và  $n-\pi^*$  của các nhóm galloyl trong cấu trúc của TA [89–91]. Bên cạnh đó, sự xuất hiện của vai phổ tại khoảng 340 nm là bằng chứng cho sự hình thành của hạt nano ZnO [20,92,93]. Trong các điều kiện khảo sát, mẫu ZnO-TA được tổng hợp với nồng độ TA trong dung dịch phản ứng là 2 mg/mL thể hiện cường độ hấp thụ cao nhất, từ đó gợi ý mức độ liên hợp của TA trên bề mặt ZnO đạt giá trị lớn nhất.

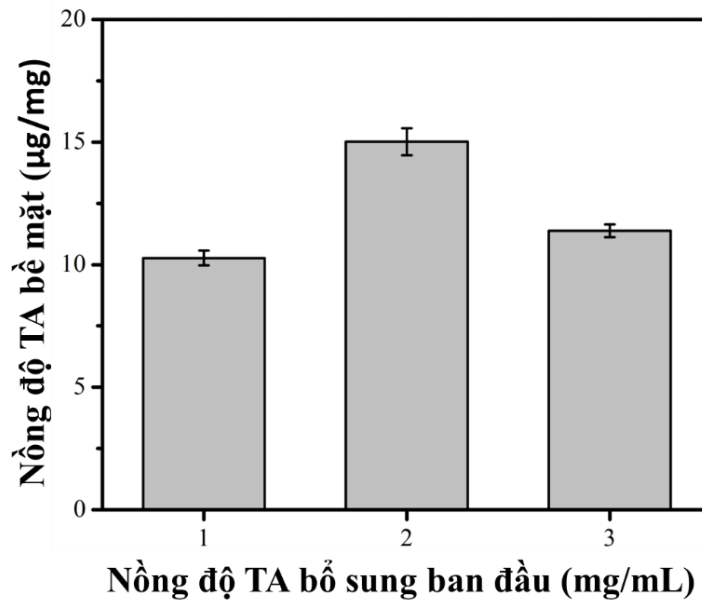


**Hình 3.2.** Phổ UV-Vis của ZnO-TA NPs

### 3.1.2. Kết quả định lượng TA và GOx trên bề mặt vật liệu

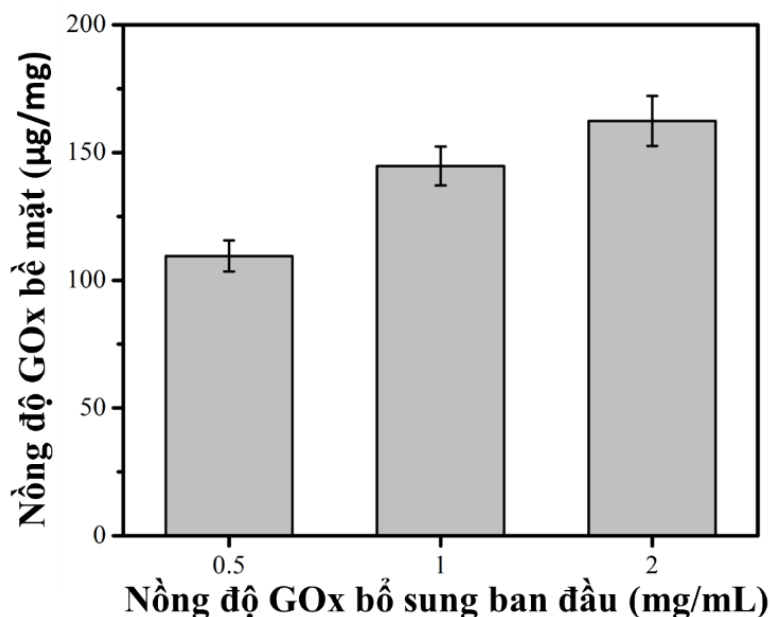
Phân tích định lượng cho thấy khi tăng nồng độ TA trong dung dịch phản ứng từ 1 lên 2 mg/mL, mức độ liên hợp trên bề mặt ZnO tăng tương ứng từ 10.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ZnO-TA lên 15  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (**Hình 3.3**). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ tổng hợp TA lên 3 mg/mL, mức độ liên hợp lại giảm đáng kể xuống còn 11.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Hiện tượng này có thể được giải thích bởi hiệu ứng bão hòa bề mặt hoặc cản trở không gian trong quá trình gắn kết. Ở nồng độ cao, TA có xu hướng xảy ra hiện tượng oligomer hóa trong dung dịch, hình thành các cấu

trúc có kích thước lớn và công kênh, làm giảm khả năng tương tác hiệu quả với bề mặt hạt nano ZnO, dẫn đến hàm lượng TA liên hợp giảm. Dựa trên các kết quả thu được, nồng độ TA 2 mg/mL được xác định là điều kiện tối ưu cho các nghiên cứu tiếp theo.



**Hình 3.3.** Ảnh hưởng của nồng độ TA đến mức độ liên hợp của TA lên bề mặt ZnO NPs

Lượng GOx cố định trên bề mặt ZnO-TA@GOx được xác định bằng phương pháp BCA. Như thể hiện trong **Hình 3.4**, hàm lượng GOx cố định tăng theo nồng độ GOx ban đầu, cho thấy xu hướng phụ thuộc vào nồng độ. Đáng chú ý, tại nồng độ GOx tổng hợp ban đầu 2 mg/mL (tương ứng với tỷ lệ khối lượng ZnO-TA/GOx = 1:1), lượng enzyme cố định đạt giá trị cao nhất, đạt 162.31 µg GOx trên mỗi mg hạt nano. Kết quả này nhấn mạnh vai trò quan trọng của lớp phủ TA trong việc thúc đẩy các tương tác cộng hóa trị với các nhóm amine của GOx. Đồng thời, kết quả cũng cho thấy hiệu suất cố định enzyme có thể được điều chỉnh thông qua việc thay đổi nồng độ GOx ban đầu, từ đó cung cấp một chiến lược đơn giản nhằm kiểm soát mật độ enzyme trên bề mặt hạt nano.



**Hình 3.4.** Ảnh hưởng của nồng độ GOx đến mức độ liên hợp của GOx lên bề mặt ZnO-TA NPs

### 3.1.3. Kết quả đo kích thước, chỉ số đa phân tán và thế zeta của hệ nano

Đường kính thủy động học và thế zeta của hệ nano được trình bày trong **Bảng 3.1**. Kết quả cho thấy ZnO-TA có đường kính khoảng  $114,2 \pm 16,7$  nm, với chỉ số đa phân tán tương đối cao ( $PDI = 0,49 \pm 0,12$ ), phản ánh sự phân bố kích thước chưa đồng đều. Sau khi liên hợp với GOx, kích thước hạt trung bình tăng lên  $227,4 \pm 5,02$  nm, đồng thời PDI giảm đáng kể xuống còn  $0,26 \pm 0,06$ . Sự gia tăng kích thước phản ánh sự hình thành của lớp enzyme bao quanh hạt nano. Trong khi sự suy giảm của PDI chứng minh độ đồng đều về kích thước được cải thiện rõ rệt, giúp nâng cao độ ổn định của hệ ZnO-TA@GOx.

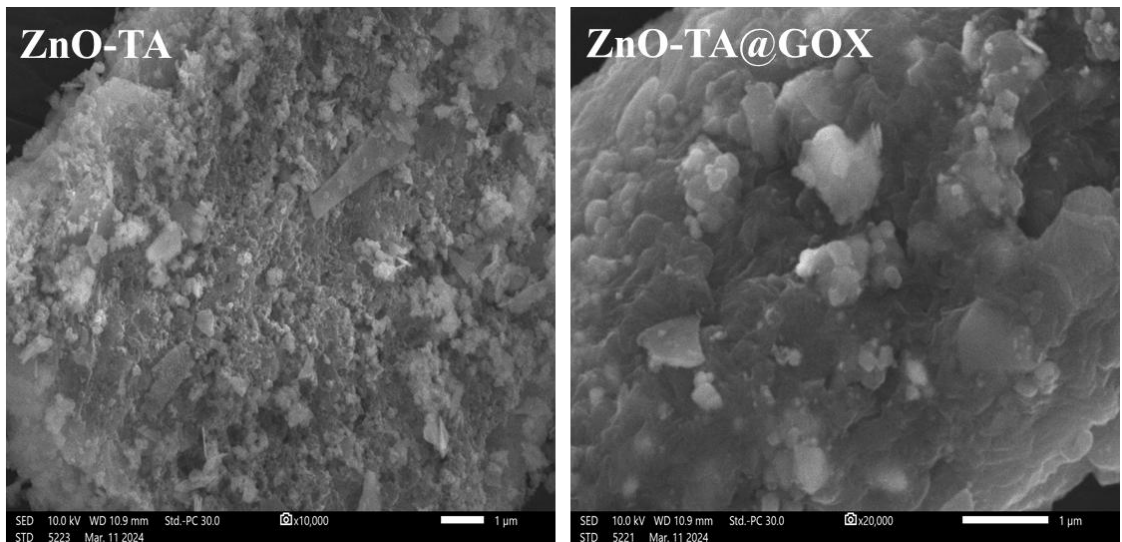
**Bảng 3.1.** Đường kính thủy động học, chỉ số đa phân tán và thế zeta của hệ nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx

Mẫu	Đường kính (nm)	Chỉ số đa phân tán PI	Thế Zeta (mV)
ZnO-TA	$114,2 \pm 16,7$	$0,49 \pm 0,12$	$-30 \pm 4,5$
ZnO-TA@GOx 4:1	$203,8 \pm 11,7$	$0,41 \pm 0,09$	–
ZnO-TA@GOx 2:1	$215,6 \pm 8,3$	$0,37 \pm 0,04$	–
ZnO-TA@GOx 1:1	$227,4 \pm 5,02$	$0,26 \pm 0,06$	$-57,8 \pm 6,36$

Thế zeta của các hạt nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx phân tán trong nước cất được xác định nhằm đánh giá điện tích bề mặt và độ ổn định của hệ. Như thể hiện trong **Bảng 3.1**, các hạt ZnO-TA mang thế zeta âm khoảng  $-30 \pm 4,4$  mV, có thể được quy cho sự hiện diện của các nhóm hydroxyl phenolic ( $-\text{OH}$ ) từ axit tannic trên bề mặt hạt nano. Sau khi cố định GOx, thế zeta giảm đáng kể từ  $-30 \pm 4,4$  mV xuống  $-57.8 \pm 6,4$  mV. Sự gia tăng điện tích âm của hệ ZnO-TA@GOx có thể được giải thích dựa trên điểm đẳng điện (pI) của enzyme glucose oxidase. Cụ thể, pI của GOx vào khoảng 4.2, trong khi giá trị pH của nước cất (pH  $\sim 7$ ) thường cao hơn giá trị này. Trong điều kiện pH lớn hơn điểm đẳng điện, các nhóm amino acid có khả năng ion hóa trên bề mặt enzyme có xu hướng bị khử proton, khiến enzyme mang điện tích âm tổng thể [94–96]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng hệ có thế zeta lớn hơn  $\pm 30$  mV thường biểu thị tính ổn định cao, trong khi các giá trị thấp hơn thường liên quan đến hiện tượng kết tụ và kém ổn định [97–99]. Dựa trên tiêu chí này, cả hai hệ ZnO-TA và ZnO-TA@GOx đều thể hiện độ ổn định tốt trong môi trường nước. Đáng chú ý, sự gia tăng điện tích âm sau khi cố định GOx làm tăng lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt, xu hướng này tương đồng với sự giảm của chỉ số PDI, hạn chế hiện tượng kết tụ và khẳng định vai trò của GOx trong việc cải thiện độ ổn định của hệ nano.

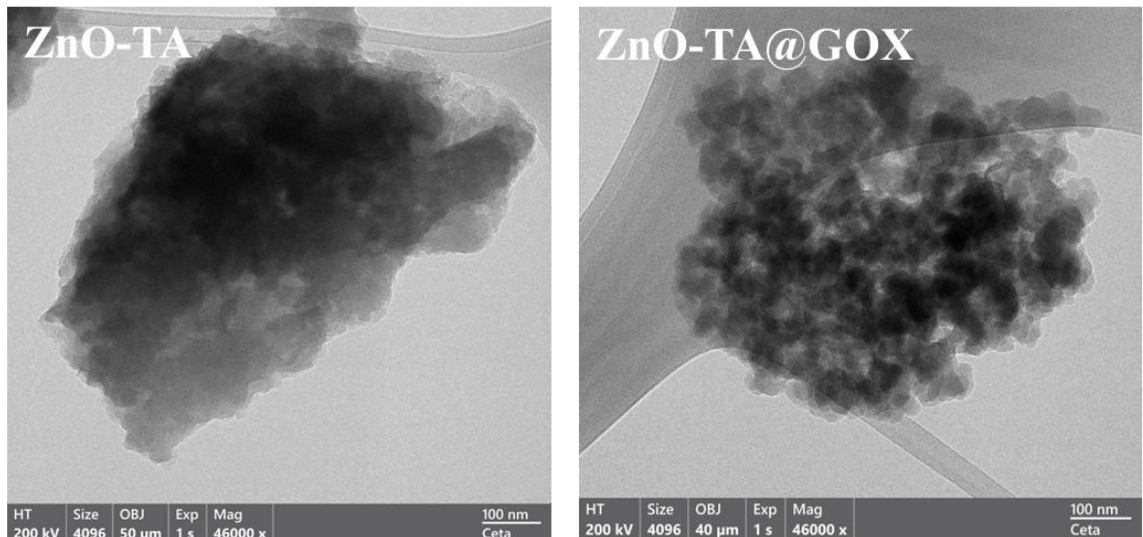
#### 3.1.4. Kết quả đo TEM và SEM của hệ nano

Hình thái bề mặt của các hạt nano ZnO được khảo sát bằng kính hiển vi điện tử quét, như thể hiện trong **Hình 3.5**. Mẫu ZnO-TA cho thấy bề mặt thô ráp, có độ xốp cao, được cấu thành từ các cụm hạt kết tụ. Những đặc điểm này gợi ý sự liên kết tương đối lỏng lẻo trong mạng lưới hạt, cho thấy mức độ bao phủ bề mặt bởi TA còn hạn chế. Trong khi đó, ZnO-TA@GOx biểu hiện trạng thái bề mặt mịn và đồng nhất hơn, chủ yếu gồm các hạt hình cầu với ít đặc trưng tinh thể rõ rệt. Sự thay đổi hình thái này có thể được giải thích bởi quá trình cố định thành công GOx, tạo nên một lớp phủ bao quanh các hạt ZnO-TA.



**Hình 3.5.** Kết quả đo đường kính thủy động học và thế zeta của hệ nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx

Tương tự, hình ảnh TEM (**Hình 3.6**) cho thấy các hạt nano ZnO-TA@GOx có hình thái tương đối đồng nhất, chủ yếu là các cấu trúc hình cầu phân tán tốt với kích thước khoảng 30 nm, trái ngược với hiện tượng kết tụ quan sát được ở mẫu ZnO-TA. Tổng hợp các kết quả về hình thái và kích thước cho thấy quá trình cố định GOx không chỉ làm biến đổi đặc điểm hình thái mà còn cải thiện đáng kể khả năng phân tán của các hạt nano trong môi trường nước. Đáng chú ý, sự hình thành các hạt nano có kích thước nhỏ và phân bố đồng đều là yếu tố thuận lợi cho quá trình vận chuyển thuốc hướng đích khối u thông qua hiệu ứng EPR. Với kích thước nằm trong khoảng phù hợp (100-250 nm), hệ ZnO-TA@GOx có khả năng xâm nhập tế bào hiệu quả qua hệ mạch máu rò rỉ đặc trưng của mô khối u và được lưu giữ lại do hệ dẫn lưu bạch huyết kém phát triển [100,101]. Sự đồng đều về kích thước giúp nâng cao hiệu quả hướng đích thụ động và cho thấy tiềm năng ứng dụng đầy hứa hẹn của hệ nano ZnO-TA@GOx trong điều trị ung thư.

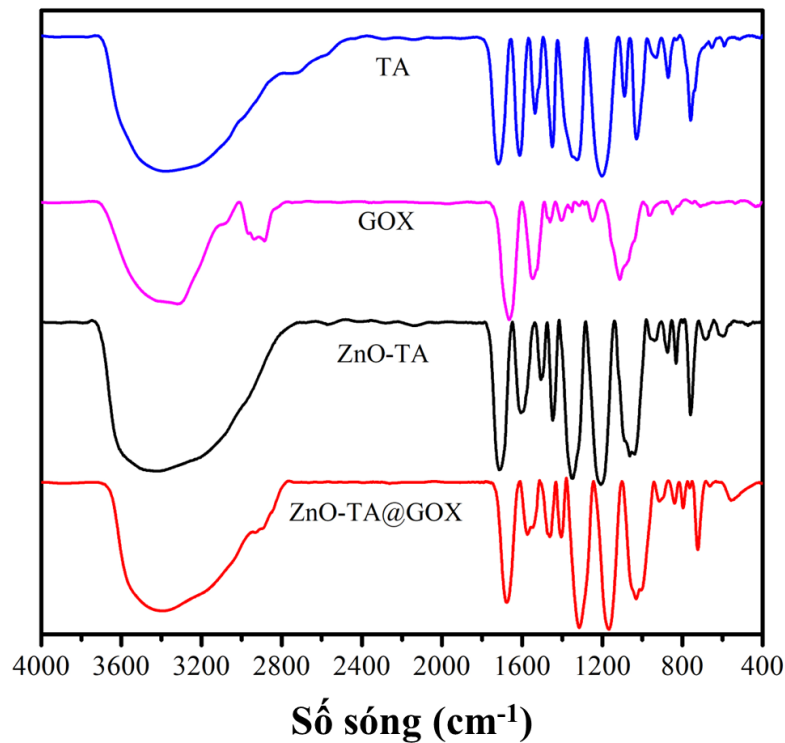


**Hình 3.6.** Hình ảnh quan sát được thông qua kính hiển vi điện tử truyền qua của ZnO-TA (bên trái) và ZnO-TA@GOx (bên phải)

### 3.1.5. Kết quả đo FTIR của hệ nano

Phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier được thực hiện nhằm xác định các đặc trưng cấu trúc của ZnO-TA và ZnO-TA@GOx (**Hình 3.7**). Phổ của ZnO-TA xuất hiện các dải hấp thụ đặc trưng của ZnO trong vùng  $600-700\text{ cm}^{-1}$ , tương ứng với dao động kéo giãn của liên kết Zn-O và Zn-OH, qua đó xác nhận sự hình thành của các hạt nano ZnO [102–104]. Một dải hấp thụ rộng trong khoảng  $3000-3700\text{ cm}^{-1}$ , với đỉnh nổi bật ở khoảng  $3550\text{ cm}^{-1}$ , được gán cho dao động kéo giãn của nhóm O-H thuộc các nhóm hydroxyl phenolic trong TA. Ngoài ra, tín hiệu hấp thụ rõ tại  $1710\text{ cm}^{-1}$  cùng với nhiều dải trong vùng  $1100-1350\text{ cm}^{-1}$  được quy cho dao động kéo giãn C=O và C-O-C của liên kết ester giữa các đơn vị galloyl. Trong khi các dao động đặc trưng của vòng thơm, bao gồm dao động kéo giãn C=C trong vùng  $1450-1600\text{ cm}^{-1}$  và dao động uốn =C-H trong khoảng  $680-900\text{ cm}^{-1}$ , tiếp tục xác nhận sự liên hợp của TA lên bề mặt ZnO, nhiều khả năng thông qua liên kết hydro với các nhóm hydroxyl bề mặt [105,106]. Phổ của ZnO-TA@GOx vẫn duy trì các tín hiệu đặc trưng của cả ZnO và TA, đồng thời xuất hiện thêm các dải hấp thụ mới đặc trưng cho protein. Dải hấp thụ mạnh tại  $1680\text{ cm}^{-1}$  được quy cho vùng amide I, tương ứng với dao động kéo giãn của liên kết C=O, trong khi các tín hiệu trong khoảng  $1583-1607\text{ cm}^{-1}$  được gán cho vùng amide II, liên quan đến dao động uốn N-H và kéo giãn C-N, có sự chồng lấp một phần với dao động C=C của vòng thơm. Bên cạnh đó, các dao động kéo giãn C-H trong vùng  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  cho thấy sự hiện diện của các gốc mạch thẳng có nguồn gốc từ GOx

[107–109]. Tổng hợp lại, các kết quả này xác nhận sự cố định thành công của GOx lên bề mặt hạt nano ZnO được phủ TA, thông qua các tương tác như liên kết hydro hoặc liên kết cộng hóa trị giữa các nhóm chức của TA và enzyme. Đáng chú ý, việc đồng thời duy trì các đỉnh đặc trưng của TA và Zn-O cùng với sự xuất hiện của các dải amide đã cho thấy vai trò chức năng kép của lớp phủ TA. Cụ thể, lớp phủ này không chỉ neo bám lên bề mặt ZnO mà còn cung cấp các vị trí phản ứng thuận lợi cho quá trình liên hợp enzyme, từ đó góp phần tăng cường độ ổn định cấu trúc và tính năng sinh học của hệ vật liệu nano.

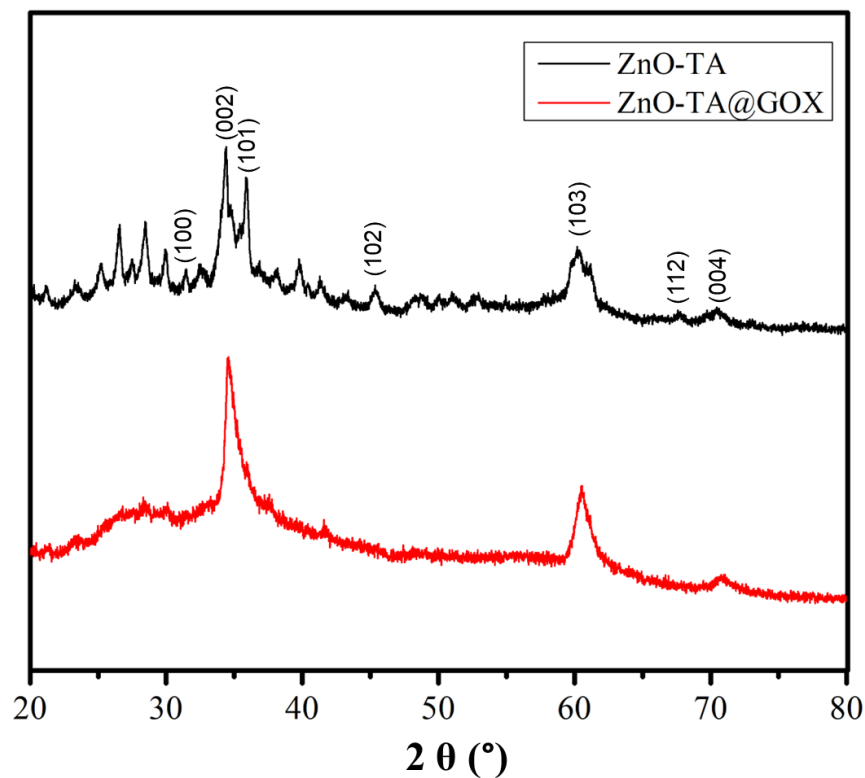


**Hình 3.7.** Phổ FTIR của hệ nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx

### 3.1.6. Kết quả đo XRD của hệ nano

Cấu trúc tinh thể của các hạt nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx được đánh giá bằng nhiễu xạ tia X, như trình bày trong **Hình 3.8**. Mẫu ZnO-TA thể hiện các đỉnh nhiễu xạ sắc nét tại các giá trị  $2\theta$  xấp xỉ  $32^\circ$ ;  $34,4^\circ$ ;  $36,2^\circ$ ;  $47,5^\circ$ ;  $61,8^\circ$ ;  $67,5^\circ$  và  $71,09^\circ$  tương ứng với các mặt tinh thể (100), (002), (101), (102), (103), (112) và (004) của cấu trúc lục giác wurtzite đặc trưng của ZnO [102,110]. Trong đó, hai đỉnh nổi bật tại  $34,4^\circ$  (mặt (002)) và  $36,2^\circ$  (mặt (101)) cho thấy vật liệu ZnO có độ kết tinh cao [111,112]. Việc các đỉnh đặc trưng này vẫn được duy trì sau khi biến tính với TA chứng tỏ lớp phủ polyphenol không làm phá vỡ mạng tinh thể nội tại của ZnO, cho thấy quá trình tổng hợp và biến tính bề mặt diễn ra mà không ảnh hưởng đến cấu trúc tinh thể. Đối với

mẫu ZnO-TA@GOx, phổ nhiễu xạ nhìn chung vẫn bảo toàn đặc trưng của cấu trúc wurtzite của ZnO tại vị trí  $2\theta$   $34,4^\circ$  (002) và  $61,8^\circ$  (103), tuy nhiên, cường độ và độ sắc nét của các đỉnh còn lại đã giảm đáng kể. Đặc biệt, đường nền trong vùng  $10-30^\circ$  trở nên rộng và kém rõ ràng hơn, cho thấy sự hiện diện của thành phần vô định hình từ lớp enzyme bao phủ bên ngoài. Những biến đổi này gợi ý rằng quá trình cố định GOx đã che phủ một phần bề mặt tinh thể của ZnO-TA, làm suy giảm cường độ nhiễu xạ thu được, nhưng không làm thay đổi cấu trúc mạng tinh thể lõi. Bên cạnh đó, việc không xuất hiện các đỉnh nhiễu xạ mới cho thấy lớp phủ enzyme không hình thành pha tinh thể thứ cấp.



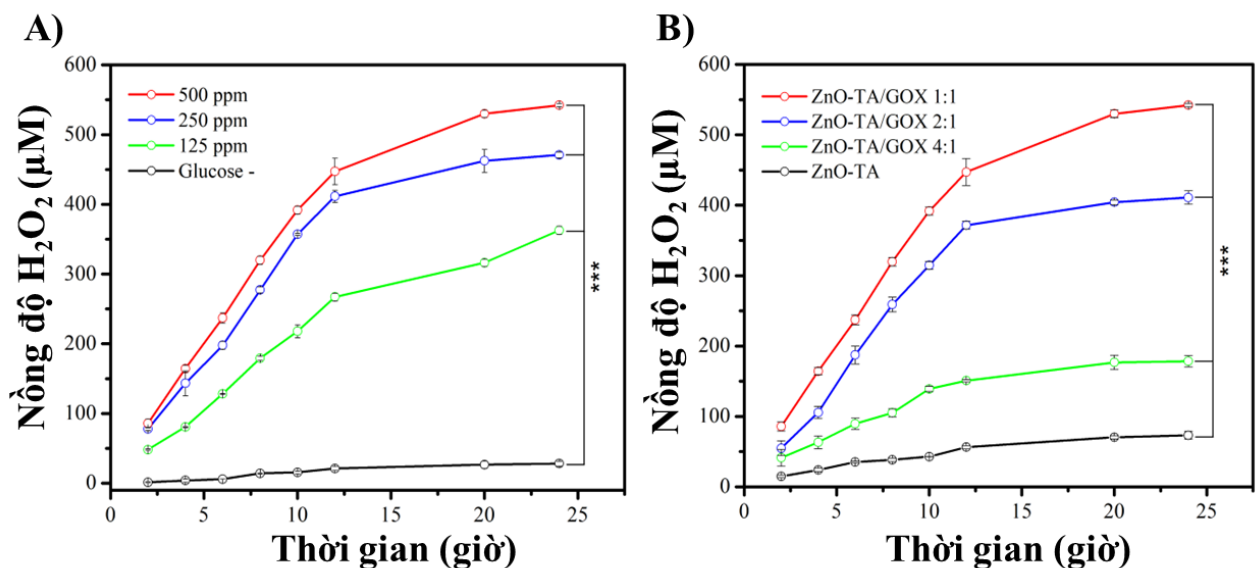
**Hình 3.8.** Phổ nhiễu xạ tia X của ZnO-TA và ZnO-TA@GOx

Tổng hợp lại, các kết quả XRD cho thấy quá trình biến tính bề mặt với TA và cố định enzyme không làm thay đổi cấu trúc tinh thể đặc trưng của ZnO. Sự bảo toàn này có ý nghĩa quan trọng trong việc duy trì các tính chất lý-hóa vốn có của vật liệu, đồng thời góp phần nâng cao hoạt tính sinh học nhờ sự hiện diện của lớp polyphenol và enzyme được gắn trên bề mặt.

### 3.2. Kết quả đánh giá khả năng tiêu thụ glucose và sản sinh $H_2O_2$ của hệ nano trong điều kiện *in vitro*

Tiềm năng “bỏ đói” tế bào ung thư của hạt nano ZnO-TA@GOx được đánh giá thông qua khả năng xúc tác phân hủy glucose tạo  $H_2O_2$  bằng bộ kit định

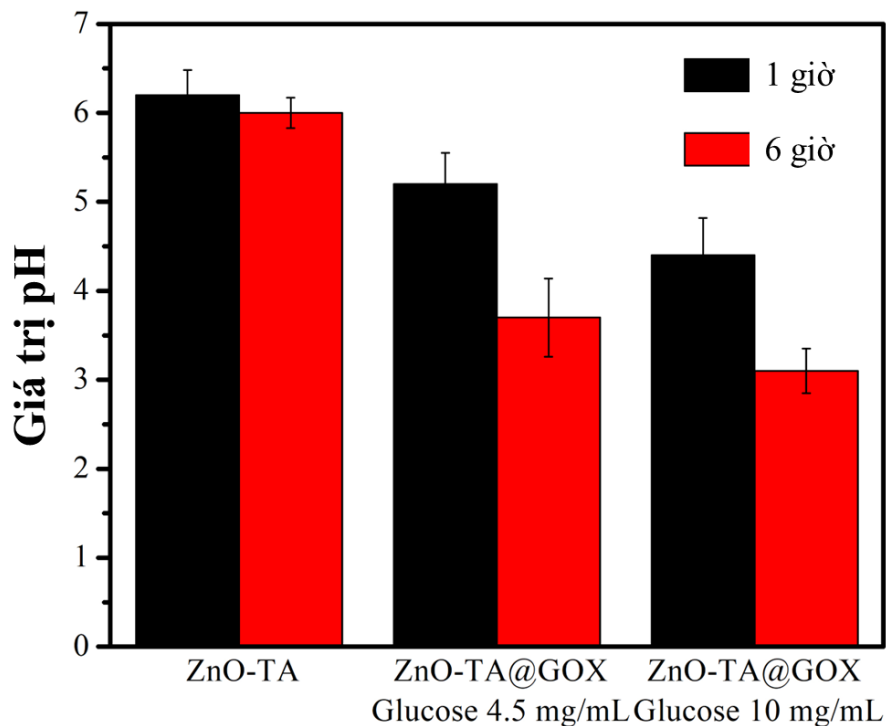
lượng peroxide. Như thể hiện trong **Hình 3.9A**, nồng độ  $H_2O_2$  tăng đáng kể ở các mẫu có bổ sung glucose (4,5 mg/mL) so với nhóm đối chứng. Sau 24 giờ ủ, hàm lượng  $H_2O_2$  đạt trong khoảng 362-542  $\mu M$ , tương ứng với sự gia tăng nồng độ hạt nano từ 125 lên 500 ppm. Kết quả này cho thấy enzyme GOx sau khi được cố định trên bề mặt hạt nano vẫn duy trì hoạt tính xúc tác, cho phép thúc đẩy hiệu quả quá trình oxy hóa glucose và sinh  $H_2O_2$ . Để làm rõ hơn vai trò của lượng enzyme gắn trên bề mặt, ảnh hưởng của nồng độ GOx đến hiệu suất xúc tác của hệ ZnO-TA@GOx cũng được khảo sát (**Hình 3.9B**). Kết quả cho thấy tồn tại mối tương quan thuận giữa lượng GOx cố định và lượng  $H_2O_2$  tạo thành. Cụ thể, tại tỷ lệ khối lượng GOx/ZnO-TA là 1:4 (tương ứng 10 mg GOx), nồng độ  $H_2O_2$  chỉ đạt 178  $\mu M$ , trong khi ở tỷ lệ tổng hợp 1:1 (40 mg GOx), lượng  $H_2O_2$  tăng lên đến 542  $\mu M$  sau 24 giờ. Sự gia tăng này có thể được lý giải bởi mật độ enzyme cao hơn trên bề mặt hạt nano, từ đó thúc đẩy quá trình oxy hóa glucose diễn ra mạnh mẽ hơn.



**Hình 3.9.** Sự sản sinh  $H_2O_2$  *in vitro* theo (A) nồng độ hạt nano và (B) mức độ liên hợp của GOx trên bề mặt hạt nano

Giá trị pH trong quá trình phản ứng cũng được theo dõi bằng máy đo pH. Kết quả (**Hình 3.10**) cho thấy pH của các dung dịch chứa ZnO-TA@GOx và glucose giảm đáng kể so với mẫu đối chứng ZnO-TA. Cụ thể, ở nồng độ glucose 4,5 mg/mL, pH giảm xuống 5.2 sau 1 giờ ủ và xuống 3.7 sau 6 giờ ủ, cho thấy sự hình thành sản phẩm axit gluconic trong quá trình oxy hóa glucose. Khi nồng độ glucose tăng lên 10 mg/mL, mức giảm pH diễn ra nhanh và rõ rệt hơn, từ 6.1 xuống 4.4 chỉ sau 1 giờ và tiếp tục giảm xuống 3.1 sau 6 giờ ủ. Xu

hướng này phản ánh sự gia tăng tốc độ tạo sản phẩm khi nồng độ cơ chất tăng. Sự giảm pH này đóng vai trò quan trọng trong việc tạo môi trường axit thuận lợi cho sự hoà tan của ZnO NPs, giải phóng ion  $Zn^{2+}$  gây độc đối với tế bào ung thư [19,113].



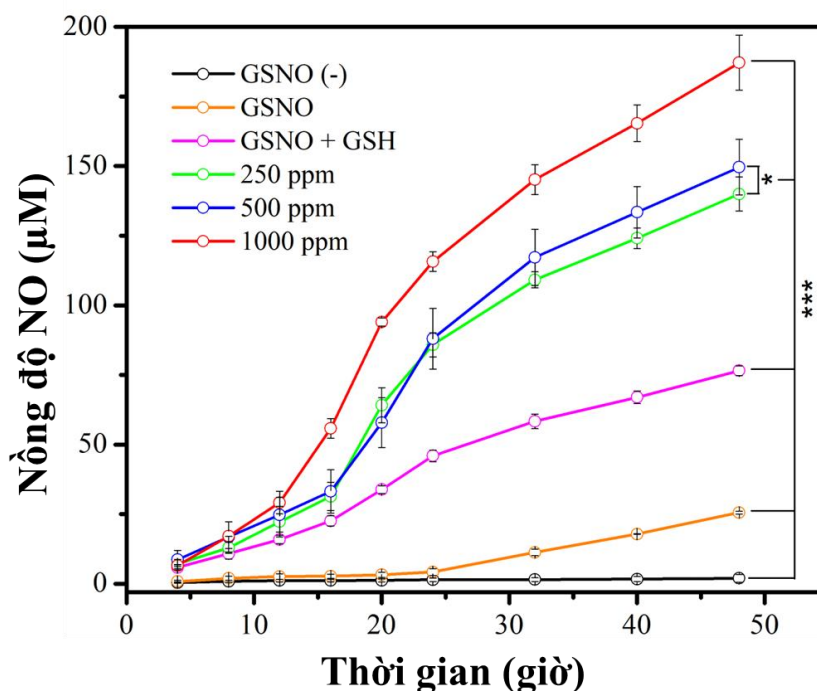
**Hình 3.10.** Sự thay đổi giá trị pH do phản ứng giữa các hạt nano ZnO-TA@GOx với các nồng độ glucose khác nhau.

Tổng hợp lại, các kết quả trên cho thấy các hạt nano ZnO-TA@GOx có khả năng tiêu thụ glucose hiệu quả đồng thời tạo ra lượng  $H_2O_2$  đáng kể, qua đó thể hiện cơ chế tác động kép trong liệu pháp bỏ đói tế bào ung thư. Bên cạnh đó, tốc độ xúc tác của hệ có thể được điều chỉnh linh hoạt thông qua việc thay đổi nồng độ hạt nano hoặc lượng enzyme được cố định. Sự kết hợp hiệp đồng giữa quá trình cạn kiệt glucose và sự tạo ROS tại chỗ cho thấy tiềm năng điều trị ung thư hứa hẹn của hệ vật liệu nano này.

### 3.3. Kết quả đánh giá khả năng xúc tác tạo NO của hệ nano trong điều kiện *in vitro*.

Khả năng xúc tác tạo NO của ZnO NPs từ nguồn NO nội sinh được xác định bằng phép thử Griess. Biểu đồ **hình 3.11** cho thấy GSNO có khả năng tự phân huỷ để giải phóng NO trong điều kiện sinh lý. Tuy nhiên, nồng độ NO thu được rất thấp, chỉ khoảng  $25,56 \mu M$  tại thời điểm 48 giờ so với nhóm chứa hệ nano. Khi bổ sung GSH vào hệ GSNO, nồng độ NO tăng lên đáng kể, đạt khoảng  $75 \mu M$  sau 48 giờ, cho thấy GSH có khả năng thúc đẩy quá trình phân

hủy GSNO [112,114]. Đáng chú ý, sự hiện diện của các hạt nano ZnO tiếp tục làm gia tăng cả tốc độ phân hủy lẫn lượng NO được giải phóng theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Sau 48 giờ ủ, các mẫu chứa ZnO NPs với nồng độ tăng dần 250, 500 và 1000 ppm xúc tác phân hủy GSNO sản sinh hàm lượng NO tương ứng là 140, 150 và 187  $\mu\text{M}$ . Các kết quả này chứng minh rằng ZnO có khả năng thúc đẩy quá trình giải phóng NO mạnh hơn đáng kể so với tác động của GSH đơn thuần.

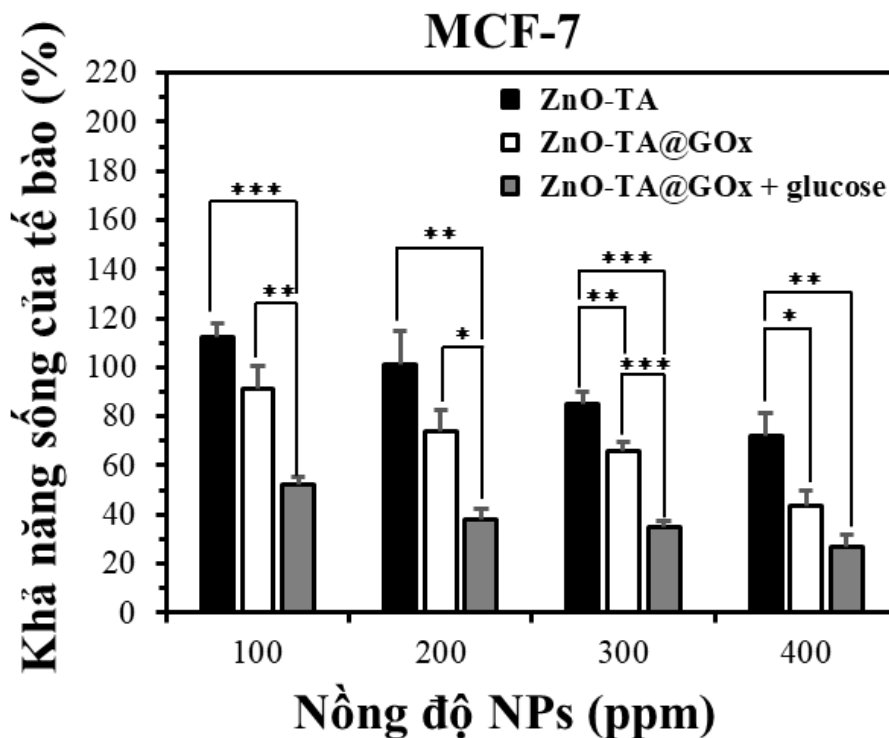


**Hình 3.11.** Sự tạo thành NO tại chỗ từ phản ứng giữa các nồng độ khác nhau của hạt nano ZnO-TA@GOx với các chất cho NO, bao gồm S-nitrosoglutathione (GSNO, 10  $\mu\text{M}$ ) và glutathione (GSH, 10  $\mu\text{M}$ ).

Tổng hợp lại, các kết quả này tương đồng với phát hiện trong nghiên cứu của Zichuang Xu và cộng sự (2024) và Tao Yang và cộng sự (2020) [33,77]. Hai nghiên cứu trên chứng minh khả năng bắt chước hoạt tính enzyme glutathione peroxidase của ZnO NPs trong việc xúc tác phân hủy GSNO nội sinh khi có sự hiện diện của GSH, hình thành NO theo hướng bền vững. Khả năng xúc tác này làm nổi bật tiềm năng ứng dụng của hệ nano trong điều trị ung thư bằng cách tận dụng các chất cho NO nội sinh sẵn có để cảm ứng quá trình apoptosis của tế bào ung thư, đồng thời ức chế sự hình thành mạch máu mới cũng như tăng cường hiệu quả của các liệu pháp động hóa học hoặc quang động thông qua các cơ chế trung gian bởi NO.

### 3.4. Kết quả đánh giá độc tính tế bào và khả năng tương thích sinh học của hệ nano trong điều kiện *in vitro*

Để đánh giá tiềm năng điều trị và tính an toàn sinh học của ZnO-TA@GOx NPs, độc tính tế bào *in vitro* của hệ nano này được khảo sát trên tế bào ung thư vú (MCF-7) và nguyên bào sợi da người bình thường (hDFBs) bằng phép thử WST-1 và nhuộm sống/chết. Như thể hiện trong **Hình 3.12**, cả ZnO-TA và ZnO-TA@GOx đều gây tác động gây độc đáng kể lên tế bào MCF-7, làm giảm tỷ lệ sống của tế bào xuống còn lần lượt 72,12% và 43,84% tại nồng độ 400 ppm. Đáng chú ý, ZnO-TA@GOx có khả năng ức chế khoảng 25% tế bào MCF-7 ngay cả ở các nồng độ thấp hơn. Ngược lại, hệ ZnO-TA chỉ thể hiện độc tính tế bào ở mức hạn chế trong khoảng nồng độ 100-300 ppm, với 80% tế bào MCF-7 vẫn sống sót. Việc bổ sung glucose (4,5 mg/mL) tiếp tục làm gia tăng đáng kể hiệu quả kháng ung thư của ZnO-TA@GOx, thể hiện qua hơn 60% tế bào ung thư bị tiêu diệt ở tất cả các nồng độ khảo sát (100-400 ppm). Giá trị nồng độ ức chế 50% ( $IC_{50}$ ) của ZnO-TA@GOx được xác định xấp xỉ 100 ppm trong điều kiện có mặt glucose, thấp hơn đáng kể so với giá trị  $IC_{50}$  khoảng 400 ppm khi không bổ sung glucose. Sự khác biệt này cho thấy hiệu quả gây độc tế bào của hệ phụ thuộc rõ rệt vào sự hiện diện của glucose. Hiệu quả gây độc vượt trội của ZnO-TA@GOx so với ZnO-TA được cho là xuất phát từ khả năng xúc tác phân hủy glucose, đồng thời tạo ra  $H_2O_2$  và NO, từ đó gây nên tác động hiệp đồng trong quá trình tiêu diệt tế bào ung thư.



**Hình 3.12.** Thử nghiệm độc tính tế bào WST-1 trên tế bào ung thư (MCF-7) khi tiếp xúc với hạt nano ở các nồng độ khác nhau.

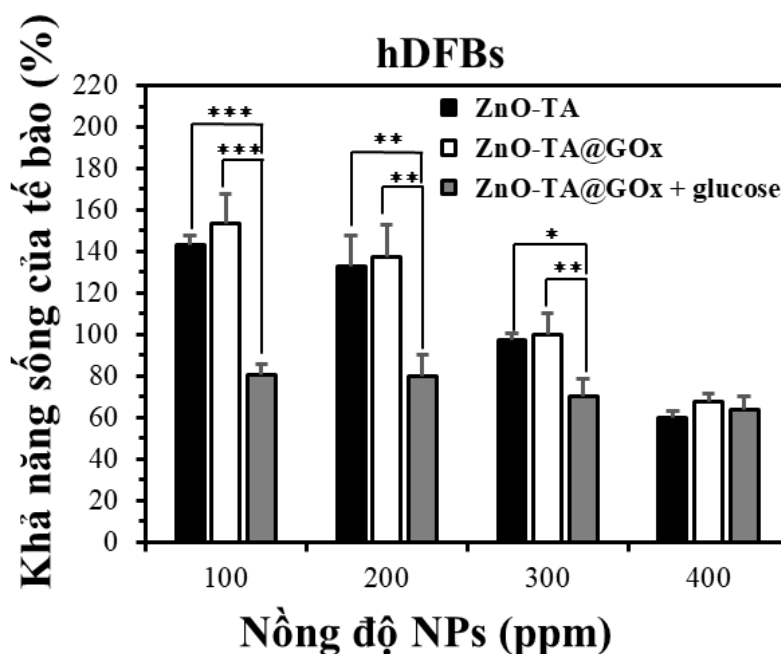
Ở nồng độ thấp đến trung bình,  $H_2O_2$  đã được chứng minh có khả năng cảm ứng chết tế bào theo cách phụ thuộc vào nồng độ và loại tế bào. Chẳng hạn, nghiên cứu của Tochigi và cộng sự (2013) [115] cho thấy  $H_2O_2$  ở nồng độ 30-100  $\mu M$  có thể kích hoạt quá trình apoptosis ở tế bào ung thư hắc tố người kháng TRAIL-một loại phối tử kích hoạt apoptosis. Trong một nghiên cứu khác [116], quá trình kích hoạt apoptosis của tế bào HeLa được khảo sát theo thời gian xử lý với  $H_2O_2$  và cho thấy tỷ lệ apoptosis đạt 28,96% sau 15 phút xử lý với  $H_2O_2$  ở nồng độ 125  $\mu M$ . Ngoài ra,  $H_2O_2$  ở nồng độ thấp (6,5  $\mu M$ ) cũng đã được báo cáo có khả năng làm tăng độ nhạy của tế bào ung thư với các liệu pháp điều trị thông qua việc gây tổn thương DNA, làm cạn kiệt ATP theo cơ chế không phụ thuộc caspase, ức chế đường phân và ngăn cản các con đường phục hồi ATP [117]. Tương tự  $H_2O_2$ , NO cũng có thể thúc đẩy quá trình apoptosis ở tế bào ung thư thông qua nhiều cơ chế liên quan đến stress oxy hóa. Ở nồng độ cao, NO có thể làm rối loạn điện thế màng ty thể, từ đó thúc đẩy sự giải phóng cytochrome c và hoạt hóa con đường apoptosis nội sinh. Đồng thời, NO còn có thể làm tăng biểu hiện các protein tiền apoptosis như Bax và làm giảm biểu hiện các protein kháng apoptosis như Bcl-2. Bên cạnh đó, NO còn

hoạt hóa caspase-3 và caspase-9, qua đó khuếch đại tín hiệu apoptosis. Những tác động này có thể dẫn đến chết chọn lọc tế bào ung thư trong những điều kiện thích hợp. Ví dụ, Confino và cộng sự [118] đã ghi nhận hiện tượng chết tế bào ung thư nhanh chóng và trên diện rộng ở nhiều loại khối u khác nhau, bao gồm ung thư đại tràng, ung thư vú, ung thư tụy và ung thư buồng trứng, sau khi tiếp xúc với NO dạng khí ở nồng độ cực cao (10.000-100.000 ppm). Gần đây, Gordon và cộng sự [119] cũng đã chứng minh hiệu quả kháng ung thư của GSNO, một chất cho NO, trên tế bào u nguyên bào thần kinh, trong đó xử lý bằng GSNO làm giảm hoạt động chuyên hóa, ức chế khả năng tạo cụm dòng và làm tăng chết tế bào.

Trong nghiên cứu này, ZnO-TA@GOx có khả năng tạo đồng thời  $H_2O_2$  và NO, lần lượt nhờ hoạt tính xúc tác của GOx và ZnO. Cơ chế tạo đồng thời hai tác nhân gây độc này góp phần tạo nên hiệu ứng hiệp đồng trong tiêu diệt tế bào ung thư và mở ra một chiến lược đầy hứa hẹn nhằm loại bỏ tế bào ung thư một cách hiệu quả và chọn lọc, đồng thời hạn chế độc tính đối với tế bào bình thường. Cần lưu ý rằng nồng độ glucose được sử dụng trong các phép thử độc tính tế bào này (4,5 mg/mL) cao hơn mức sinh lý thông thường và có thể chưa phản ánh đầy đủ điều kiện dinh dưỡng thực tế của vi môi trường khối u. Dù vậy, trong điều kiện thí nghiệm hiện tại, việc bổ sung glucose không gây ra sự khác biệt đáng kể về khả năng sống của tế bào hDFBs giữa các nhóm khảo sát. Hạn chế này đồng thời cũng nhấn mạnh sự cần thiết của các nghiên cứu tiếp theo trong các điều kiện gần với sinh lý hơn. Trong tương lai, nên khảo sát hệ nano này ở các nồng độ glucose thấp hơn, đại diện tốt hơn cho vi môi trường khối u, nhằm đánh giá chính xác hơn độ nhạy và hiệu quả điều trị của hệ vật liệu.

Độc tính tế bào của ZnO-TA và ZnO-TA@GOx đối với nguyên bào sợi da người bình thường hDFBs thấp hơn rõ rệt so với trên tế bào ung thư MCF-7. Như thể hiện trong **Hình 3.13**, tế bào hDFBs vẫn duy trì tỷ lệ sống trên 90% khi được xử lý với các hạt nano ở nồng độ 100-300 ppm. Ở nồng độ thấp hơn 300 ppm, cả ZnO-TA và ZnO-TA@GOx đều làm tăng đáng kể khả năng sống của tế bào so với nhóm đối chứng không xử lý. Hiện tượng này liên quan đến vai trò thúc đẩy tăng sinh của  $H_2O_2$  ở nồng độ thấp. Cụ thể, khi nồng độ  $H_2O_2$  ở mức dưới ngưỡng gây độc, tức nồng độ  $H_2O_2$  nội bào  $< 1 \mu M$  đối với tế bào bình thường và  $< 50 \mu M$  đối với tế bào ung thư [120,121],  $H_2O_2$  có thể đóng

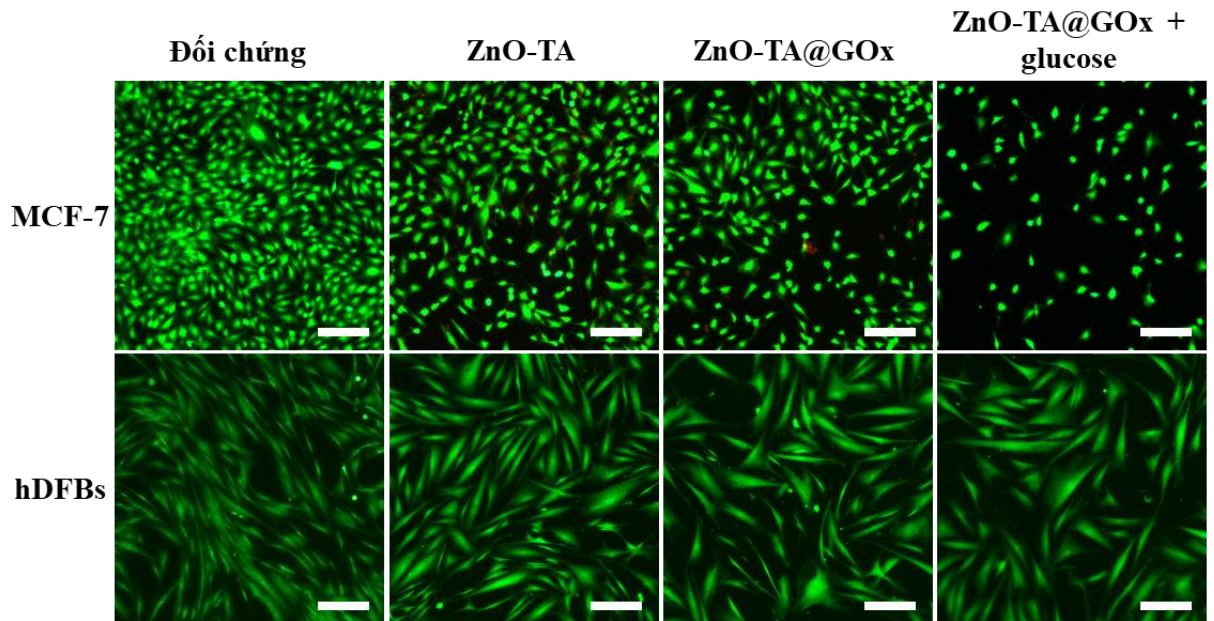
vai trò như một chất truyền tin thứ cấp trong nhiều con đường tín hiệu nội bào, điều hòa hoạt động của nhóm thụ thể tyrosine kinase như các thụ thể yếu tố tăng trưởng có nhiệm vụ truyền tín hiệu trong các hoạt động tăng sinh tế bào [122,123]. Do đó, lượng  $H_2O_2$  giới hạn sinh ra từ phản ứng xúc tác của enzyme GOx và glucose trong môi trường nuôi cấy có thể đã góp phần làm tăng khả năng sống của tế bào hDFBs tại các nồng độ hạt nano thấp. Ngoài ra, việc bổ sung glucose không tạo ra sự khác biệt đáng kể về khả năng sống của tế bào hDFBs giữa các nhóm khảo sát. Những kết quả này nhấn mạnh tính chọn lọc gây độc của ZnO-TA@GOx, vừa thể hiện hiệu quả kháng ung thư mạnh mẽ, vừa duy trì được mức độ tương thích tế bào chấp nhận được đối với tế bào bình thường ở cùng nồng độ xử lý.



**Hình 3.13.** Thử nghiệm độc tính tế bào WST-1 trên tế bào tế bào bình thường (hDFBs) khi tiếp xúc với hạt nano ở các nồng độ khác nhau.

**Hình 3.14** trình bày kết quả nhuộm sống/chết của dòng tế bào MCF-7 và hDFBs sau khi xử lý với các mẫu ZnO-TA, ZnO-TA@GOx và ZnO-TA@GOx bổ sung glucose. Ở nhóm đối chứng, cả 2 dòng tế bào đều biểu hiện mật độ cao, phân bố đồng đều và bám dính tốt trên bề mặt nuôi cấy. Cụ thể, tế bào MCF-7 có hình thái kéo dài đặc trưng, phát triển dày đặc và phủ gần như toàn bộ diện tích quan sát, phản ánh trạng thái tăng sinh bình thường trong điều kiện không xử lý. Tương tự, tế bào hDFBs ở nhóm đối chứng cũng duy trì hình thái thoi dài điển hình của nguyên bào sợi, sắp xếp thành các bó định hướng rõ rệt và

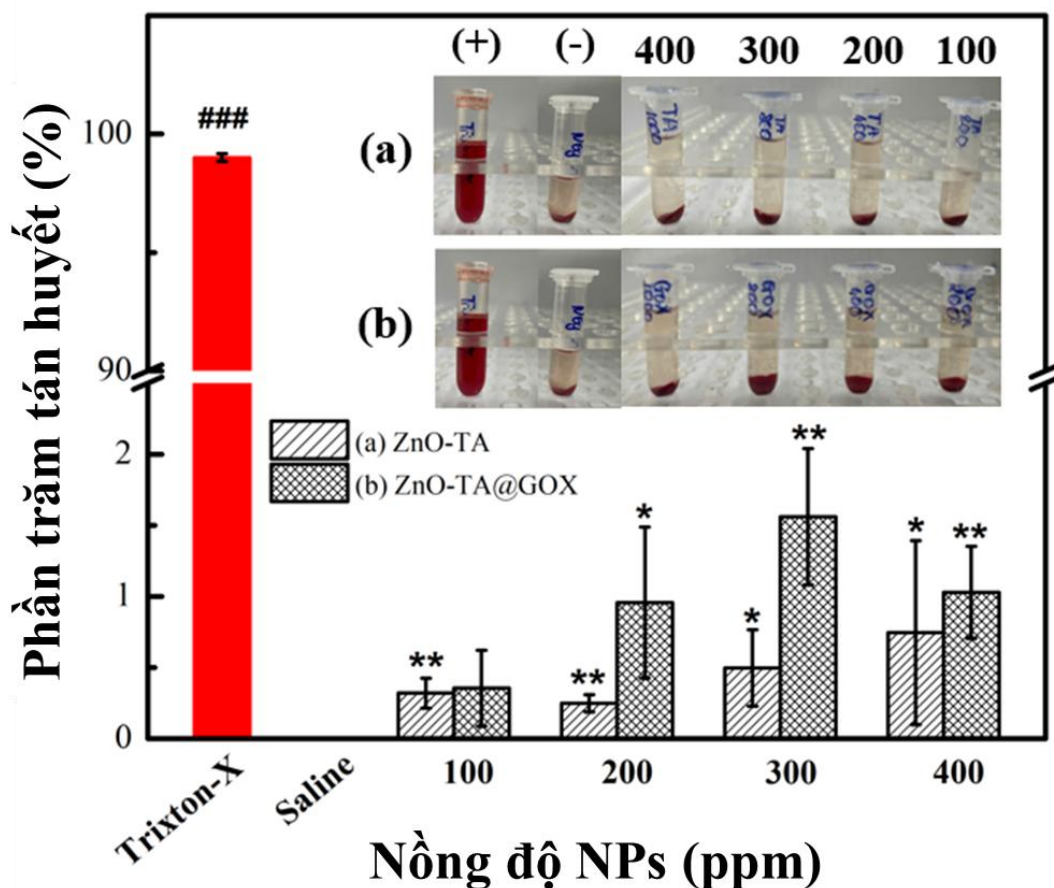
cho thấy khả năng sống tốt. So với nhóm đối chứng, khi xử lý với ZnO-TA, mật độ tế bào MCF-7 bắt đầu giảm nhẹ, phân bố thưa hơn kèm theo sự xuất hiện rải rác của một số tín hiệu đỏ/cam, cho thấy vật liệu đã bắt đầu ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào. Hiệu ứng này trở nên rõ rệt hơn ở nhóm ZnO-TA@GOx, khi số lượng tế bào phát tín hiệu xanh tiếp tục giảm, đồng thời số tín hiệu đỏ có xu hướng tăng lên, cho thấy việc cố định enzyme GOx lên hệ nano đã làm tăng hiệu quả gây độc tế bào. Đặc biệt, ở nhóm ZnO-TA@GOx bổ sung glucose, mật độ tế bào MCF-7 suy giảm mạnh nhất so với tất cả các nhóm còn lại, số lượng tế bào sống còn rất ít và phân bố rải rác trên vi trường. Sự suy giảm rõ rệt này cho thấy hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư được tăng cường mạnh khi có mặt glucose, do hoạt tính xúc tác của GOx đã thúc đẩy quá trình tiêu thụ glucose trong vi môi trường tế bào và tạo ra ROS như  $H_2O_2$ , từ đó làm gia tăng stress oxy hóa và ức chế mạnh khả năng sống sót của tế bào ung thư. Ngược lại, trên dòng tế bào bình thường hDFBs, sự khác biệt giữa nhóm đối chứng và các nhóm xử lý không rõ rệt như trên MCF-7. Ở tất cả các nhóm, tế bào hDFBs phần lớn vẫn duy trì hình thái thoi dài đặc trưng, độ bám dính tốt và sự sắp xếp tương đối đồng đều. So với nhóm đối chứng, các nhóm xử lý chỉ ghi nhận sự thay đổi nhẹ về mật độ tế bào mà không xuất hiện dấu hiệu tổn thương hình thái nghiêm trọng. Ngay cả ở nhóm ZnO-TA@GOx bổ sung glucose, tế bào hDFBs vẫn bảo tồn tương đối tốt cấu trúc hình thái bình thường. Kết quả này cho thấy hệ nano ZnO-TA@GOx có khả năng gây độc chọn lọc ưu tiên trên tế bào ung thư hơn là trên tế bào bình thường. Nhìn chung, dữ liệu từ ảnh nhuộm huỳnh quang cho thấy hiệu quả gây độc tế bào đáng kể đối với MCF-7, trong khi mức độ ảnh hưởng trên hDFBs vẫn tương đối thấp, qua đó khẳng định tiềm năng ứng dụng của hệ nano này trong điều trị ung thư theo cơ chế kết hợp giữa liệu pháp bổ oxy và stress oxy hoá.



**Hình 3.14.** Hình ảnh nhuộm sống/chết của tế bào MCF-7 và hDFBs

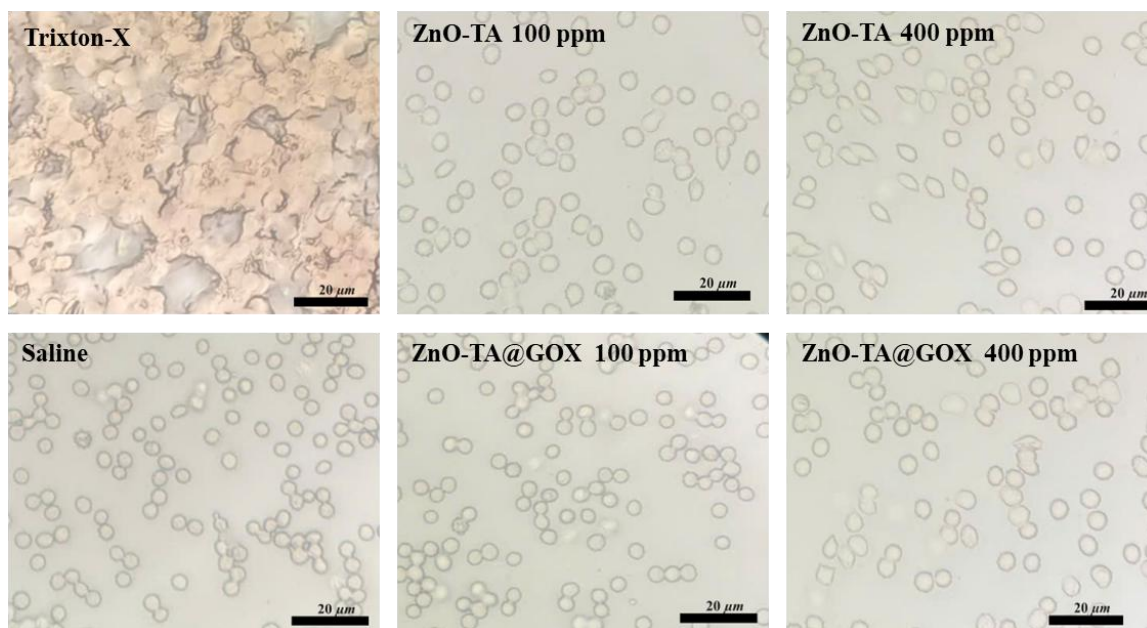
### 3.4.1. Kết quả đánh giá sự tương thích máu của hệ nano trong điều kiện *in vitro*

Để đánh giá tính an toàn của các hệ nano đối với đường dùng toàn thân, phép thử tán huyết đã được tiến hành và kết quả được trình bày trong **Hình 3.14** kết hợp với quan sát hình thái hồng cầu ở **Hình 3.15**. Kết quả phần trăm tán huyết cho thấy nhóm đối chứng dương (Triton X-100) gây tán huyết gần như 100%, phản ánh khả năng phá hủy màng hồng cầu mạnh, trong khi nhóm đối chứng âm (nước muối sinh lý) hầu như không gây tán huyết. Đáng chú ý, tất cả các hệ nano bao gồm ZnO-TA và ZnO-TA@GOX ở các nồng độ từ 100 đến 400 ppm đều có tỷ lệ tán huyết rất thấp dưới ngưỡng 5%. Theo các tiêu chuẩn đánh giá vật liệu sinh học, mức tán huyết dưới 5% được xem là không gây độc đáng kể đối với hồng cầu, do đó các hệ vật liệu này có thể được xếp vào nhóm an toàn về mặt huyết học [86,124,125].



**Hình 3.15.** Phần trăm tán huyết của hồng cầu sau khi tiếp xúc với ZnO-TA@GOx NPs ở các nồng độ khác nhau.

Hình ảnh hiển vi quang học của hồng cầu sau 1 giờ tiếp xúc với các hệ vật liệu tiếp tục cung cấp bằng chứng trực quan về mức độ tương thích của máu (Hình 3.16). Ở nhóm đối chứng dương, hồng cầu bị phá vỡ hoàn toàn và mất hình dạng đặc trưng, trong khi ở nhóm đối chứng âm, các tế bào giữ nguyên hình thái. Đối với các mẫu chứa hạt nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx ở cả hai nồng độ thấp nhất 100 ppm và cao nhất 400 ppm, hồng cầu vẫn duy trì hình dạng bình thường, không xuất hiện hiện tượng biến dạng, co rút hay kết tụ. Sự bảo toàn cấu trúc màng tế bào này cho thấy các hạt nano không gây tác động cơ học hoặc hóa học đáng kể lên hồng cầu trong điều kiện khảo sát. Từ các kết quả trên có thể khẳng định rằng các hệ nano ZnO có tính tương thích sinh học tốt, không gây tán huyết và tổn thương hình thái tế bào máu, chứng minh tính phù hợp và tiềm năng ứng dụng của chúng trong các liệu pháp điều trị ung thư theo đường toàn thân.



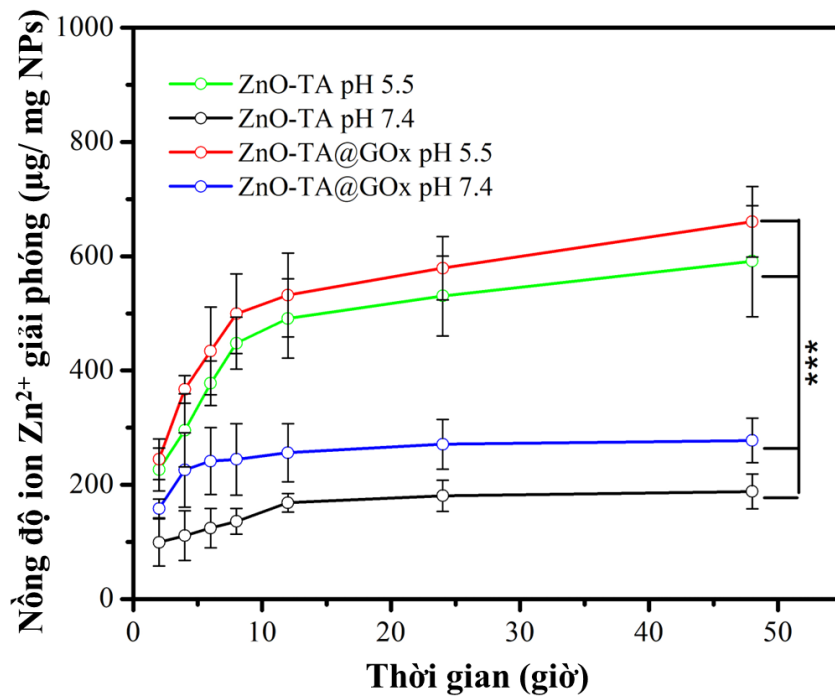
**Hình 3.16.** Hình ảnh chụp kính hiển vi của hồng cầu sau xử lý với hạt nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx ở nồng độ

### 3.5. Kết quả đánh giá sự giải phóng và tích lũy ion kẽm trong tế bào

Kẽm là một nguyên tố vi lượng thiết yếu trong cơ thể người, đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình tế bào như tăng sinh, biệt hóa, apoptosis và điều hòa chu kỳ tế bào [126,127]. Ở tế bào bình thường, cân bằng nội môi của kẽm được kiểm soát chặt chẽ bởi các protein vận chuyển kẽm chuyên biệt và thường được dự trữ trong các túi bào quan nhằm đảm bảo sự giải phóng nội bào có kiểm soát. Ngược lại, ở tế bào ung thư, sự điều hòa nội môi kẽm thường bị rối loạn, và mức độ rối loạn này có thể thay đổi tùy theo loại ung thư cũng như giai đoạn tiến triển của bệnh [128]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự tích lũy kẽm quá mức trong tế bào ung thư có thể gây stress oxy hóa và kích hoạt các hình thức chết tế bào theo chương trình hoặc hoại tử qua đó cho thấy tiềm năng của kẽm như một tác nhân kháng ung thư [129–131].

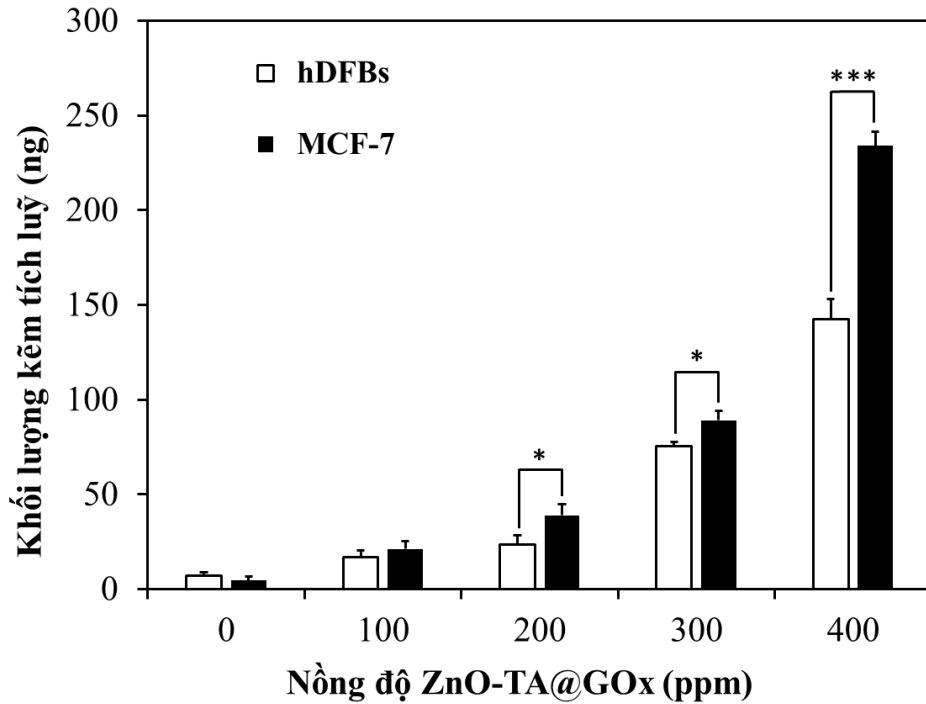
Để khảo sát khả năng hòa tan ZnO NPs tạo thành ion  $Zn^{2+}$  trong môi trường pH thấp đặc trưng của khối u, thử nghiệm giải phóng ion  $Zn^{2+}$  được tiến hành. Nhìn chung, thử nghiệm cho thấy các hạt nano ZnO có xu hướng hòa tan mạnh hơn trong môi trường pH thấp so với pH trung tính. Trong điều kiện axit, quá trình hòa tan của ZnO chủ yếu diễn ra thông qua phản ứng proton hóa trên bề mặt ZnO, tạo ra sản phẩm là các ion hòa tan như  $Zn^{2+}$  và  $Zn(OH)^+$  [132–134]. Như thể hiện trong **Hình 3.17**, hàm lượng  $Zn^{2+}$  giải phóng từ cả hai hệ ZnO-TA và ZnO-TA@GOx NPs trong môi trường pH 5.5 tăng dần theo thời gian,

đạt giá trị lần lượt là 501,3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  NPs và 703,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  NPs sau 48 giờ. Ngược lại, trong môi trường PBS pH 7.4, tốc độ giải phóng chậm hơn đáng kể, với hàm lượng  $\text{Zn}^{2+}$  tương ứng là 188,3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  NPs và 277,6  $\mu\text{g}/\text{mg}$  NPs đối với ZnO-TA và ZnO-TA@GOx tại cùng thời điểm. Kết quả này chứng minh rằng ZnO có khả năng hòa tan chọn lọc trong môi trường axit đặc trưng của vi môi trường khối u, thúc đẩy giải phóng ion  $\text{Zn}^{2+}$  tại chỗ - một tác nhân được biết đến với khả năng gây độc tế bào mạnh. Cơ chế này nhấn mạnh tiềm năng ứng dụng của ZnO như một hệ dẫn thuốc hướng đích trong điều trị ung thư.



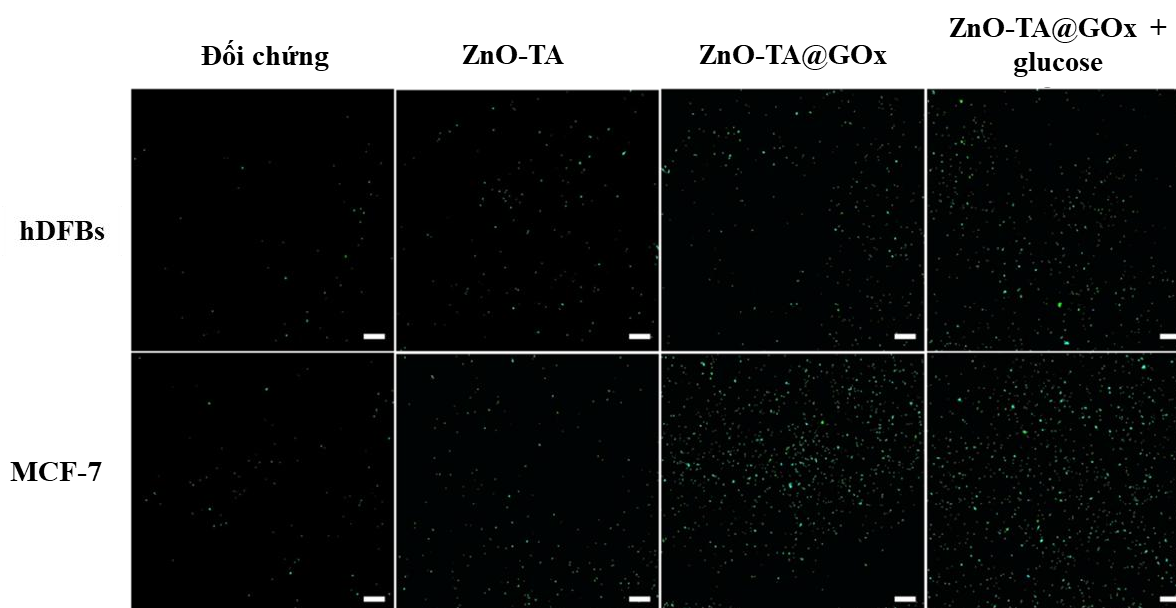
**Hình 3.17.** Biểu đồ giải phóng ion  $\text{Zn}^{2+}$  từ ZnO-TA và ZnO-TA@GOx NPs

Ngoài ra, sự tích lũy kẽm trong tế bào ung thư vú MCF-7 và nguyên bào sợi da người bình thường hDFBs sau xử lý với các nồng độ khác nhau của ZnO-TA@GOx được đánh giá bằng bộ kit định lượng kẽm. Như thể hiện trong **Hình 3.18**, hàm lượng kẽm nội bào có mối tương quan với cả loại tế bào và nồng độ hạt nano. Cụ thể, khi nồng độ hạt nano tăng từ 0 lên 400 ppm, hàm lượng kẽm tăng từ 4,6 ng lên 142,6 ng ở hDFBs và từ 6,9 ng lên 234,1 ng ở tế bào MCF-7. Sự tích lũy kẽm cao hơn ở tế bào MCF-7 so với tế bào bình thường phù hợp với các báo cáo trước đây về sự tăng biểu hiện của các protein nhập kẽm trong mô khối u [135]. Những kết quả này cho thấy ZnO-TA@GOx có khả năng thúc đẩy sự tích lũy kẽm ưu tiên trong tế bào ung thư, từ đó mở ra tiềm năng phân phối kẽm hướng đích và cảm ứng apoptosis hoặc tăng cường hiệu quả điều trị của các hệ mang kẽm.



**Hình 3.18.** Định lượng sự tích lũy kẽm nội bào trong tế bào bình thường (hDFBs) và tế bào ung thư (MCF-7).

Kết quả ghi nhận bằng ảnh chụp huỳnh quang DCFH-DA (**Hình 3.19**) cũng cho thấy sự khác biệt rõ rệt về mức độ tạo ROS nội bào giữa các nhóm xử lý cũng như giữa hai dòng tế bào. Ở cả hai dòng tế bào hDFBs và MCF-7, cường độ huỳnh quang màu xanh lá - đại diện cho mức độ ROS nội bào - đều tăng rõ rệt sau khi xử lý với các hạt nano so với nhóm đối chứng không xử lý. Đáng chú ý, tín hiệu huỳnh quang quan sát được ở tế bào ung thư MCF-7 luôn cao hơn rõ rệt so với tế bào hDFBs trong cùng điều kiện xử lý. Xu hướng này phù hợp với kết quả của thí nghiệm tích lũy kẽm trước đó, cho thấy sự hấp thu và tích lũy hạt nano diễn ra ưu tiên trong tế bào ung thư, từ đó thúc đẩy quá trình sản sinh ROS mạnh hơn. Cụ thể, ở nhóm xử lý bằng ZnO-TA, mức độ ROS tăng ở mức trung bình, có thể được lý giải bởi sự giải phóng ion  $Zn^{2+}$  đã gây ra quá trình cảm ứng stress oxy hóa nội bào. Quan trọng hơn, xử lý bằng ZnO-TA@GOx làm tăng mạnh cường độ huỳnh quang ở cả hai dòng tế bào, đặc biệt rõ rệt ở tế bào MCF-7, cho thấy sự gia tăng đáng kể ROS nhờ tác động hiệp đồng giữa ZnO và GOx. Khi bổ sung glucose (4,5 mg/mL), tín hiệu huỳnh quang tiếp tục tăng, xác nhận rằng GOx đã xúc tác hiệu quả quá trình oxy hóa glucose tạo  $H_2O_2$ , góp phần khuếch đại stress oxy hóa trong tế bào. Mức tăng này cao hơn đáng kể so với nhóm ZnO-TA đơn thuần, nhấn mạnh vai trò then chốt của GOx trong việc tăng cường khả năng tạo ROS.

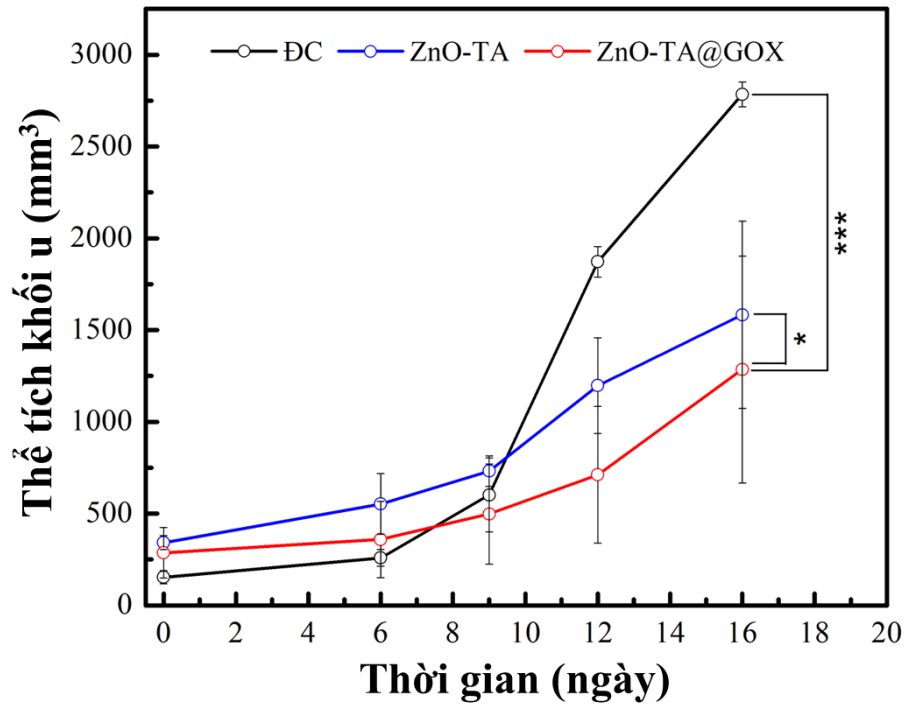


**Hình 3.19.** (B) Hình ảnh huỳnh quang biểu thị sự tạo thành ROS, được phát hiện bằng phương pháp nhuộm DCFH-DA, trong tế bào hDFBs và MCF-7 sau 6 giờ xử lý với các vật liệu khác nhau. Thước tỷ lệ tương ứng 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.6. Kết quả đánh giá khả năng ức chế khối u của hệ nano trên mô hình chuột *in vivo*

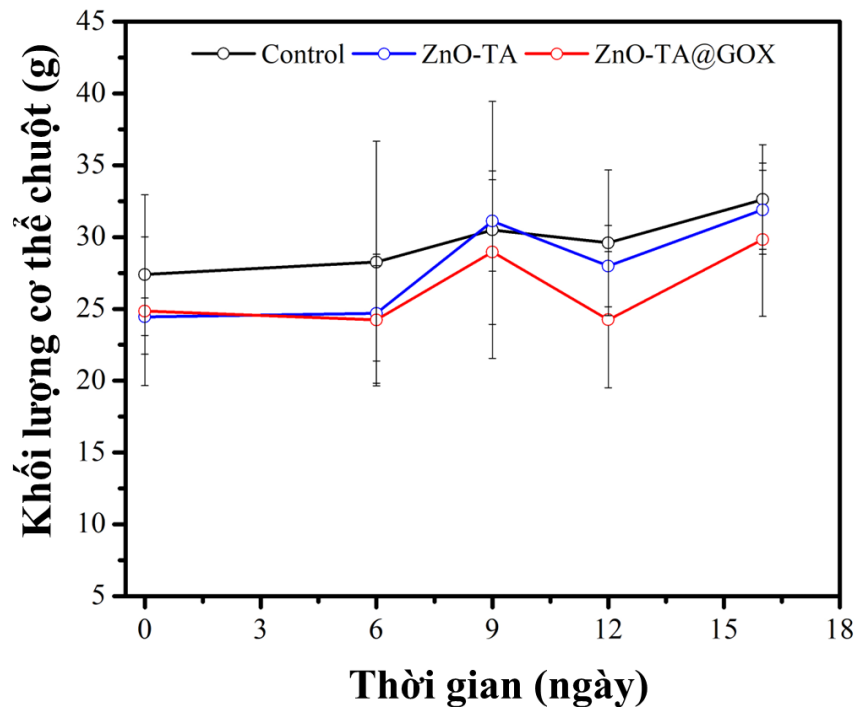
#### 3.6.1. Kết quả đánh giá khả năng ức chế khối u trên chuột

Hiệu quả kháng ung thư của ZnO-TA@GOx NPs được đánh giá trên mô hình chuột mang khối u dị ghép dưới da sử dụng tế bào ung thư vú người MCF-7. Chuột được điều trị bằng cách tiêm trực tiếp vào khối u ZnO-TA hoặc ZnO-TA@GOx với cùng liều lượng tương đương (5 mg/kg), hai lần mỗi tuần trong thời gian 3 tuần. Như thể hiện trong **Hình 3.20**, thể tích khối u của nhóm đối chứng (chuột không điều trị) tăng dần liên tục trong suốt thời gian thí nghiệm. Ngược lại, cả ZnO-TA và ZnO-TA@GOx đều ức chế đáng kể sự phát triển của khối u. Cụ thể, tại ngày thứ 16 sau điều trị, thể tích khối u trung bình ở các nhóm được xử lý bằng ZnO-TA và ZnO-TA@GOx đều nhỏ hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng, với các giá trị trung bình lần lượt là 1561  $\text{mm}^3$  và 1285  $\text{mm}^3$ , so với 2784  $\text{mm}^3$  ở nhóm đối chứng.



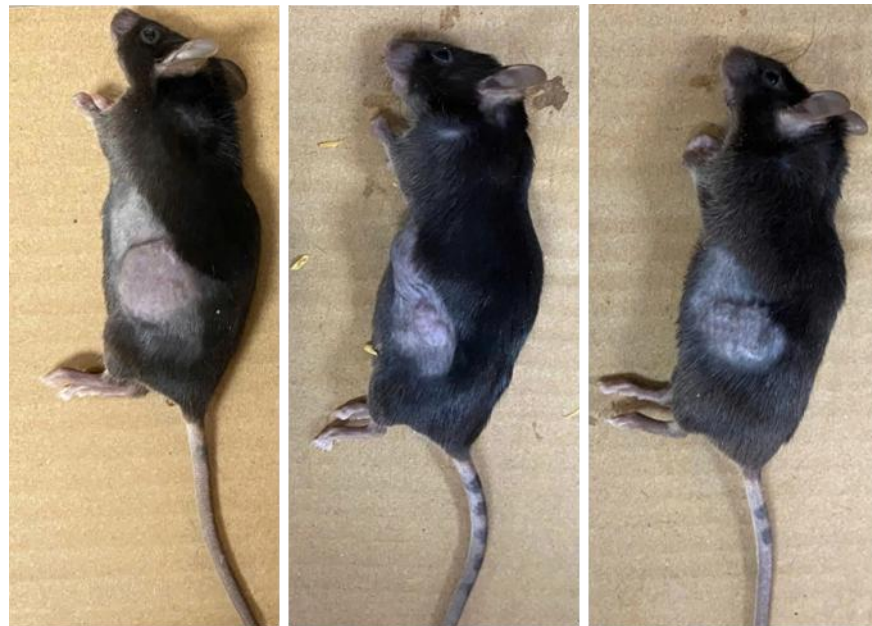
**Hình 3.20.** Sự thay đổi thể tích khối u theo thời gian

Cân nặng cơ thể chuột được theo dõi trong suốt quá trình thí nghiệm cho thấy các nhóm điều trị không gây ảnh hưởng tiêu cực đáng kể đến tình trạng sức khỏe của động vật (**Hình 3.21**). Cụ thể, tất cả chuột ở các nhóm điều trị đều duy trì khối lượng cơ thể ổn định trong suốt quá trình nghiên cứu và không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa so với nhóm đối chứng, cho thấy không xuất hiện độc tính toàn thân đáng kể mặc dù hệ nano biểu hiện hiệu quả kháng ung thư rõ rệt. Ở nhóm đối chứng, khối lượng tăng đều từ 27,40 g lên 32,62 g vào ngày thứ 16, phản ánh sự phát triển bình thường dù khối u tiến triển nhanh. Nhóm ZnO-TA và ZnO-TA@GOx cũng cho thấy xu hướng tăng khối lượng tương tự, dù xuất hiện một số dao động nhẹ ở các thời điểm trung gian nhưng không đáng kể, qua đó cho thấy các vật liệu này an toàn và không gây độc tính toàn thân. Tổng thể, việc không ghi nhận sự sụt giảm khối lượng ở các nhóm điều trị, đặc biệt là ZnO-TA@GOx, chứng minh rằng hệ vật liệu có tính an toàn sinh học tương đối cao trong điều kiện *in vivo*.



**Hình 3.21.** Sự thay đổi khối lượng cơ thể chuột theo thời gian.

Hình ảnh chuột trong thí nghiệm *in vivo* tại thời điểm ngày thứ 16 sau điều trị phản ánh sự khác biệt rõ rệt về kích thước cũng như mức độ tiến triển của khối u giữa ba nhóm: đối chứng (không điều trị), ZnO-TA và ZnO-TA@GOx (**Hình 3.22**). Ở nhóm đối chứng, khối u phát triển mạnh với kích thước lớn, thể hiện qua vùng phồng dưới da rõ rệt và bề mặt da căng, phản ánh sự tăng sinh tế bào u không được kiểm soát. Trong khi đó, ở nhóm điều trị ZnO-TA, kích thước khối u có xu hướng thu nhỏ so với nhóm đối chứng, với vùng sưng giảm và bề mặt da ít bị kéo căng hơn. Tuy nhiên, khối u vẫn hiện diện rõ ràng cho thấy ZnO-TA chỉ ức chế tăng trưởng khối u ở mức độ nhất định. Đáng chú ý, nhóm điều trị ZnO-TA@GOx ghi nhận khối u có kích thước nhỏ nhất trong ba nhóm, với mức độ phồng dưới da giảm đáng kể. Điều này gợi ý hiệu quả kháng u vượt trội của hệ kết hợp ZnO-TA@GOx, có thể liên quan đến cơ chế hiệp đồng giữa tác động gây stress oxy hóa và cạn kiệt glucose tại vi môi trường khối u. Ngoài ra, ở cả ba nhóm, không ghi nhận dấu hiệu loét hoặc hoại tử nghiêm trọng trên bề mặt da tại vị trí khối u. Tình trạng tổng thể của chuột không có biểu hiện suy kiệt rõ rệt, cho thấy các hệ vật liệu sử dụng có tính an toàn sinh học cao. Những kết quả *in vivo* này phù hợp với các dữ liệu độc tính tế bào cũng như các phép thử *in vitro*, qua đó tiếp tục khẳng định tiềm năng điều trị của hệ ZnO-TA@GOx.



Đối chứng

ZnO-TA

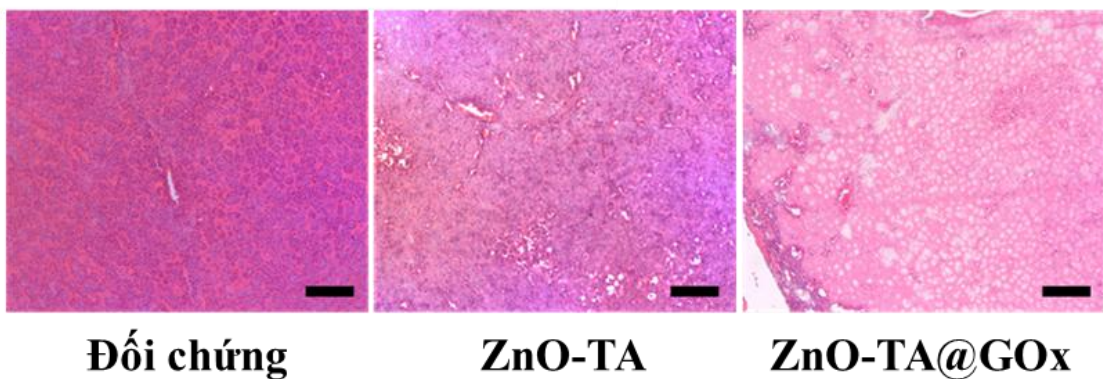
ZnO-TA@GOX

**Hình 3.22.** Hình ảnh chụp của chuột mang khối u ở ngày thứ 16 điều trị.

### 3.6.2. Kết quả nhuộm H&E của khối u trên chuột sau 21 ngày thử nghiệm

Các lát cắt khối u nhuộm H&E được phân tích vào ngày thứ 21 sau điều trị nhằm đánh giá những thay đổi mô bệnh học (**Hình 3.23**). Phân tích so sánh giữa các nhóm cho thấy sự khác biệt rõ rệt về cấu trúc mô và trạng thái tế bào, phản ánh tác động điều trị của các hệ nano lên mô khối u. Cụ thể, ở nhóm đối chứng, mô khối u thể hiện đặc trưng điển hình của tế bào ung thư với cấu trúc dày đặc và mật độ nhân tế bào cao. Các tế bào phân bố sát nhau, nhân bắt màu đậm với hematoxylin do hoạt động tăng sinh và phát triển mạnh của tế bào ung thư. Cấu trúc mô tương đối đồng nhất, không xuất hiện các khoảng trống đáng kể, phản ánh sự phát triển liên tục và không bị ức chế của khối u trong điều kiện không điều trị. Ngược lại, ở các nhóm được xử lý bằng ZnO-TA và ZnO-TA@GOx, cấu trúc mô khối u có sự thay đổi đáng kể. Một trong những đặc điểm nổi bật là sự giảm rõ rệt mật độ nhân tế bào. Các vùng mô không còn duy trì sự sắp xếp chặt chẽ như ở nhóm đối chứng, thay vào đó là sự phân tán thưa thớt của tế bào. Nhân tế bào ở nhiều vị trí bị mờ, co rút hoặc mất hoàn toàn, cho thấy các dấu hiệu điển hình của quá trình chết tế bào. Đặc biệt, trong các mẫu này xuất hiện nhiều khoảng trống lớn, không bắt màu, phân bố rải rác hoặc chiếm diện tích đáng kể trong mô. Những khoảng trống này được xem là dấu hiệu đặc trưng của hiện tượng hoại tử mô, khi các tế bào bị phá hủy và mất đi cấu trúc ban đầu.

Khi so sánh hình ảnh nhuộm tế bào giữa hai hệ vật liệu, hiệu quả gây tổn thương mô của ZnO-TA@GOx có xu hướng rõ rệt hơn so với ZnO-TA. Ở mẫu ZnO-TA, mặc dù có xuất hiện các vùng giảm mật độ tế bào và một số khoảng trống, nhưng cấu trúc mô vẫn còn được duy trì ở một số khu vực. Trong khi đó, ở mẫu ZnO-TA@GOx, các vùng hoại tử chiếm ưu thế với kích thước lớn hơn và mức độ phá vỡ cấu trúc mô nghiêm trọng hơn. Điều này có thể được giải thích bởi cơ chế tác động hiệp đồng của hệ ZnO-TA@GOx, trong đó enzyme GOx xúc tác quá trình oxy hóa glucose tạo ra  $H_2O_2$ , kết hợp với đặc tính xúc tác của ZnO gây phân hủy GSNO góp phần làm tăng tổn thương tế bào ung thư. Sự gia tăng stress oxy hóa nội bào có thể dẫn đến tổn thương màng, biến tính protein và phá hủy DNA, từ đó thúc đẩy quá trình chết tế bào theo hướng hoại tử hoặc theo chương trình. Ngoài ra, sự xuất hiện của các vùng mô bị phá hủy kèm theo giảm mật độ nhân tế bào còn cho thấy khả năng ức chế tăng sinh và tiêu diệt tế bào ung thư của các hệ nano. Đây là một chỉ dấu quan trọng chứng minh hiệu quả điều trị *in vivo*, bởi sự thay đổi mô bệnh học phản ánh trực tiếp mức độ đáp ứng của khối u đối với tác nhân điều trị. Tổng hợp các kết quả quan sát từ hình nhuộm H&E, có thể khẳng định rằng cả hai hệ ZnO-TA và ZnO-TA@GOx đều có khả năng gây ra những biến đổi mô bệnh học đáng kể trên khối u MCF-7, với biểu hiện đặc trưng là giảm mật độ tế bào và xuất hiện các vùng hoại tử. Trong đó, hệ ZnO-TA@GOx cho thấy hiệu quả vượt trội hơn, thể hiện qua mức độ phá hủy cấu trúc mô mạnh hơn và diện tích hoại tử lớn hơn. Những kết quả này cung cấp bằng chứng trực quan và thuyết phục về tiềm năng ứng dụng của các hệ nano này trong điều trị ung thư, đặc biệt là trong việc tiêu diệt tế bào khối u thông qua cơ chế gây bỏ đói và stress oxy hóa.



**Hình 3.23.** Lát cắt mô khối u nhuộm H&E của các nhóm điều trị khác nhau.  
Thanh tỷ lệ: 100  $\mu$ m.

### 3.6.3. Kết quả phân tích huyết học toàn phần của chuột

**Bảng 3.2** trình bày các thông số huyết học toàn phần của chuột tại các thời điểm ngày 0, ngày 6 và ngày 16, cung cấp cái nhìn hệ thống về ảnh hưởng của các hạt nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx lên các chỉ số tế bào máu ngoại vi nhằm đánh giá mức độ an toàn sinh học của vật liệu trong mô hình *in vivo*. Nhìn chung, sau 16 ngày theo dõi, các thông số huyết học giữa nhóm đối chứng và các nhóm xử lý không có khác biệt có ý nghĩa thống kê và các giá trị vẫn nằm trong khoảng giá trị sinh lý. Các giá trị tham chiếu trong điều kiện sinh lý được thu thập từ các nguồn nghiên cứu uy tín [136–141].

Tại thời điểm ban đầu (ngày 0), các nhóm chuột bộc lộ một số dấu hiệu rối loạn huyết học đặc trưng của tình trạng ung thư. Cụ thể, số lượng hồng cầu (RBC) và nồng độ hemoglobin (HGB) ghi nhận ở mức thấp, giảm so với ngưỡng bình thường, trong khi chỉ số RDW tăng, phản ánh tình trạng thiếu máu nhẹ kèm theo sự không đồng nhất về kích thước hồng cầu. Bên cạnh đó, số lượng bạch cầu (WBC) ở mức thấp cận dưới ngưỡng bình thường, nhiều khả năng là hệ quả của quá trình gây suy giảm miễn dịch trước đó. Các chỉ số này tương đồng với các báo cáo về sự biến đổi trong thông số huyết học của bệnh nhân ung thư [142,143]. Điều này cho thấy các cá thể động vật thí nghiệm có trạng thái huyết học tương đối đồng đều trước khi tiến hành điều trị, đảm bảo tính khách quan cho các so sánh ở các thời điểm tiếp theo.

Đến ngày thứ 6 sau điều trị, một số biến động nhẹ được ghi nhận ở các chỉ số bạch cầu và hồng cầu giữa các nhóm. WBC tăng trở lại và nằm trong khoảng bình thường, phản ánh sự phục hồi nhất định của hệ miễn dịch. Song song đó, các chỉ số liên quan đến dòng hồng cầu như RBC, HGB và HCT đều tăng, đặc biệt rõ ở các nhóm điều trị. Sự gia tăng này có thể liên quan đến cơ chế thích nghi của cơ thể đối với các tác nhân điều trị, bao gồm các phản ứng viêm hoặc điều hoà miễn dịch.

Tại thời điểm ngày 16, các chỉ số huyết học giữa các nhóm trở nên tương đồng rõ rệt. WBC ở tất cả các nhóm đều nằm trong hoặc tiệm cận giới hạn trên của khoảng giá trị bình thường, phản ánh trạng thái phục hồi miễn dịch cũng như đáp ứng viêm liên quan đến khối u và quá trình điều trị. Đặc biệt, các nhóm xử lý bằng ZnO-TA và ZnO-TA@GOx có giá trị WBC cao nhẹ hơn so với nhóm đối chứng, cho thấy khả năng cải thiện đáp ứng miễn dịch và trạng thái sinh lý tích cực hơn dưới tác động điều trị của hạt nano. Chỉ số RBC ở hai nhóm

điều trị được cải thiện đáng kể, trong khi RBC ở nhóm đối chứng vẫn duy trì ở mức thấp. Từ đó chứng minh hệ nano không gây ức chế tủy xương, không gây ra tình trạng thiếu máu, hay rối loạn miễn dịch vốn thường thấy ở các bệnh nhân hoá trị [143,144]. Các chỉ số liên quan đến hình thái và chức năng hồng cầu như MCV, MCH và MCHC cũng duy trì ổn định giữa các nhóm, cho thấy kích thước và lượng hemoglobin trong hồng cầu không bị ảnh hưởng đáng kể. Độ phân bố hồng cầu RDW tuy vẫn cao hơn ngưỡng sinh lý nhưng không có sự thay đổi bất thường giữa các thời điểm khảo sát. Kết hợp với các chỉ số máu bình thường khác, sự gia tăng này là dấu hiệu của sự gia tăng đáp ứng viêm hoặc thiếu hụt nhẹ về dinh dưỡng và hàm lượng sắt trong máu [145–147].

**Bảng 3.2.** Phân tích huyết học toàn phần của chuột được điều trị và không được điều trị.

Ngày 0				
Chỉ số	Ngưỡng bình thường	Đối chứng	ZnO-TA	ZnO-TA@GOX
WBC ( $\times 10^3$ tế bào/ $\mu$ L)	2-10	$2,5 \pm 0,57$	$2,93 \pm 0,38$	$2,23 \pm 0,21$
RBC ( $\times 10^6$ tế bào/ $\mu$ L)	7-11	$7,49 \pm 0,59$	$7,62 \pm 0,6$	$7,92 \pm 0,85$
HGB (g/L)	136-164	$112,5 \pm 14,05$	$110,67 \pm 12,5$	$129,33 \pm 16,92$
HCT (%)	35-52	$37,35 \pm 8,56$	$39,7 \pm 2,01$	$32,47 \pm 5$
MCV (fL)	45-55	$45,9 \pm 0,99$	$46,87 \pm 1,72$	$47,6 \pm 1,25$
MCH (pg)	13-17	$13,85 \pm 1,06$	$14,47 \pm 0,49$	$14,31 \pm 0,44$
MCHC (g/L)	300-380	$279 \pm 18,38$	$293,33 \pm 9,07$	$287,67 \pm 18,88$
RDW (%)	11-15	$16,65 \pm 0,49$	$16,17 \pm 0,23$	$15,2 \pm 1,01$
Ngày 6				
Chỉ số	Ngưỡng bình thường	Đối chứng	ZnO-TA	ZnO-TA@GOX
WBC ( $\times 10^3$ tế bào/ $\mu$ L)	2-10	$5,75 \pm 0,74$	$6,6 \pm 1,54$	$5,43 \pm 1,67$
RBC ( $\times 10^6$ tế bào/ $\mu$ L)	7-11	$7,6 \pm 2,18$	$8,56 \pm 2,4$	$9,06 \pm 1,57$
HGB (g/L)	136-164	$122,5 \pm 9,19$	$154 \pm 5,2$	$148 \pm 2,53$
HCT (%)	35-52	$41,4 \pm 6,35$	$47,83 \pm 8,13$	$49,2 \pm 7,6$
MCV (fL)	45-55	$47,3 \pm 2,69$	$49,7 \pm 1,81$	$48,93 \pm 0,06$
MCH (pg)	13-17	$13,15 \pm 0,07$	$14,57 \pm 0,81$	$14,03 \pm 0,96$
MCHC (g/L)	300-380	$302,5 \pm 28,99$	$309,67 \pm 2,52$	$301,67 \pm 16,29$

<b>RDW (%)</b>	11-15	16 ± 1,4	17,83 ± 1	16,9 ± 0,85
<b>Ngày 16</b>				
<b>Chỉ số</b>	<b>Ngưỡng bình thường</b>	<b>Đối chứng</b>	<b>ZnO-TA</b>	<b>ZnO-TA@GOX</b>
<b>WBC</b> (×10 <sup>3</sup> tế bào/μL)	2-10	8,2 ± 1,24	9,33 ± 1,74	10 ± 1,5
<b>RBC</b> (×10 <sup>6</sup> tế bào/μL)	7-11	7,42 ± 1,2	9,57 ± 1,42	8,84 ± 0,41
<b>HGB (g/L)</b>	136-164	143,67 ± 28,28	149 ± 22,85	157 ± 9,54
<b>HCT (%)</b>	35-52	43,6 ± 10,25	47 ± 7,07	48,55 ± 3,21
<b>MCV (fL)</b>	45-55	51,05 ± 2,19	49,93 ± 2,2	49,3 ± 1,4
<b>MCH (pg)</b>	13-17	15,65 ± 1,06	15,23 ± 0,15	15,1 ± 0,52
<b>MCHC (g/L)</b>	300-380	307 ± 7,07	306,33 ± 12,9	307 ± 7,94
<b>RDW (%)</b>	11-15	18,05 ± 0,64	17,8 ± 2,19	17 ± 1,13

Tổng hợp các kết quả phân tích. có thể khẳng định rằng việc xử lý bằng các hệ hạt nano ZnO-TA và ZnO-TA@GOx không gây ảnh hưởng đáng kể đến các chỉ số huyết học ngoại vi sau 16 ngày. Điều này cho thấy các hệ vật liệu có tính tương thích sinh học tốt. không gây độc tính trên hệ tuần hoàn. Đây là một yếu tố quan trọng. góp phần khẳng định tính an toàn và tiềm năng ứng dụng của hệ ZnO-TA@GOx trong điều trị ung thư. đặc biệt trong bối cảnh sử dụng theo đường toàn thân. nơi các tương tác với máu và tủy xương là không thể tránh khỏi.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. KẾT LUẬN

Luận văn đã hoàn thành mục tiêu tổng hợp hệ vật liệu nano ZnO-TA@GOx có các đặc tính nổi bật sau:

- (1) Hạt nano ZnO-TA@GOx có tính tương thích sinh học và khả năng phân tán tốt trong nước. Hạt nano tạo thành có hình cầu đồng nhất với kích thước thủy động học được xác định khoảng 210,9 nm. Kích thước này phù hợp để ZnO-TA@GOx dễ dàng tiếp cận và tích lũy trong khối u bằng hiệu ứng EPR, tránh gây ảnh hưởng đến tế bào lành.
- (2) Hạt nano ZnO-TA@GOx tăng cường hiệu quả điều trị ung thư thông qua cơ chế kết hợp giữa liệu pháp bổ đôi tế bào và sản sinh gốc tự do RONS đã được chứng minh trong các thí nghiệm *in vitro*. Cụ thể, lượng NO và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sản sinh từ phản ứng xúc tác phân hủy GSNO (sau 48 giờ ủ) và glucose (sau 24 giờ ủ) lần lượt là 187  $\mu$ M và 542  $\mu$ M, cao hơn đáng kể so với mẫu đối chứng.
- (3) Hạt nano ZnO-TA@GOx cho thấy độc tính chọn lọc đối với tế bào ung thư MCF-7, tiêu diệt trên 70% tế bào ở nồng độ 400 ppm khi bổ sung glucose, với IC<sub>50</sub> khoảng 100 ppm. ZnO có xu hướng tích lũy ưu tiên và giải phóng ion Zn<sup>2+</sup> trong môi trường pH thấp đặc trưng của khối u, từ đó thúc đẩy hình thành RONS và gây chết tế bào.
- (4) Hạt nano ZnO-TA@GOx ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong mô hình *in vivo* trên chuột mang tế bào ung thư MCF-7. Sau 16 ngày điều trị, thể tích khối u ghi nhận ở nhóm ZnO-TA@GOx là 1285 mm<sup>3</sup>, thấp hơn rõ rệt so với 2784 mm<sup>3</sup> ở nhóm đối chứng.

### 2. KIẾN NGHỊ

Nhìn chung, hệ nano ZnO-TA@GOx cho thấy tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực điều trị ung thư. Tuy nhiên, để hoàn thiện và tối ưu hoá hệ nano, học viên đề xuất các hướng nghiên cứu tiếp theo như sau:

- Đánh giá hoạt lực enzyme GOx và độ ổn định của hệ nano ZnO-TA@GOx theo thời gian nhằm làm rõ khả năng duy trì hiệu quả hoạt động, tính bền vững của hệ nano và tiềm năng ứng dụng trong thực tiễn.
- Nghiên cứu thiết kế hệ nano ZnO-TA@GOx hướng đích chủ động bằng cách gắn thêm các phối tử đặc hiệu lên bề mặt hạt nano nhằm tăng khả

năng nhận diện và tích lũy chọn lọc tại mô ung thư. từ đó nâng cao hiệu quả điều trị và giảm tác động không mong muốn lên tế bào lành.

- Cơ chế gây độc bởi RONS có thể chịu ảnh hưởng bởi đáp ứng thích nghi và hệ thống chống oxy hóa của tế bào ung thư. Do đó, nghiên cứu phát triển hệ nano ZnO-TA@GOx bao gói thêm thuốc chống ung thư (ví dụ Doxorubicin, Cisplatin...) là hướng đi tiềm năng nhằm nâng cao hiệu quả điều trị hiệp đồng.
- Nghiên cứu đánh giá tác động của hệ nano ZnO-TA@GOx trong việc làm suy giảm glutathione nội bào trên tế bào ung thư nhằm tăng cường stress oxy hóa và góp phần nâng cao độ nhạy của tế bào ung thư đối với hóa trị liệu.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Thi P. Le. Cao V. Du. Hoang K. H.. Nguyen H. D.. Hoang A. Q.. Nguyen D. T.. Hoang M. H.. Nguyen T. P.. 2026. Synergistic Antitumor Efficacy of Zinc Oxide Nanocomposite via the Glucose Depletion and Reactive Oxygen/Nitrogen Species Generation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 745. pp. 140646. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2026.140646>.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 745 (2026) 140646



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/colsurfa](http://www.elsevier.com/locate/colsurfa)



### Synergistic antitumor efficacy of zinc oxide nanocomposite via the glucose depletion and reactive oxygen/nitrogen species generation

Phuong Le Thi<sup>a,b,\*</sup>, Van Du Cao<sup>c</sup>, Kim Huong Hoang<sup>b</sup>, Hoang Duy Nguyen<sup>b</sup>, Anh Quan Hoang<sup>b</sup>, Dinh Trung Nguyen<sup>d,e</sup>, Minh Hien Hoang<sup>f</sup>, Thanh Phu Nguyen<sup>d,e,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>b</sup> Institute of Advanced Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City 70000, Vietnam

<sup>c</sup> Faculty of Pharmacy, Lac Hong University, Dong Nai 76000, Vietnam

<sup>d</sup> Institute of Research and Development, Duy Tan University, Da Nang, Vietnam

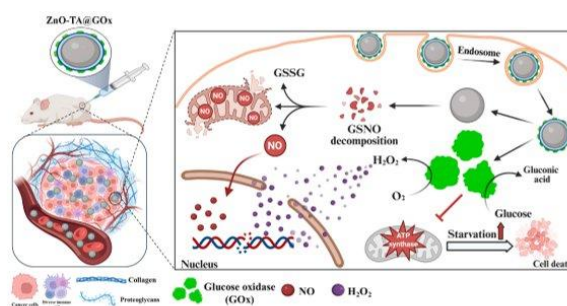
<sup>e</sup> School of Engineering & Technology, Duy Tan University, Da Nang, Vietnam

<sup>f</sup> Asan Institute for Life Sciences, Asan Medical Center, Seoul, Republic of Korea

#### HIGHLIGHTS

- ZnO nanoparticles were functionalized with tannic acid and glucose oxidase for dual therapy.
- The ZnO-TA@GOx nanocomposite combined oxidative stress and starvation therapy synergistically.
- Structural integrity was confirmed by FTIR, XRD, and SEM analyses.
- ZnO-TA@GOx showed selective cytotoxicity toward MCF-7 cells than normal fibroblasts.
- ZnO-TA@GOx effectively suppressed tumor growth with excellent biocompatibility *in vivo*.

#### GRAPHICAL ABSTRACT



#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Zinc oxide  
Nanocomposite  
Starvation therapy  
Reactive oxygen/nitrogen species  
Anticancer therapy

#### ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) exhibit promising anticancer potential but still face limitations, including insufficient tumor selectivity, possible toxicity to normal tissues, and rapid systemic clearance. To overcome these challenges, we developed a biocompatible, tumor-selective ZnO-based nanocomposite that integrates RONS-mediated oxidative stress with starvation therapy. Specifically, ZnO NPs (~200 nm) were synthesized and stabilized with tannic acid (TA), followed by immobilization of glucose oxidase (GOx) onto the ZnO-TA surface to introduce starvation-inducing functionality. The structural and morphological features of NPs were characterized using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM). The resulting ZnO-TA@GOx nanocomposite simultaneously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO, significantly enhancing cancer cell apoptosis through oxidative stress-induced damage. *In vitro* assays demonstrated selective

\* Corresponding author at: Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam.

\*\* Correspondence to: Institute of Research and Technology, Duy Tan University, Da Nang 55000, Vietnam.

E-mail addresses: [lethiphuong1@tdtu.edu.vn](mailto:lethiphuong1@tdtu.edu.vn) (P.L. Thi), [nguyenthanhphu20@duytan.edu.vn](mailto:nguyenthanhphu20@duytan.edu.vn) (T.P. Nguyen).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2026.140646>

Received 22 February 2026; Received in revised form 15 April 2026; Accepted 25 April 2026

Available online 26 April 2026

0927-7757/© 2026 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

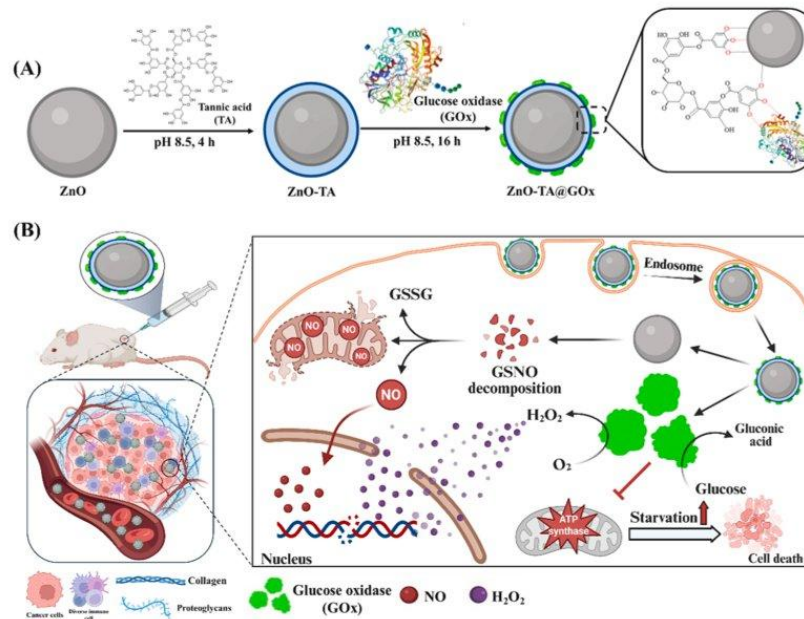
cytotoxicity of ZnO-TA@GOx, showing negligible effects on normal human dermal fibroblasts (hDFBs) while markedly reducing the viability of breast cancer cells (MCF-7), particularly in the presence of glucose. Moreover, in a subcutaneous xenograft mouse model, ZnO-TA@GOx effectively suppressed tumor growth without causing meaningful changes in body weight or hematological parameters over a 2-week treatment period. Overall, ZnO-TA@GOx represents a promising multifunctional nanoplatform for advancing multimodal therapeutic strategies to achieve improved anticancer efficacy.

## 1. Introduction

In recent decades, nanotechnology has rapidly advanced as a promising modality for cancer therapy, addressing the limitations of conventional treatments such as surgery, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy. Nanoparticles—ultrafine particles typically less than 100 nanometers in size—offer significant advantages over traditional therapeutic approaches by providing multifunctionality, efficient drug delivery, and controlled release of therapeutic agents. These benefits arise from their unique physicochemical properties, including minimal dimensions, distinct chemical composition, high surface area, and the ability to be engineered with tailored shapes and morphologies. Furthermore, nanomaterials can function as both cytotoxic agents and enhancers of standard chemotherapies by reducing the adverse side effects associated with conventional drugs, extending their circulation time in the bloodstream, and preventing premature drug degradation before reaching the target site. In particular, metallic nanoparticles are especially attractive compared to polymeric and lipid-based nanoparticles due to their narrow size and shape distributions, prolonged activity, dense surface functionalization, and responsiveness to external stimuli such as heat, light, and magnetic fields, therefore collectively rendering them advantageous for innovative cancer management

strategies [1–3]. Among them, zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) hold great promise as innovative anti-tumor agents due to their excellent biocompatibility and selective cytotoxicity towards cancer cells [4–6]. Furthermore, the inherent photocatalytic and luminescent properties of ZnO NPs enable their potential integration with other therapeutic modalities, such as radiotherapy, photodynamic therapy, and theranostic approaches [7].

Reactive oxygen and nitrogen species (RONS), including reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), are critical signaling molecules involved in various physiological processes such as cell growth, proliferation, and differentiation [8–10]. While low to moderate levels of RONS contribute to cellular homeostasis, excessive accumulation can lead to oxidative damage of key biomolecules—lipids, proteins, and DNA—ultimately triggering cell death. Over the past decades, RONS-based therapeutic strategies have gained significant attention as potential alternatives to conventional chemotherapy, offering high selectivity and minimal systemic side effects [11–14]. Among ROS, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), and hydroxyl radicals ( $\bullet OH$ ) have demonstrated potent cytotoxic effects against cancer cells. Similarly, nitric oxide (NO), the most extensively studied RNS, exhibits diverse biological activities that support its role in cancer therapy. At controlled concentrations, both ROS and NO can



**Scheme 1.** Schematic illustration to describe the construction of ZnO-TA@GOx NPs for synergistic anticancer effects. (A) Synthetic route of ZnO-TA@GOx NPs. ZnO-TA NPs was first synthesized through the redox reaction between the galloyl groups of TA and ZnO. Then, GOx was conjugated on the surface of NPs via the interactions of the aromatic rings of TA and GOx, to yield ZnO-TA@GOx NPs. (B) ZnO-TA@GOx NPs were accumulated in the tumors via the EPR effect, then triggered the release of  $H_2O_2$  and NO based on the GOx-catalyzed decomposition reaction of glucose and the ZnO-mediated decomposition of endogenous donor S-nitrosoglutathione (GSNO), respectively.

induce apoptosis, suppress tumor cell proliferation, and enhance the efficacy of standard treatments such as chemotherapy and radiotherapy. Their capacity to modulate the tumor microenvironment, inhibit angiogenesis, and sensitize cancer cells to oxidative stress underscores their therapeutic potential. Furthermore, the development of RONS-releasing nanocarriers has enabled precise delivery and controlled release, thereby reducing off-target toxicity and enhancing therapeutic outcomes. Notably, the elevated intracellular ROS levels in cancer cells have been proposed as a key mechanism underlying the selective cytotoxicity of ZnO NPs [4]. Upon exposure to ZnO NPs, cancer cells tend to generate higher levels of ROS compared to normal cells, leading to pronounced oxidative stress and subsequent cell death.

In addition to the RONS-mediated cancer killing strategies, cancer starvation therapy has emerged as a promising strategy by targeting the nutrient supply essential for tumor growth and survival. Unlike conventional therapies that aim to directly eliminate cancer cells, starvation therapy disrupts key metabolic pathways—including glucose, amino acid, and lipid metabolism—on which cancer cells are highly dependent due to their elevated proliferative demands. Among these approaches, the enzymatic depletion of intratumoral glucose through glucose oxidase (GOx)-catalyzed oxidation has garnered considerable attention. This reaction converts glucose into gluconic acid and  $H_2O_2$ , leading to both metabolic starvation of cancer cells and elevation of endogenous  $H_2O_2$  levels, thereby enhancing oxidative stress-induced cytotoxicity. Various studies have explored the functionalization of nanocarriers with GOx—such as polymer dots [15], iron-based nanoplateforms [16], mesoporous silica nanoparticles [17], and polymeric nanoparticles [18]—to achieve synergistic anticancer effects through combined starvation and RONS-based therapies. However, the integration of GOx with ZnO NPs, which possess intrinsic catalytic activity for RONS generation, within a single nanoplateform remains largely unexplored. This represents a significant opportunity for developing highly efficient, multi-modal therapeutic systems for enhanced cancer treatment.

In this study, we report, for the first time, the design and development of a multifunctional nanocomposite—denoted as ZnO-TA@GOx nanoparticles (NPs)—exhibiting selective and highly efficient anticancer activity. This system was constructed by integrating ZnO NPs and GOx in one nanoplateform through a two-step synthesis process. Initially, ZnO NPs were synthesized and subsequently functionalized with a tannic acid (TA) coating. In this system, TA serves primarily as a polyphenolic interfacial linker, facilitating the stable immobilization of GOx onto the ZnO surface [19]. The enhanced therapeutic efficacy of the ZnO-TA@GOx nanoplateform is predominantly attributed to the synergistic catalytic activities of its two key components (Scheme 1): (i) GOx catalyzes glucose oxidation, leading to the generation of  $H_2O_2$  while simultaneously inducing glucose depletion in the tumor microenvironment, thereby promoting cancer cell starvation; and (ii) ZnO not only catalytically decomposes endogenous substrates to generate NO under physiological conditions, but also exhibits intrinsic anticancer activity through efficient cellular internalization and subsequent intracellular  $Zn^{2+}$  accumulation, which induces ROS generation and contributes to selective cancer cell cytotoxicity. Characterization by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and dynamic light scattering (DLS) revealed that ZnO-TA@GOx NPs possess a uniform spherical morphology with a narrow size distribution. *In vitro* experiments demonstrated that the system effectively induced cancer cell death through the controllable release of  $H_2O_2$  and NO in conjunction with glucose depletion. Furthermore, *in vivo* evaluation using a subcutaneous xenograft mouse model confirmed the excellent biocompatibility and potent antitumor efficacy of ZnO-TA@GOx NPs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Zinc nitrate hydrate ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ), tannic acid (TA), glucose

oxidase (from *Aspergillus niger*, type VII,  $\geq 100,000$  units/g solid), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , 30% w/w in  $H_2O$ ), Griess reagent (modified) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Penicillin–streptomycin (P/S), trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (TE), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), and Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). The EZ-Cytox enhanced cell viability assay kit (WST-1 assay reagent) was purchased from ITS BIO (Seoul, South Korea). Live/dead viability/cytotoxicity kit was obtained from Invitrogen (California, USA). Other chemicals and solvents were used without further purification.

### 2.2. Synthesis of ZnO-TA@GOx NPs

Zinc oxide (ZnO) nanoparticles were synthesized and stabilized with tannic acid (TA). Briefly, 6 g of  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  was dissolved in 50 mL of Tris buffer (pH 8.5) and vigorously stirred at 60 °C for 30 min. After reaching a stable temperature, 50 mL of TA solutions with concentrations of 2, 4, and 6 mg/mL were added dropwise to the solution and reacted for 6 h. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and the Tris buffer was removed by centrifuging at 10,000 rpm for 5 min. The particles were washed three times with deionized water (DIW) to remove all the unreacted agents. Finally, the particles were dried in a vacuum oven at 90 °C overnight to produce a pale brown ZnO-TA powder.

For GOx conjugation, 40 mg of ZnO-TA was dissolved in 20 mL of Tris buffer (pH 8.5). To this solution, GOx was added with final concentrations of 0.5, 1, and 2 mg/mL. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, subsequently centrifuged at 10,000 rpm for 5 min to obtain the particles. The resultant ZnO-TA@GOx NPs were washed 3 times with DIW to remove the free GOx, and then were lyophilized and stored until use.

### 2.3. Characterization of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs

UV-Vis spectrophotometry was used to determine the conjugation degree of TA on the surface of ZnO-TA NPs. The TA content was calculated from a standard curve obtained from a known concentration range (4–20 ppm) at 275 nm. The conjugation of GOx was determined using the Micro BCA protein kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA), following the manufacturer's protocol. In brief, 100  $\mu$ L of ZnO-TA@GOx NPs (1 mg/mL) was mixed with 100  $\mu$ L working reagent in a 96-well plate (volume ratio of Reagent A: B: C = 25:24:1). The reaction mixture was incubated in the dark at 37 °C for 2 h and the maximum absorbance was measured at 562 nm using a microplate reader (Multiskan EX, Thermo Scientific, USA). Simultaneously, the GOx content was calculated from a calibration curve obtained by measuring the absorbance of a concentration range of GOx (4–20 ppm).

The chemical structure of ZnO-TA and ZnO-TA-GOx NPs was also determined by FT-IR spectroscopy. The size and morphology of NPs were determined by using transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscope (SEM). The zeta potential of the particles was measured using electrophoretic light scattering (ELS) with a zeta potential analyzer. In addition, XRD was also performed to evaluate the crystal structure and the chemical components of NPs.

### 2.4. *In vitro* glucose-responsive and $H_2O_2$ generation of ZnO-TA@GOx NPs

The enzymatic activity of GOx was investigated based on its ability to catalyze the oxidation of glucose to gluconic acid and  $H_2O_2$ . The release behavior of  $H_2O_2$  from NPs was quantified by a Quantitative Peroxide Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA). In brief, ZnO-TA@GOx NPs with different concentrations (250, 500, and 1000 ppm) were incubated with 1 mL of PBS solution with and without the addition

of glucose (4.5 mg/mL). At the predetermined time intervals, 10  $\mu$ L of supernatant was withdrawn and mixed with 100  $\mu$ L of working reagent in a 96-well plate (volume ratio of Reagent A: B = 1:100). Then, the mixture was incubated at room temperature for 15 min before measuring the absorbance at 595 nm using a microplate reader. The amount of released  $H_2O_2$  was calculated from a calibration curve prepared with known  $H_2O_2$  concentrations (0–50  $\mu$ M). Additionally, the  $H_2O_2$  release behavior from ZnO-TA NPs was also assessed as the control sample. The glucose solution (4.5 mg/mL) was re-supplemented every 24 h. The effect of immobilized GOx concentration on  $H_2O_2$  release behaviors was assessed in a similar way, by fixing the ZnO-TA@GOx at 1000 ppm

The glucose consumption ability of ZnO-TA@GOx NPs was assessed through the generation of gluconic acid (reflected by pH). Briefly, the ZnO-TA@GOx (200  $\mu$ g/mL) was incubated with the PBS solution containing different concentrations of glucose (4.5 and 10 mg/mL). The mixture solution was reacted under gentle stirring at 37  $^{\circ}$ C. At the predetermined time intervals, the pH of reacted solution was measured by a pH meter. The ZnO-TA NPs was used as a control sample.

### 2.5. In vitro catalytic NO generation

The NO release amount was measured by Saville-Griess reagent as described in previous studies. The ZnO-TA@GOx NPs was dissolved in PBS solution (250 – 1000 ppm) in the absence/presence of NO donors (GSNO 10  $\mu$ M and GSH 10  $\mu$ M). The mixture solution was incubated at 37  $^{\circ}$ C in the dark under gentle stirring. At the predetermined time intervals, 75  $\mu$ L of the medium was withdrawn and mixed with 75  $\mu$ L of Griess solution (40 g/L). After 15 min of incubation at room temperature in dark, the absorbance of the reacted solution was read at 540 nm by a microplate spectrophotometer (VersaMax Tunable Microplate reader, Molecular Devices, USA). The concentration of NO generated from ZnO-TA@GOx was calculated from a standard curve prepared in a similar way, using  $NaNO_2$  at known concentrations in the range of 0 – 1  $\mu$ M. The NO donor solutions (GSNO 10  $\mu$ M and GSH 10  $\mu$ M) were re-supplemented every 4 h.

### 2.6. In vitro cytotoxicity and hemocompatibility of NPs

The cytotoxicity of ZnO-TA@GOx NPs was evaluated towards both normal cells (hDFBs) and cancer cells (MCF-7) at different concentrations of NPs (100–500 ppm). Briefly, hDFBs and MCF-7 cells were pre-cultured in a 96-well plate (at a density of  $10^4$  cells/well) with 200  $\mu$ L of DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S at standard conditions (37  $^{\circ}$ C, 5%  $CO_2$ ). After 24 h of incubation, the media were removed and cells were incubated with culture media containing either ZnO-TA or ZnO-TA@GOx for further 24 h. The media were added with glucose (4.5 mg/mL) and NO donors (GSNO 10  $\mu$ M and GSH 10  $\mu$ M). The cells treated with pure culture media were included as the control samples. The WST-1 assay kit was used to quantify the cell viability, according to the manufacturer's instructions and our previous studies. The treated cells were incubated with the media containing 10% (v/v) WST-1 in an incubator for 30 min, and the light absorbance of the reacted solution was subsequently recorded at 450 nm. The cytotoxicity of samples was determined as the percentage of cell viability, using the following equation:

$$\% \text{Cell viability} = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{control}} - OD_{\text{blank}}} \times 100$$

Where  $OD_{\text{sample}}$  and  $OD_{\text{control}}$  are the optical absorbance of cells treated with media in the presence/absence of NPs, respectively.  $OD_{\text{blank}}$  represents the optical absorbance of pure DMEM.

The cellular morphology and viability were also investigated by a Live/Dead assay kit. After treating with samples, cells were incubated with 100  $\mu$ L of PBS solution containing 2  $\mu$ M calcein-AM (the aceto-methoxy derivative of calcein) and 4  $\mu$ M ethidium homodimer-1

(EthD-1) for 15 min. Then, the fluorescence microscope (Nikon, Japan) was used for observation.

The hemocompatibility of NPs was also assessed by hemolysis assay. In short, the whole blood samples of mice were collected in heparin-coated tubes, followed by centrifugation at 1000 rpm for 10 min to obtain the erythrocytes. The erythrocyte samples were diluted 50-fold with PBS buffer (pH 7.4). In a 1.5 mL microtube, 200  $\mu$ L of NPs (100 – 400 ppm) was mixed with 800  $\mu$ L of erythrocyte suspension, and the mixture was incubated at 37  $^{\circ}$ C for 1 h. Afterwards, the reacted samples were centrifuged at 2500 rpm at 5 min, and the absorbance (A) of the supernatant was recorded at 540 nm. Triton X-100 (0.1%) and PBS were used as the positive control and the negative control, respectively. The hemolysis rate was calculated as following:

$$\text{Hemolysis ratio}(\%) = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{negative}}}{OD_{\text{positive}} - OD_{\text{negative}}}$$

Where  $OD_{\text{sample}}$ ,  $OD_{\text{negative}}$ , and  $OD_{\text{positive}}$  are the optical absorbance of red blood cells treated NPs, PBS and Triton X-100, respectively.

### 2.7. Zinc accumulation assay

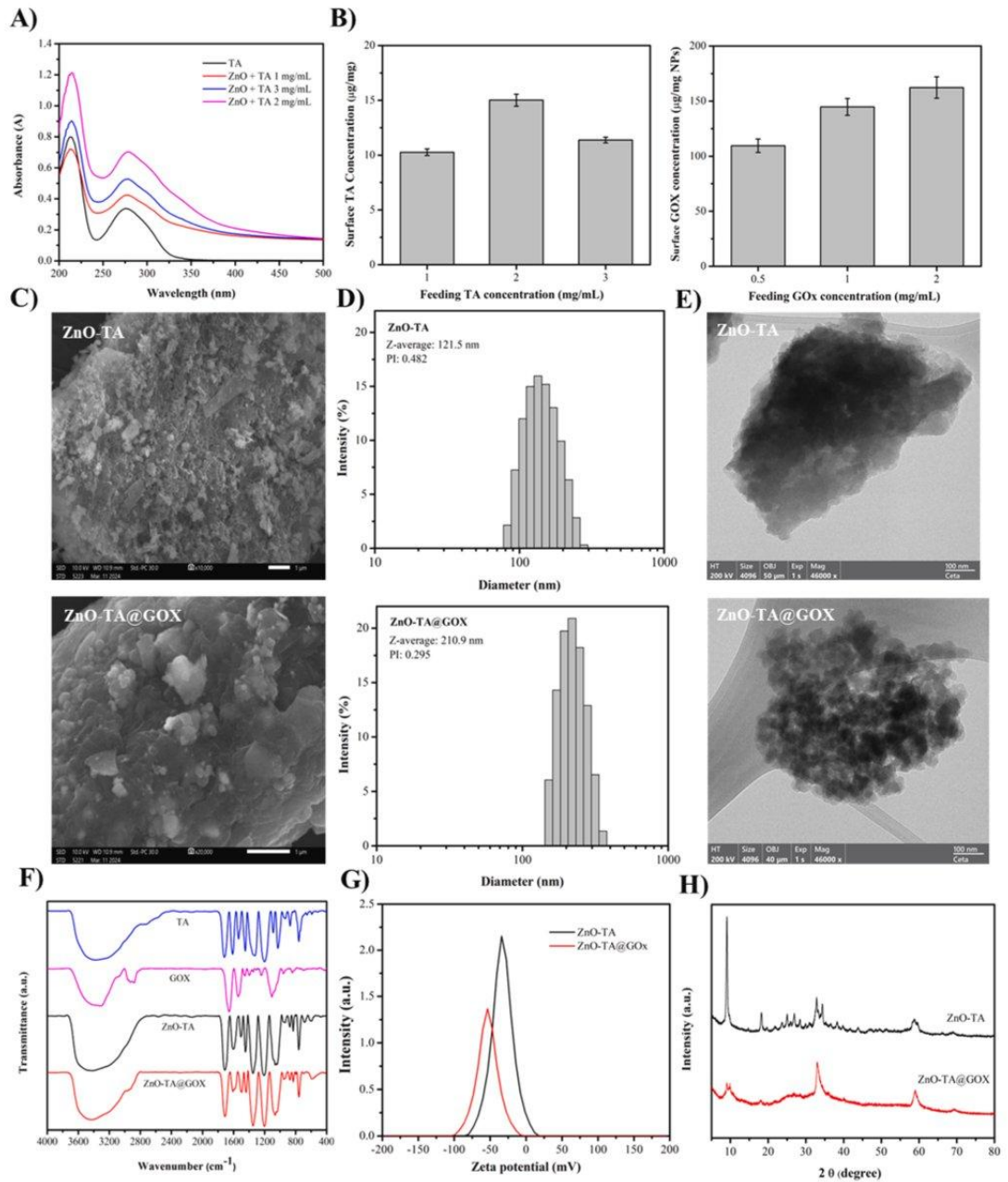
The zinc accumulation in the normal/cancer cells was investigated by quantitative zinc assay kit. Briefly, MCF-7 cancer cells and hDFB normal cells were incubated with different concentrations of ZnO-TA@GOx NPs (100–400 ppm). After 8 h of culture in the incubator (37  $^{\circ}$ C, 5%  $CO_2$ ), the media were removed and cells were rinsed 3 times with PBS. Then, cells were collected and treated with EDTA-free lysis buffer. 50  $\mu$ L of samples were transferred to a 96-well plate, subsequently added with 200  $\mu$ L of zinc reaction mix, following the manufacturer's protocols. The mixtures were incubated for 10 min at room temperature, and the absorbance of the reacted solution was read at 560 nm by a microplate reader. The concentration of zinc in each sample was calculated from a standard curve prepared from a series of zinc standard solutions (0–5 nmol)

### 2.8. Intracellular ROS generation

The effect of NPs on the intracellular ROS generation of normal (hDFBs) and cancer (MCF-7) cells was evaluated using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Briefly, hDFBs and MCF-7 cells ( $3 \times 10^4$  cells/mL) were seeded in 24-well plates and cultured in the incubator (37  $^{\circ}$ C, 5%  $CO_2$ ) for 24 h. The culture medium was then removed, and the cells were treated with different formulations, including ZnO-TA, ZnO-TA@GOx, and ZnO-TA@GOx supplemented with glucose (4.5 mg/mL), at an equivalent concentration of 400 ppm for 6 h. Cells without any treatment were used as the control group. After incubation, the medium was aspirated, and the cells were washed three times with PBS to remove excess samples. The cells were then incubated with DCFH-DA (10  $\mu$ M) at 37  $^{\circ}$ C for 30 min in the dark. Subsequently, the cells were washed gently with PBS to eliminate excess probe. The fluorescence intensity, corresponding to intracellular ROS levels, was observed using a fluorescence microscope.

### 2.9. In vivo tumor inhibition

All animal experiments were performed according to the protocol approved by the Animal Care and Use Committee of Tra Vinh University (118/GCN.ĐC-HĐĐĐ). C57BL/6 male mice (6–8 weeks old) were rendered immunosuppressed by intraperitoneal administration of cyclophosphamide (50 mg/kg body weight). Subsequently, tumor xenografts were established in the immunosuppressed mice by subcutaneous injection of MCF-7 cancer cells ( $10^6$  cells/mL). When the tumor sizes reached approximately 200  $mm^3$ , the MCF-7 tumor-bearing mice were randomly separated into three groups (n = 6 per group): (i) control with no treatment, (ii) ZnO-TA NPs, and (iii) ZnO-TA@GOx NPs. Then, the mice received intratumoral injection with 5 mg  $kg^{-1}$  of ZnO-TA NPs



**Fig. 1.** Characterization of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs. (A) UV-Vis spectra were performed to characterize and determine the TA content of ZnO-TA NPs. (B) Effect of TA and GOx feeding concentrations on the conjugation degree. The size and morphology of NPs were performed by (C) SEM, (D) DLS and (E) TEM images. (F) The chemical structure of NPs was characterized by the FT-IR. (G) Zeta potential distribution and (H) XRD patterns of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs.

or ZnO-TA@GOx NPs twice a week, for 3 weeks. At the predetermined time intervals, the body weights of mice were monitored and the tumor sizes were measured using a caliper. The tumor volume ( $\text{mm}^3$ ) was calculated according to the following equation:

$$\text{Tumor volume} = \frac{\text{tumor length} \times (\text{tumor width})^2}{2}$$

At the end of the 16-day period, all the mice were sacrificed and the tumors were excised for histopathological analysis. The blood physiological indicators with respect to each treatment were recorded on day 16. The digital images of tumor regions for each treatment were also taken on day 16

### 2.10. Statistical analysis

Each experiment in this study was conducted in triplicate. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD), and graphical representations were generated using Origin 2018 software (OriginLab Corporation, USA). Statistical analyses were performed using Student's *t*-test (unpaired, two-tailed), or one-way/two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. A *p*-value of less than 0.05 was considered indicative of statistical significance

## 3. Results and discussions

### 3.1. Synthesis and characterization of ZnO-TA@GOx NPs

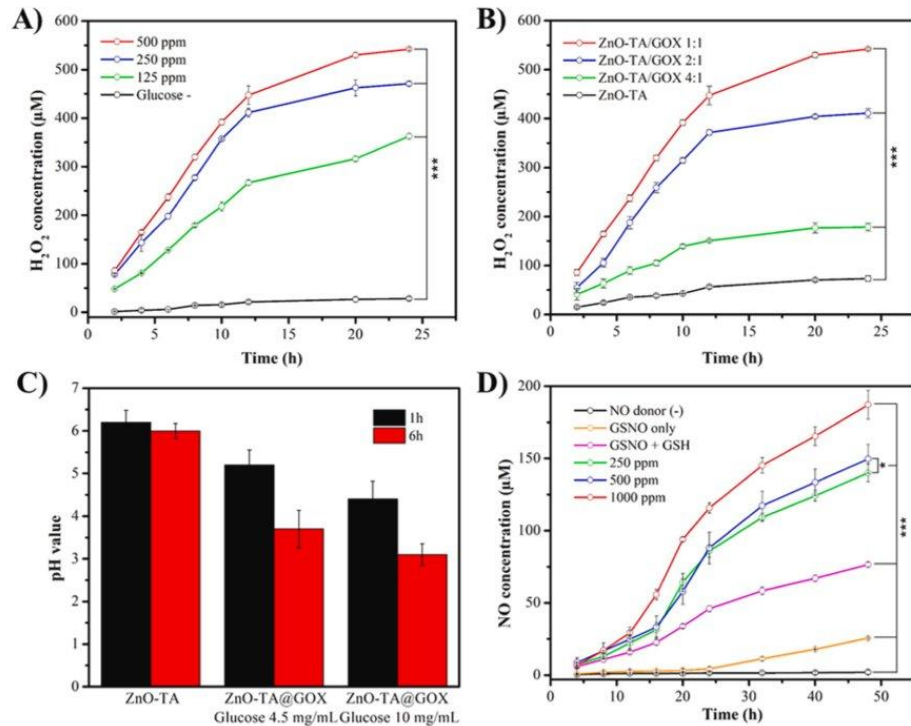
The process for synthesis and functionalization of ZnO NPs with TA and GOx is illustrated in Scheme 1. In this approach, TA was employed as a primary reactive coating, enabling the immobilization of GOx onto the ZnO surface through multiple interaction mechanisms, including covalent bonding, hydrogen bonding, and hydrophobic interactions. The UV-Vis spectra of ZnO-TA synthesized with different concentrations of TA are presented in Fig. 1A. All samples (1 mg/mL dissolved in DIW) exhibited two distinct absorption peaks at 213 and 275 nm, which can be attributed to the  $\pi$ - $\pi^*$  and  $n$ - $\pi^*$  transitions of the galloyl moieties in the TA structure [20–22]. In addition, a shoulder peak was observed at approximately 340 nm, indicating the formation of ZnO NPs [23–25]. Among the tested conditions, ZnO-TA prepared with a final TA concentration of 2 mg/mL displayed the highest absorbance intensity, suggesting the greatest degree of TA conjugation on the ZnO surface. Quantitative analysis confirmed that increasing the TA concentration from 1 to 2 mg/mL enhanced the conjugation degree from 6  $\mu\text{M}$  to 8.8  $\mu\text{M}$  (Fig. 1B). However, a further increase to 3 mg/mL resulted in a significant reduction of the conjugation degree to 6.7  $\mu\text{M}$ , likely due to saturation effects or steric hindrance during the binding process. Based on these findings, 2 mg/mL TA was considered as the optimal concentration for subsequent studies. The amount of GOx immobilized on the surface of ZnO-TA@GOx was subsequently determined using the BCA assay. As shown in Fig. 1B, the immobilized GOx content exhibited a concentration-dependent increase with the initial GOx input. Notably, at 2 mg/mL, the highest enzyme loading was achieved, corresponding to 162.31  $\mu\text{g}$  of GOx per mg of nanoparticles. This result emphasizes the critical role of the TA coating in facilitating covalent interactions with the nucleophilic amine groups of GOx. Furthermore, it demonstrates that the immobilization efficiency can be effectively controlled by adjusting the initial GOx concentration, thereby providing a straightforward approach to modulating enzyme loading on the surface of nanoparticles.

The surface morphology of the ZnO NPs was investigated using scanning electron microscopy, as shown in Fig. 1C. While ZnO-TA sample exhibited a rough, porous surface consisting of aggregated particle clusters, ZnO-TA@GOx displayed a smoother and more homogeneous morphology, characterized mainly by spherical particles with fewer distinguishable crystalline features. This morphological change can be attributed to the successful immobilization of GOx, which

provides a coating layer over the ZnO-TA nanoparticles. Dynamic light scattering analysis further supported these findings (Fig. 1D). The hydrodynamic diameter of ZnO-TA was measured to be 121.5 nm with a relatively high polydispersity index (PDI = 0.482). Following GOx conjugation, the average particle size increased to 210.9 nm, while the PDI decreased to 0.295. The increase in size reflects the formation of an enzyme shell around the nanoparticles, whereas the reduction in PDI indicates improved size uniformity and enhanced colloidal stability of the ZnO-TA@GOx system. Furthermore, TEM images revealed that ZnO-TA@GOx nanoparticles exhibited a highly uniform morphology with well-dispersed spherical structures ( $\sim 30$  nm), in contrast to the aggregated clusters observed for ZnO-TA (Fig. 1E). Collectively, these results confirm that GOx immobilization not only modulates nanoparticle morphology but also significantly enhances their dispersibility in aqueous media. Notably, the formation of uniformly small-sized nanoparticles is highly beneficial for tumor-targeted drug delivery via the enhanced permeability and retention (EPR) effect [26]. Herein, our ZnO-TA@GOx within this size range can effectively extravasate through the leaky vasculature of tumor tissues and be retained due to deficient lymphatic drainage. In addition, the improved size uniformity contributes to more predictable biodistribution and pharmacokinetic behavior, thereby enhancing passive targeting efficiency and highlighting the promising potential of the ZnO-TA@GOx nanosystem for cancer therapy.

FTIR analysis was performed to verify the structural features of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx (Fig. 1F). The ZnO-TA spectrum displayed characteristic bands of ZnO in the 600–700  $\text{cm}^{-1}$  region, corresponding to Zn–O and Zn–OH stretching vibrations, thereby confirming the formation of ZnO nanoparticles [27–29]. A broad band between 3000–3700  $\text{cm}^{-1}$ , with a maximum around 3400  $\text{cm}^{-1}$ , was assigned to O–H stretching vibrations of phenolic hydroxyl groups in TA. Additional signals, including a distinct band at 1710  $\text{cm}^{-1}$  and multiple bands in the 1350–1100  $\text{cm}^{-1}$  region, were attributed to C=O and C–O–C stretching of ester linkages, while aromatic ring vibrations (1450–1600  $\text{cm}^{-1}$  for C=C stretching and 680–900  $\text{cm}^{-1}$  for =C–H bending) further confirmed TA conjugation to ZnO, likely through hydrogen bonding with surface hydroxyls [30,31]. The ZnO-TA@GOx spectrum retained both ZnO and TA-specific signals, while also exhibiting new absorption features characteristic of proteins. A strong band at 1710  $\text{cm}^{-1}$  corresponded to the amide I region (C=O stretching), whereas signals in the 1583–1607  $\text{cm}^{-1}$  range were assigned to the amide II band (N–H bending and C–N stretching), partially overlapping with aromatic C=C vibrations. Furthermore, C–H stretching vibrations in the 2800–3000  $\text{cm}^{-1}$  range indicated the presence of aliphatic residues from GOx [32–34].

The zeta potential of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs dispersed in DIW was measured to evaluate the surface charge and colloidal stability. As illustrated in Fig. 1G, ZnO-TA NPs showed a negative zeta potential of approximately  $-30 \pm 4.4$  mV, attributed to the presence of phenolic hydroxyl (–OH) groups from tannic acid on the nanoparticle surface. After GOx immobilization, the zeta potential decreased significantly from  $-30 \pm 4.4$  mV to  $-57.8 \pm 6.4$  mV. The greater negative charge of ZnO-TA@GOx can be explained by the isoelectric point of glucose oxidase. In particular, the pI of GOx was reported at around 4.2 and the pH value of distilled water is typically higher than this value (pH = 7). This condition leads to the deprotonation of ionizable amino acid residues on the enzyme surface, resulting in a net negative charge of the enzyme [35–37]. Many studies have demonstrated that zeta potential values exceeding  $\pm 30$  mV represent colloid stability, whereas lower values are typically associated with particle aggregation and instability [38–40]. According to this criterion, both ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs showed good stability in aqueous media. The increased negative surface charge after GOx immobilization enhances the electrostatic repulsion between particles, reducing aggregation and highlighting the role of GOx in improving the stability of the NPs. Taken together, these findings confirmed the successful immobilization of GOx onto TA-coated ZnO



**Fig. 2.** *In vitro* generation of  $H_2O_2$  as the function of (A) NPs concentration and (B) conjugation degree of GOx. (C) The change of pH values as a result of reaction between ZnO-TA@GOx NPs and different concentrations of glucose. (D) The in situ NO generation arising from the reaction between different concentrations of ZnO-TA@GOx NPs and NO donors (GSNO 10  $\mu$ M and GSH 10  $\mu$ M).

nanoparticles, mediated by hydrogen bonding or covalent interactions between TA functional groups and the enzyme. Notably, the simultaneous retention of TA and Zn–O peaks with the emergence of amide bands highlights the dual functionality of the TA coating, which not only anchors onto the ZnO surface but also provides reactive sites for enzyme conjugation, thereby enhancing the structural stability and bio-functionality of the hybrid nanomaterial.

The crystalline structures of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx nanoparticles were characterized by XRD spectra (Fig. 1H). The ZnO-TA sample exhibited sharp diffraction peaks at  $2\theta \approx 32^\circ$ ,  $34.4^\circ$ ,  $36.2^\circ$ ,  $47.5^\circ$ ,  $56.6^\circ$ ,  $62.8^\circ$ , and  $67.9^\circ$ , which were indexed to the (100), (002), (101), (102), (110), (103), and (112) planes of the hexagonal wurtzite structure of ZnO [28,41]. The most prominent reflection at  $34.4^\circ$  ((002) plane) and  $36.2^\circ$  ((101) plane) confirmed the high crystallinity of the ZnO material [42,43]. The preservation of these characteristic peaks after TA conjugation indicates that the polyphenol coating does not disrupt the intrinsic ZnO lattice, suggesting that the surface functionalization occurs without affecting the underlying crystal structure. For ZnO-TA@GOx, the overall XRD pattern retained the wurtzite ZnO signature but displayed markedly reduced peak intensity and sharpness, especially at  $2\theta \approx 31.7^\circ$ ,  $34.4^\circ$ , and  $36.2^\circ$ . In addition, the background became broader and more diffuse in the 10–30° region, indicative of an amorphous contribution arising from the enzyme layer. These observations suggest that GOx immobilization partially masks the crystalline surfaces of ZnO-TA without altering its core lattice. The absence of new diffraction peaks further confirms that the enzyme coating does not induce secondary crystalline phases. Collectively, these results demonstrate that while TA functionalization preserves the crystalline integrity

of ZnO, subsequent enzyme immobilization primarily influences the surface properties by introducing an amorphous organic layer. This structural stability is crucial for maintaining ZnO's intrinsic physico-chemical properties while simultaneously imparting biofunctionality through enzyme conjugation.

### 3.2. *In vitro* glucose-responsive and $H_2O_2$ release behaviors of ZnO-TA@GOx NPs

The starvation therapy potential of ZnO-TA@GOx NPs was evaluated by quantifying  $H_2O_2$  generation, using a peroxide assay kit. As presented in Fig. 2A,  $H_2O_2$  levels significantly increased in the glucose-treated groups (4.5 mg/mL) compared to the control. After 24 h of incubation,  $H_2O_2$  concentrations ranged from 362 to 542  $\mu$ M as the concentration of NPs increased from 125 to 500 ppm. These findings confirm that the immobilized GOx retained its catalytic activity, which effectively oxidized glucose and generated  $H_2O_2$ . To further investigate the role of enzyme loading, the effect of GOx concentration on the catalytic performance of ZnO-TA@GOx NPs was assessed (Fig. 2B). The results revealed a direct correlation between the initial GOx amount used during synthesis and the amount of produced  $H_2O_2$ . Specifically, when the GOx/ZnO-TA ratio was 1:4 (10 mg of GOx), the  $H_2O_2$  concentration reached only 178  $\mu$ M, while a 1:1 ratio (40 mg of GOx) yielded up to 542  $\mu$ M after 24 h. The increased  $H_2O_2$  production is attributable to the higher density of immobilized GOx on the nanoparticle surface, which accelerated glucose oxidation.

The pH value during the reaction was monitored using a pH meter. The results (Fig. 2C) indicated that the pH of the ZnO-TA@GOx and

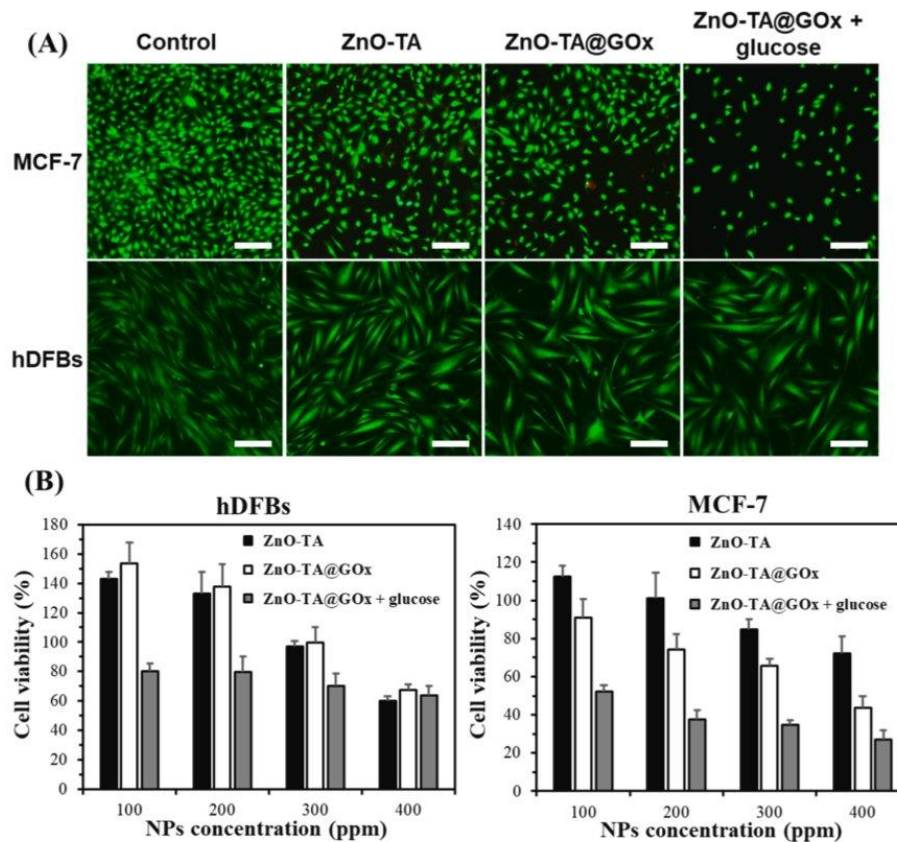


Fig. 3. Biocompatibility of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs. (A) Live (green)/dead (red) assay and (B) WST-1 quantitative cytotoxicity assay of normal cells (hDFBs) and cancer cells (MCF-7) exposed to different concentrations of NPs.

glucose-containing solutions decreased significantly compared to the ZnO-TA control sample. Specifically, at a glucose concentration of 4.5 mg/mL, the pH dropped from 6.1 to 4.4 after 6 h of incubation, reflecting the generation of gluconic acid during glucose oxidation. When the glucose concentration was increased to 10 mg/mL, the pH decreased even more rapidly, from 6.1 to 3.7 within just 1 h of incubation, and further declined to 3.1 after 6 h. These results confirm that ZnO-TA@GOx NPs exhibit substrate concentration-dependent catalytic activity in glucose oxidation. Taken together, these results demonstrate that ZnO-TA@GOx NPs effectively deplete glucose while producing substantial amounts of  $H_2O_2$ , thereby exhibiting a dual mechanism for starvation therapy. Moreover, the catalytic rate can be modulated by tuning either the nanoparticle concentration or the amount of immobilized enzyme. The synergistic combination of glucose depletion and localized ROS generation highlights the strong therapeutic potential of this nanomaterial for cancer treatment.

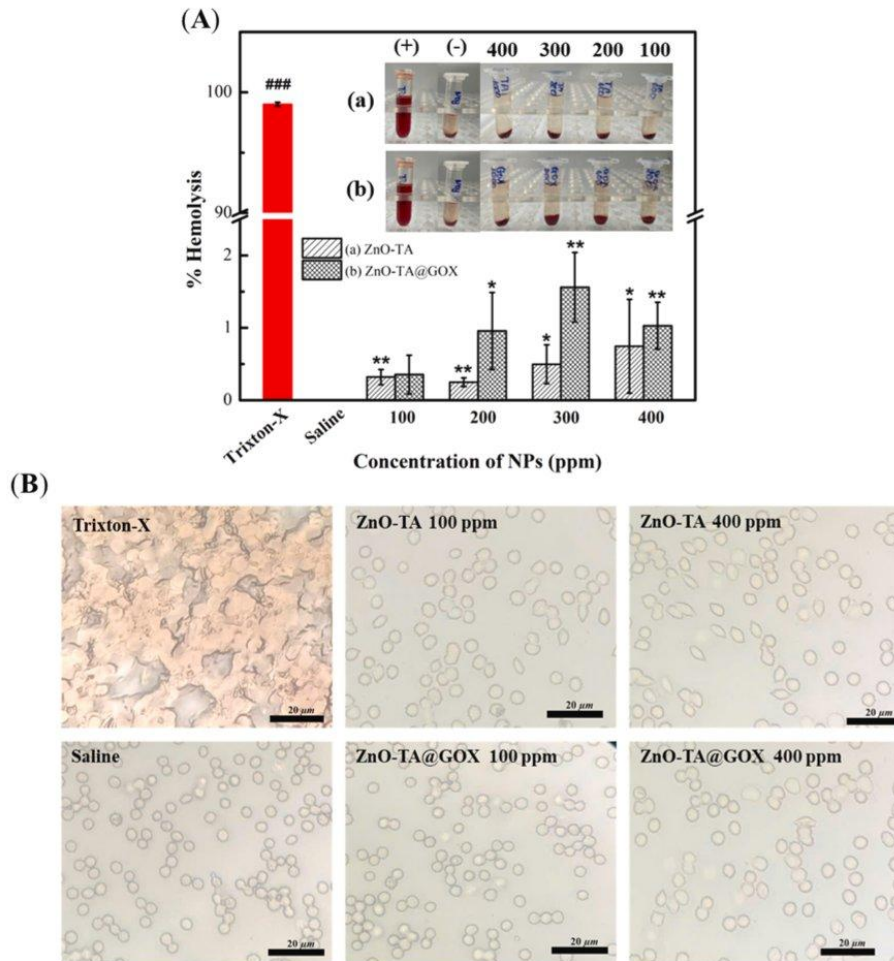
### 3.3. *In vitro* NO release profiles

The catalytic capability of ZnO-TA@GOx to generate NO from endogenous NO donor was evaluated using the Griess assay. As shown in Fig. 2D, GSNO exhibited self-decomposition capability to release NO under physiological conditions. The NO concentration reached only

about 25.56  $\mu$ M at 48 h, which was very low compared to the control. Upon the addition of GSH to GSNO, the NO concentration increased significantly (approximately 75  $\mu$ M at 48 h), indicating that GSH accelerates the decomposition of GSNO [44,45]. Notably, the introduction of ZnO NPs further enhanced both the decomposition rate and the amount of NO released, in a concentration-dependent manner. After 48 h of incubation, samples containing 250, 500, and 1000 ppm of ZnO NPs generated 140, 150, and 187  $\mu$ M of NO, respectively. These findings demonstrate that ZnO NPs substantially promote NO release beyond the effect of GSH alone. Taken together, the results indicated that ZnO-TA@GOx can mimic glutathione peroxidase-like activity [46], effectively catalyzing GSNO decomposition in the presence of GSH and leading to the sustained NO generation. This catalytic function highlights their potential utility in cancer therapy that exploits endogenous NO donors to induce tumor cell apoptosis, suppress angiogenesis, and enhance the efficacy of chemodynamic or photodynamic treatments through the NO-mediated pathways.

### 3.4. *In vitro* cytotoxicity

To assess the therapeutic potential and biosafety of ZnO-TA@GOx NPs, their *in vitro* cytotoxicity was evaluated on MCF-7 breast cancer cells and normal human dermal fibroblasts (hDFBs) using WST-1 and



17

Fig. 4. (A) Hemolysis rate and (B) Digital images of erythrocytes after treating with ZnO-TA@GOx NPs at different concentrations.

Live/Dead assays. As shown in Fig. 3, both ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs exerted significant cytotoxic effects on MCF-7 cells, reducing their viability to 72.12% and 43.84%, respectively, at a concentration of 400 ppm. Notably, ZnO-TA@GOx NPs induced approximately 25% cell death in MCF-7 cells even at lower concentrations. In contrast, ZnO-TA showed minimal toxicity in the range of 100–300 ppm, with over 80% of MCF-7 cells remaining viable. The introduction of glucose (4.5 mg/mL) further enhanced the anticancer efficacy of ZnO-TA@GOx NPs, resulting in over 60% cancer cell death across all tested concentrations (100–400 ppm). The half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of ZnO-TA@GOx NPs was determined to be approximately 100 ppm in the presence of glucose, compared to 400 ppm without glucose, indicating a glucose-dependent cytotoxic enhancement. The superior cytotoxicity of ZnO-TA@GOx NPs relative to ZnO-TA is attributed to the synergistic production of  $H_2O_2$  and NO. Low to moderate levels of  $H_2O_2$  have been

shown to induce cell death in a concentration- and cell type-dependent manner.

For example, Tochigi et al. [47] demonstrated that  $H_2O_2$  at concentrations of 30–100  $\mu M$  triggered apoptosis in TRAIL-resistant human melanoma cells. In another study [48], the apoptosis of HeLa cells was investigated as the function of  $H_2O_2$  time treatment, which showed 28.96% apoptosis after 15 min treated with  $H_2O_2$  125  $\mu M$ . Furthermore, the  $H_2O_2$  treatment [49] with low concentrations (6.5  $\mu M$ ) has been reported to sensitize cancer cells to anticancer therapies by inducing DNA damage, depleting ATP via caspase-independent mechanisms, inhibiting glycolysis, and blocking ATP-restoring pathways. Like  $H_2O_2$ , NO also promotes apoptosis in cancer cells through various mechanisms involving oxidative and nitrosative stress. At elevated levels, NO disrupts mitochondrial membrane potential, facilitating cytochrome c release and activation of the intrinsic apoptotic pathway. It can also

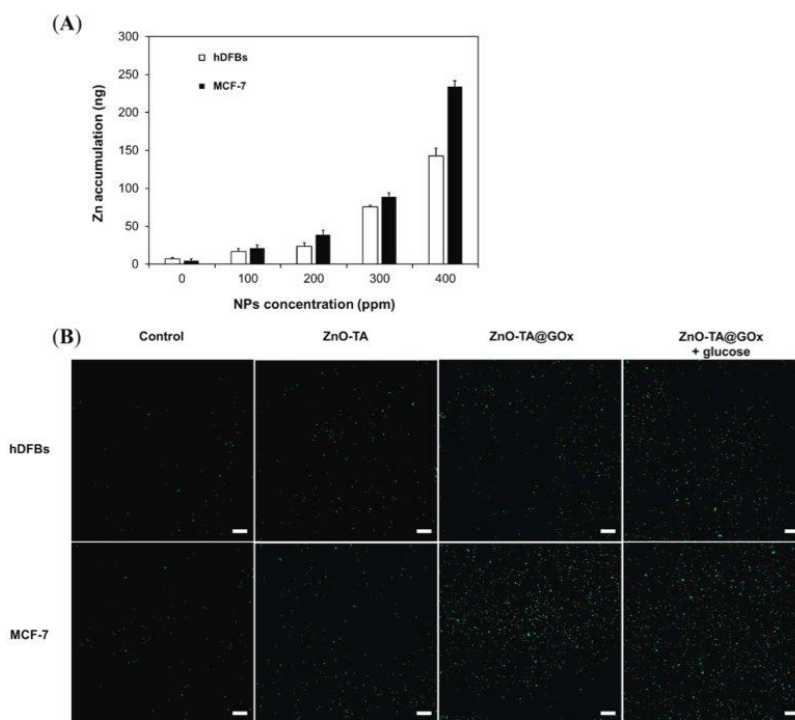


Fig. 5. (A) Quantitative analysis of intracellular zinc accumulation in normal cells (hDFBs) and cancer cells (MCF-7). (B) Fluorescence images of ROS generation, detected by DCFH-DA staining, in hDFBs and MCF-7 cells after 6 h of treatment with different formulations. The scale bar is 100  $\mu$ m.

upregulate pro-apoptotic proteins such as Bax and downregulate anti-apoptotic proteins like Bcl-2. Moreover, NO activates caspase-3 and -9, further amplifying apoptosis. These effects can lead to selective cancer cell death under appropriate conditions. For instance, Confino *et al.* [50] reported rapid and extensive cancer cell death in multiple tumor types, including colon, breast, pancreatic, and ovarian cancers, following exposure to ultra-high concentrations (10,000–100,000 ppm) of gaseous NO (gNO). Recently, Gordon *et al.* [51] demonstrated the anticancer efficacy of S-nitrosoglutathione (GSNO), an NO donor, in neuroblastoma cells, where GSNO treatment reduced metabolic activity, suppressed clonogenic potential, and increased cell death. In our study, ZnO-TA@GOx NPs simultaneously generate  $H_2O_2$  and NO in the presence of glucose, owing to the catalytic activities of GOx and ZnO, respectively. This dual generation mechanism contributes to a synergistic enhancement of the anticancer effect, providing a promising strategy for selective and efficient cancer cell elimination while minimizing cytotoxicity to normal cells. It should be noted that the glucose concentration employed in these cytotoxicity assays (4.5 mg/mL) is higher than physiological levels, which may not fully mimic the nutrient conditions of the tumor microenvironment. Nevertheless, under these experimental settings, the addition of glucose did not result in significant differences in hDFB viability among the tested groups. However, this limitation also highlights the need for further investigation under more physiologically relevant conditions. Future studies should incorporate lower glucose concentrations representative of the tumor microenvironment to better evaluate the sensitivity and therapeutic performance of the nanosystem.

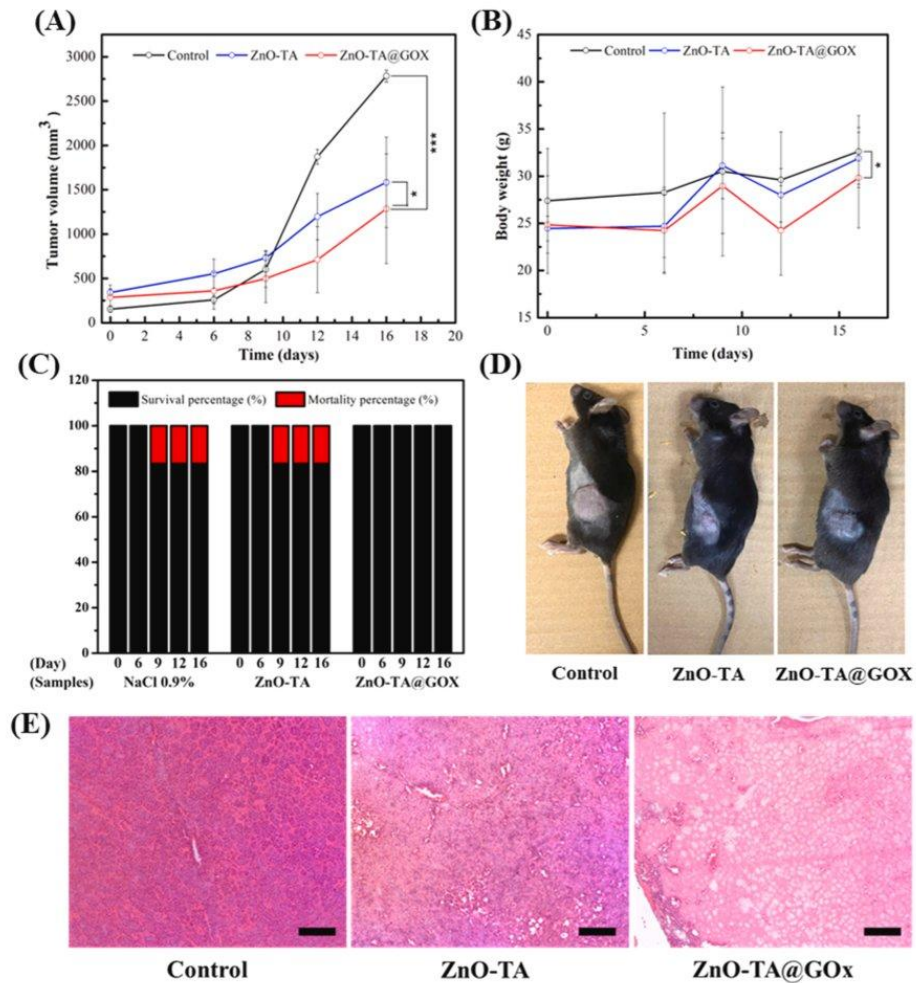
Furthermore, the cytotoxicity of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs toward hDFBs was significantly lower than that observed in MCF-7

cancer cells. As illustrated in Fig. 3, hDFBs maintained over 90% viability when exposed to NPs at concentrations up to 300 ppm. Notably, at lower concentrations (<200 ppm), both ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs significantly enhanced cell viability compared to the untreated control group. This enhancement is likely attributed to the proliferative effects of  $H_2O_2$  generated at low concentrations. Specifically,  $H_2O_2$  at sub-toxic levels (<100  $\mu$ M) can act as a secondary messenger in various cellular signaling pathways, modulating the activity of growth factor receptors and kinases involved in cell cycle progression. Thus, the limited amount of  $H_2O_2$  produced via the enzymatic reaction between GOx and glucose in the culture medium may have contributed to the increased viability of hDFBs at low NP concentrations. Moreover, the addition of glucose did not result in significant differences in hDFB viability among the samples. These findings underscore the selective cytotoxicity of ZnO-TA@GOx NPs, which demonstrated potent anticancer activity while maintaining acceptable cytocompatibility with normal cells at equivalent treatment concentrations.

To ensure the safety of NPs for systemic administration, the hemolysis assay was conducted. As illustrated in Fig. 4A, all ZnO-based nanocomposites exhibited a low hemolysis rate (<5%), comparable to the negative control (PBS) and markedly lower than the positive control (Triton X-100). Furthermore, optical microscopy images of erythrocytes after 1 h of exposure to NPs at various concentrations confirmed the absence of red blood cell damage, underscoring their suitability for cancer therapy applications (Fig. 4B).

### 3.5. Cellular zinc accumulation and intracellular ROS generation

Zinc is an essential trace element in the human body, which plays



**Fig. 6.** *In vivo* antitumor efficacy of ZnO-TA@GOx NPs in a subcutaneous xenograft model of human breast cancer. The changes in (A) tumor volume and (B) body weight of mice as the function of time. (C) The survival rate of different experimental groups 16 days post-treatment. (D) The digital images of tumor-bearing mice and at day 16 of treatment. (E) H&E-stained sections of treated tumors of various treatments. The scale bar is 100  $\mu$ m.

critical roles in numerous cellular processes, including proliferation, differentiation, apoptosis, and regulation of the cell cycle [52,53]. In normal cells, zinc homeostasis is tightly controlled by specific zinc transporters and is often sequestered in vesicles to ensure regulated intracellular release. In contrast, cancer cells frequently exhibit dysregulated zinc homeostasis, which varies depending on the cancer type and progression stage. It is well-documented that excessive zinc accumulation in cancer cells can induce oxidative stress and trigger programmed cell death, such as pyroptosis, thus highlighting zinc's potential as an anticancer agent. In this study, we investigated the zinc accumulation in breast cancer cells (MCF-7) and normal human dermal fibroblasts (hDFBs) following treatment with varying concentrations of ZnO-TA@GOx NPs, using Abcam's zinc quantification assay kit. As depicted in Fig. 5A, the intracellular zinc levels were found to correlate with both the cell type and NP concentration. Specifically, as the NP concentration increased from 0 to 400 ppm, the zinc content increased

from 4.6 ng to 142.6 ng in hDFBs and from 6.9 ng to 234.1 ng in MCF-7 cells. This enhanced zinc accumulation in MCF-7 cells compared to normal cells is consistent with previously reported elevated expression of zinc-importing proteins in tumor tissues [54]. These results suggest that ZnO-TA@GOx NPs can preferentially promote zinc accumulation in cancer cells, thereby enabling targeted zinc delivery and potentially inducing apoptosis or improving the therapeutic efficacy of zinc-based nanocarriers.

The DCFH-DA fluorescence imaging results in Fig. 5B clearly reveal differences in intracellular ROS generation among the treatment groups and between the two cell lines. In both hDFBs and MCF-7 cells, the green fluorescence intensity (indicative of ROS levels) increased upon treatment with the nanoparticles compared to the untreated control. Notably, the fluorescence signals observed in MCF-7 cancer cells were consistently and significantly higher than those in normal hDFBs under the same conditions. This trend is in good agreement with the obtained

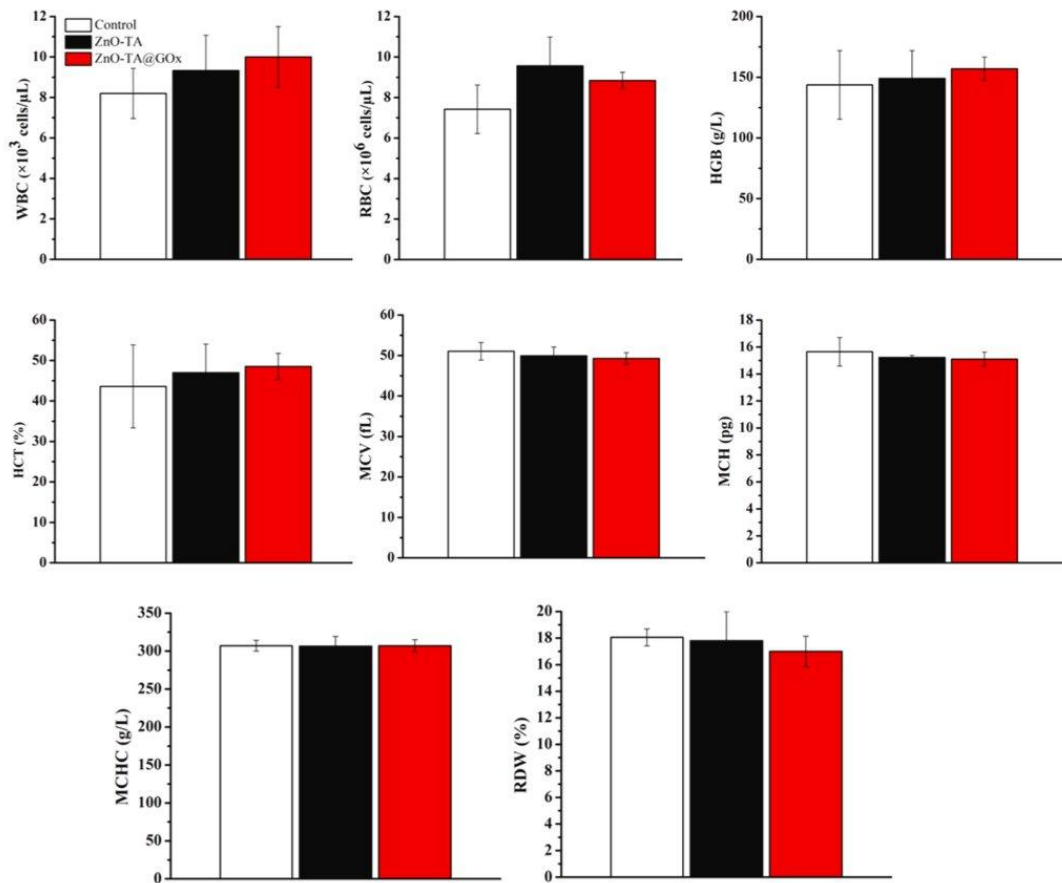


Fig. 7. The whole blood cell analysis of treated and untreated mice after 16 days of treatment. Abbreviations: WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width.

Zn accumulation results, indicating that Zn is preferentially internalized and accumulated in cancer cells, thereby promoting higher ROS production. Specifically, for the ZnO-TA-treated group, a moderate increase in ROS levels was observed, which can be attributed to the release of  $Zn^{2+}$  ions and the subsequent induction of intracellular oxidative stress. More importantly, treatment with ZnO-TA@GOx led to a substantial enhancement in fluorescence intensity in both cell lines, particularly in MCF-7 cells, demonstrating a significant increase in ROS generation due to the synergistic effect between ZnO and GOx. Upon supplementation with glucose (4.5 mg/mL), the intracellular ROS levels were further markedly elevated, confirming that GOx effectively catalyzed glucose oxidation to produce  $H_2O_2$ , thereby amplifying oxidative stress within the cells. This increase was significantly greater than that observed for ZnO-TA alone, highlighting the critical role of GOx in boosting ROS production. Taken together with the results of enhanced Zn accumulation in cancer cells and the glucose-consuming,  $H_2O_2$ -generating catalytic activity of GOx, these findings provide clear insight into the synergistic and selective anticancer mechanism of the ZnO-TA@GOx system.

### 3.6. In vivo tumor inhibition

The antitumor efficacy of ZnO-TA@GOx NPs was assessed in a subcutaneous xenograft model, using MCF-7 human breast cancer-bearing mice. Mice were treated via intratumoral injection with either ZnO-TA or ZnO-TA@GOx NPs at an equivalent dose ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) twice a week for a duration of 3 weeks. As illustrated in Fig. 6A, the tumor volumes of the control (mice without treatment) increased progressively throughout the experimental period. In contrast, both ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs significantly inhibited tumor growth. Specifically, on day 16 post-treatment, the average tumor volumes in the ZnO-TA- and ZnO-TA@GOx-treated groups were markedly smaller than those observed in the control group, with mean values of  $1561 \text{ mm}^3$  and  $1285 \text{ mm}^3$ , respectively, compared to  $2784 \text{ mm}^3$  in the control group. In addition, all treated mice maintained stable body weights throughout the study, with no significant differences compared to the control, indicating the absence of systemic toxicity despite the strong antitumor effects (Fig. 6B). Notably, ZnO-TA@GOx NPs demonstrated the most pronounced therapeutic efficacy, as evidenced by the smallest excised tumor sizes and the highest survival rate at the 16-day endpoint (Fig. 6C-D). The superior anticancer efficacy of ZnO-TA@GOx NPs is attributed

to the synergistic effects of reactive oxygen and nitrogen species generation (notably  $H_2O_2$  and NO), glucose depletion mediated by GOx, and the inherent antitumor properties of tannic acid. These *in vivo* findings are consistent with the *in vitro* cytotoxicity results and apoptosis assays, further confirming the therapeutic potential of ZnO-TA@GOx NPs.

H&E-stained sections of treated tumors were subsequently analyzed on day 21 post-treatment to evaluate the histopathological changes (Fig. 6E). In contrast to the control group, which exhibited densely packed tumor tissues with a high nuclear density, the H&E-stained section of ZnO-TA and ZnO-TA@GOx NPs-treated groups displayed a marked reduction in nuclear density along with the presence of large void regions, indicative of extensive tumor necrosis. Furthermore, hematological analysis revealed no statistically significant differences in complete blood cell counts between the control and nanoparticle-treated groups after 16 days of treatment (Fig. 7 and Figure S2-3), suggesting the excellent biocompatibility of ZnO-TA@GOx nanoparticles and their promising potential for anticancer applications.

#### 4. Conclusions

In summary, we successfully developed a biocompatible and selectively anticancer ZnO nanocomposite by integrating ROS-mediated oxidative damage with starvation therapy. The ZnO-TA@GOx NPs not only markedly enhanced ROS generation ( $H_2O_2$  and NO) but also depleted glucose availability, thereby effectively inducing apoptosis in tumor cells. Importantly, *in vivo* studies demonstrated that ZnO-TA@GOx NPs significantly suppressed tumor growth without causing notable changes in body weight or hematological parameters of tumor-bearing mice during the 2-week treatment period. Moreover, H&E staining revealed extensive tumor necrosis, confirming the potent cytotoxic activity of ZnO-TA@GOx NPs. Collectively, these findings underscore the potential of ZnO-TA@GOx NPs as a promising nanocomposite platform for cancer therapy.

#### CRedit authorship contribution statement

**Kim Huong Hoang:** Writing – original draft, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Anh Quan Hoang:** Validation, Software, Resources, Data curation. **Hoang Duy Nguyen:** Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Minh Hien Hoang:** Methodology, Investigation, Data curation. **Dinh Trung Nguyen:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Thanh Phu Nguyen:** Writing – original draft, Software, Resources, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Van Du Cao:** Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Data curation. **Phuong Le Thi:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgement

This work was funded by Vietnam Academy of Science and Technology (VAST) under Grant Number DLTE03.06/25–26.

#### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.colsurfa.2026.140646.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### References

- [1] J. Sidhic, M.K. Aswathi, A. Prasad, A. Tom, P. Mohan, P. Sarbadhikary, A. Narayanankutty, S. George, H. Abrahamse, B.P. George, Advancements in metal and metal oxide nanoparticles for targeted cancer therapy and imaging: mechanisms, applications, and safety concerns, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 105 (2025) 106622, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106622>.
- [2] P. Singh, S. Pandit, S.R. Balusamy, M. Madhusudan, H. Singh, H.M. Amsath Haseef, I. Mijakovic, Advanced nanomaterials for cancer therapy: gold, silver, and iron oxide nanoparticles in oncological applications, *Adv. Healthc. Mater.* 14 (2025), <https://doi.org/10.1002/adhm.202403059>.
- [3] M. Vinardell, M. Mitjans, Antitumor activities of metal oxide nanoparticles, *Nanomaterials* 5 (2015) 1004–1021, <https://doi.org/10.3390/nano5021004>.
- [4] N. Wiesmann, W. Tremel, J. Brieger, Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine, *J. Mater. Chem. B* 8 (2020) 4973–4989, <https://doi.org/10.1039/D0TB00739K>.
- [5] S. Gomaa, M. Nassef, G. Tabl, S. Zaki, A. Abdel-Ghany, Doxorubicin and folic acid-loaded zinc oxide nanoparticles-based combined anti-tumor and anti-inflammatory approach for enhanced anti-cancer therapy, *BMC Cancer* 24 (2024) 34, <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11714-4>.
- [6] N. Wiesmann, M. Kluecker, P. Demuth, W. Brenner, W. Tremel, J. Brieger, Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 51 (2019) 226–234, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.08.002>.
- [7] S. Anjum, M. Hashim, S.A. Malik, M. Khan, J.M. Lorenzo, B.H. Abbasi, C. Hano, Recent advances in zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) for cancer diagnosis, target drug delivery, and treatment, *Cancers (Basel)* 13 (2021) 4570, <https://doi.org/10.3390/cancers13184570>.
- [8] P. Le Thi, D.L. Tran, T.T. Hoang Thi, Y. Lee, K.D. Park, Injectable reactive oxygen and nitrogen species-controlling hydrogels for tissue regeneration: current status and future perspectives, *Regen. Biomater.* 9 (2022), <https://doi.org/10.1093/rb/rbac069>.
- [9] P. Le Thi, D.L. Tran, K.M. Park, S. Lee, D.H. Oh, K.D. Park, Biocatalytic nitric oxide generating hydrogels with enhanced anti-inflammatory, cell migration, and angiogenic capabilities for wound healing applications, *J. Mater. Chem. B* 12 (2024) 1538–1549, <https://doi.org/10.1039/D3TB01943H>.
- [10] P. Le Thi, Y. Lee, D.L. Tran, T.T.H. Thi, J. Il Kang, K.M. Park, K.D. Park, situ forming and reactive oxygen species-scavenging gelatin hydrogels for enhancing wound healing efficacy, *Acta Biomater.* 103 (2020) 142–152, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.009>.
- [11] Y. Cao, M. Liu, J. Cheng, J. Yin, C. Huang, H. Cui, X. Zhang, G. Zhao, Acidity-triggered tumor-targeted nanosystem for synergistic therapy via a cascade of ROS generation and NO release, *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2020) acsami.0c04791, <https://doi.org/10.1021/acsami.0c04791>.
- [12] W.-P. Li, C.-H. Su, Y.-C. Chang, Y.-J. Lin, C.-S. Yeh, Ultrasound-induced reactive oxygen species mediated therapy and imaging using a Fenton reaction activable polymeric nanosystem, *ACS Nano* 10 (2016) 2017–2027, <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b06175>.
- [13] C. Zhang, W. Bu, D. Ni, S. Zhang, Q. Li, Z. Yao, J. Zhang, H. Yao, Z. Wang, J. Shi, Synthesis of iron nanometallic glasses and their application in cancer therapy by a localized fenton reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (2016) 2101–2106, <https://doi.org/10.1002/anie.201510031>.
- [14] Z. Zhou, J. Song, R. Tian, Z. Yang, G. Yu, L. Lin, G. Zhang, W. Fan, F. Zhang, G. Niu, L. Nie, X. Chen, Activatable singlet oxygen generation from lipid hydroperoxide nanoparticles for cancer therapy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 6492–6496, <https://doi.org/10.1002/anie.201701181>.
- [15] K. Chang, Z. Liu, X. Fang, H. Chen, X. Men, Y. Yuan, K. Sun, X. Zhang, Z. Yuan, C. Wu, Enhanced phototherapy by nanoparticle-enzyme via generation and photolysis of hydrogen peroxide, *Nano Lett.* 17 (2017) 4323–4329, <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b01382>.
- [16] T. Zhang, Y. Li, W. Hong, Z. Chen, P. Peng, S. Yuan, J. Qu, M. Xiao, L. Xu, Glucose oxidase and polydopamine functionalized iron oxide nanoparticles: combination of the photothermal effect and reactive oxygen species generation for dual-modality selective cancer therapy, *J. Mater. Chem. B* 7 (2019) 2190–2200, <https://doi.org/10.1039/C8TB03320J>.
- [17] W. Fan, N. Lu, P. Huang, Y. Liu, Z. Yang, S. Wang, G. Yu, Y. Liu, J. Hu, Q. He, J. Qu, T. Wang, X. Chen, Glucose-responsive sequential generation of hydrogen peroxide and nitric oxide for synergistic cancer starving-like/gas therapy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 1229–1233, <https://doi.org/10.1002/anie.201610682>.
- [18] Y. Fu, J. Sun, Y. Wang, W. Li, Glucose oxidase and metal catalysts combined tumor synergistic therapy: mechanism, advance and nanodelivery system, *J. Nanobiotechnol.* 21 (2023) 400, <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02158-w>.
- [19] S.A. Abouelmagd, F. Meng, B.-K. Kim, H. Hyun, Y. Yeo, Tannic acid-mediated surface functionalization of polymeric nanoparticles, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2 (2016) 2294–2303, <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.6b00497>.
- [20] Z. Fu, R. Chen, Study of complexes of tannic acid with Fe(III) and Fe(II), *J. Anal. Methods Chem.* 2019 (2019) 1–6, <https://doi.org/10.1155/2019/3894571>.
- [21] C. Liu, H. Liu, K. Tang, K. Zhang, Z. Zou, X. Gao, High-Strength Chitin Based Hydrogels Reinforced by Tannic Acid Functionalized Graphene for Congo Red

- Adsorption, *J. Polym. Environ.* 28 (2020) 984–994, <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01663-5>.
- [22] A. Kamaruzaman, N.A.C. Lah, Formation of ZnO nanoparticles in the presence of Tannic acid, *Mater. Today Proc.* 41 (2021) 61–64, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.1007>.
- [23] S. Talam, S.R. Karumuri, N. Gunnam, Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles, *ISRN Nanotechnol.* 2012 (2012) 1–6, <https://doi.org/10.5402/2012/372505>.
- [24] Y. Mongy, T. Shalaby, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Rhus coriaria extract and their anticancer activity against triple-negative breast cancer cells, *Sci. Rep.* 14 (2024) 13470, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63258-7>.
- [25] S. Yedurkar, C. Maurya, P. Mahanwar, Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Ixora coccinea Leaf Extract—A Green Approach, *Open J. Synth. Theory Appl.* 05 (2016) 1–14, <https://doi.org/10.4236/ojsta.2016.51001>.
- [26] I.-A. Vagena, C. Malapani, M.-A. Gatou, N. Lagopati, E.A. Pavlatou, Enhancement of EPR Effect for Passive Tumor Targeting: Current Status and Future Perspectives, *Appl. Sci.* 15 (2025) 3189, <https://doi.org/10.3390/app15063189>.
- [27] S.W. Balgoun, O.O. James, Y.K. Sanusi, O.H. Olayinka, Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using bashful (*Mimosa pudica*), leaf extract: a precursor for organic electronics applications, *SN Appl. Sci.* 2 (2020) 504, <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2127-3>.
- [28] M. Sultan, A. Youssef, R.A. Baseer, Fabrication of multifunctional ZnO@tannic acid nanoparticles embedded in chitosan and polyvinyl alcohol blend packaging film, *Sci. Rep.* 14 (2024) 18533, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68571-9>.
- [29] M.-A. Gatou, K. Kontoliou, E. Volla, K. Karachalios, G. Raptopoulos, P. Paraskevopoulou, N. Lagopati, E.A. Pavlatou, Optimization of ZnO Nanoparticles' Synthesis via Precipitation Method Applying Taguchi Robust Design, *Catalysts* 13 (2023) 1367, <https://doi.org/10.3390/catal13101367>.
- [30] T. Wahyono, D.A. Astuti, I.K. Gede Wiryawan, I. Sugoro, A. Jayanegara, Fourier Transform Mid-Infrared (FTIR) Spectroscopy to Identify Tannin Compounds in The Panicle of Sorghum Mutant Lines, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 546 (2019) 042045, <https://doi.org/10.1088/1757-899X/546/4/042045>.
- [31] C. Pucci, C. Martinelli, D. De Pasquale, M. Battaglini, N. di Leo, A. Degl'Innocenti, M. Belenli Gümüş, F. Drago, G. Giofani, Tannic Acid–Iron Complex-Based Nanoparticles as a Novel Tool against Oxidative Stress, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 14 (2022) 15927–15941, <https://doi.org/10.1021/acsaami.1c24576>.
- [32] E.G. Uc-Cayetano, L.C. Ordóñez, J.V. Cauich-Rodríguez, F. Avilés, Enhancement of Electrochemical Glucose Sensing by Using Multiwall Carbon Nanotubes decorated with Iron Oxide Nanoparticles, *Int. J. Electrochem. Sci.* 11 (2016) 6356–6369, <https://doi.org/10.20964/2016.07.85>.
- [33] C. Chey, Z. Ibutopo, K. Khun, O. Nur, M. Willander, Indirect Determination of Mercury Ion by Inhibition of a Glucose Biosensor Based on ZnO Nanorods, *Sensors* 12 (2012) 15063–15077, <https://doi.org/10.3390/s121115063>.
- [34] T.M. Ma, H. Zeng, S.X. Zhao, W.S. Huo, Spectroscopic and Electrochemical Features of Glucose Oxidase Incorporation into Polyaniline-Cobaltous Oxalate Nano-complex, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 29 (2019) 279–289, <https://doi.org/10.1007/s10904-018-0986-5>.
- [35] S. Altun, B. Çakıroğlu, M. Özacar, M. Özacar, A facile and effective immobilization of glucose oxidase on tannic acid modified CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 136 (2015) 963–970, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.053>.
- [36] T.E. Benavidez, D. Torrente, M. Marucho, C.D. García, Adsorption and catalytic activity of glucose oxidase accumulated on OTCE upon the application of external potential, *J. Colloid Interface Sci.* 435 (2014) 164–170, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.08.012>.
- [37] A.A. Tokmakov, A. Kurotani, K.-I. Sato, Protein pI and Intracellular Localization, *Front. Mol. Biosci.* 8 (2021), <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.775736>.
- [38] S. Kamble, S. Agrawal, S. Cherumukil, V. Sharma, R.V. Jasra, P. Munshi, Revisiting Zeta Potential, the Key Feature of Interfacial Phenomena, with Applications and Recent Advancements, *ChemistrySelect* 7 (2022), <https://doi.org/10.1002/slct.202103084>.
- [39] S. Sharma, P. Shukla, A. Misra, P.R. Mishra, Interfacial and colloidal properties of emulsified systems. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*, Elsevier, 2014, pp. 149–172, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62614-1.00008-9>.
- [40] K. Pate, P. Safer, Chemical metrology methods for CMP quality. *Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)*, Elsevier, 2016, pp. 299–325, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100165-3.00012-7>.
- [41] M. Ahamed, Javed Akhtar, M. Kumar, Khan, Alrokayan Ahmad, Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species, *Int. J. Nanomed.* (2012) 845, <https://doi.org/10.2147/IJN.S29129>.
- [42] S.-H. Baek, H.-J. Lee, S.-N. Lee, Thickness dependence of crystal and optical characterization on ZnO thin film grown by atomic layer deposition, *AIP Adv.* 8 (2018), <https://doi.org/10.1063/1.5025685>.
- [43] R.F. Biju, J. G. J. J. M. A. S.P. A. V. V. M.L. J. A.M.M. J. Structural, Spectroscopic, Thermal and Morphological Evaluation of Biogenic ZnO/Ag Nanocomposite using Moringa oleifera Seed Extract for Enhanced Antimicrobial Efficacy, *Chem. Phys. Impact* 10 (2025) 100850, <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2025.100850>.
- [44] S.P. Singh, J.S. Wishnok, M. Keshive, W.M. Deen, S.R. Tannenbaum, The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996) 14428–14433, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14428>.
- [45] A. Xu, J.A. Vita, J.F. Keane, Ascorbic Acid and Glutathione Modulate the Biological Activity of S-Nitrosoglutathione, *Hypertension* 36 (2000) 291–295, <https://doi.org/10.1161/01.HYP.36.2.291>.
- [46] T. Yang, A.S. Fruergaard, A.K. Winther, A.N. Zelikin, R. Chandrawati, Zinc Oxide Particles Catalytically Generate Nitric Oxide from Endogenous and Exogenous Prodrugs, *Small* 16 (2020), <https://doi.org/10.1002/smll.201906744>.
- [47] M. Tochigi, T. Inoue, M. Suzuki-Karasaki, T. Ochiai, C. Ra, Y. Suzuki-Karasaki, Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation, *Int. J. Oncol.* 42 (2013) 863–872, <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1769>.
- [48] M. Singh, H. Sharma, N. Singh, Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway, *Mitochondrion* 7 (2007) 367–373, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.07.003>.
- [49] G. Vilema-Enríquez, A. Arroyo, M. Grijalva, R.I. Amador-Zafra, J. Camacho, Molecular and Cellular Effects of Hydrogen Peroxide on Human Lung Cancer Cells: Potential Therapeutic Implications, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016), <https://doi.org/10.1155/2016/1908164>.
- [50] H. Confino, M. Goldshtein, S. Puyesky, S. Yarkoni, A. Avniel, S. Lisi, I. Wolf, Ultra-high concentrations of gaseous nitric oxide show rapid cytotoxic capabilities against colon, breast, pancreatic and other cancer cells *in vitro*, 1848–1848, *Cancer Res* 82 (2022), <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-1848>.
- [51] J.L. Gordon, K.J. Hinsin, M.M. Reynolds, T.A. Smith, H.O. Tucker, M.A. Brown, Anticancer potential of nitric oxide (NO) in neuroblastoma treatment, *RSC Adv.* 11 (2021) 9112–9120, <https://doi.org/10.1039/D1RA00275A>.
- [52] M. Serra, A. Columbano, U. Ammarah, M. Mazzone, A. Menga, Understanding metal dynamics between cancer cells and macrophages: competition or synergism? *Front. Oncol.* 10 (2020) <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00646>.
- [53] M. Bendellaa, P. Lelièvre, J. Coll, L. Sancey, A. Deniaud, B. Busser, Roles of zinc in cancers: from altered metabolism to therapeutic applications, *Int. J. Cancer* 154 (2024) 7–20, <https://doi.org/10.1002/ijc.34679>.
- [54] Z. Qu, Q. Liu, X. Kong, X. Wang, Z. Wang, J. Wang, Y. Fang, A systematic study on zinc-related metabolism in breast cancer, *Nutrients* 15 (2023) 1703, <https://doi.org/10.3390/nu15071703>.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tewari M., 2022, Cancer and Its Treatment: An Overview, *International Journal of Advanced Research*, 10(03), pp. 950–956. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/14476>.
2. Fares J., Fares M. Y., Khachfe H. H., Salhab H. A., Fares Y., 2020, Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), pp. 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>.
3. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., Jemal A., 2024, Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), pp. 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
4. International Agency for Research on Cancer, *Globocan 2020: Vietnam*. World Health Organization.
5. International Agency for Research on Cancer, *Globocan 2022: Vietnam*. World Health Organization.
6. Kaur R., Bhardwaj A., Gupta S., 2023, Cancer Treatment Therapies: Traditional to Modern Approaches to Combat Cancers, *Molecular Biology Reports*, 50(11), pp. 9663–9676. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08809-3>.
7. Tuyến N. V., Anh N. Q., Anh Đ. T. T., Thắm P. T., Chính P. T., *Giáo Trình Hoá Dược*; Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật, 2014; Vol. 11.
8. Morgan G., 2003, Chemotherapy and the Cell Cycle, *Cancer Nursing Practice*, 2(1), pp. 27–30. <https://doi.org/10.7748/cnp2003.02.2.1.27.c57>.
9. Tewari M., 2022, CANCER AND ITS TREATMENT: AN OVERVIEW, *International Journal of Advanced Research*, 10(03), pp. 950–956. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/14476>.
10. Emran T. Bin, Shahriar A., Mahmud A. R., Rahman T., Abir M. H., Siddiquee Mohd. F.-R., Ahmed H., Rahman N., Nainu F., Wahyudin E., Mitra S., Dhama K., Habiballah M. M., Haque S., Islam A., Hassan M. M., 2022, Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular

- Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches, *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891652>.
11. Milewska S., Niemirowicz-Laskowska K., Siemiaszko G., Nowicki P., Wilczewska A. Z., Car H., 2021, Current Trends and Challenges in Pharmaco-economic Aspects of Nanocarriers as Drug Delivery Systems for Cancer Treatment, *International Journal of Nanomedicine*, Volume 16, pp. 6593–6644. <https://doi.org/10.2147/IJN.S323831>.
  12. Khursheed R., Dua K., Vishwas S., Gulati M., Jha N. K., Aldhafeeri G. M., Alanazi F. G., Goh B. H., Gupta G., Paudel K. R., Hansbro P. M., Chellappan D. K., Singh S. K., 2022, Biomedical Applications of Metallic Nanoparticles in Cancer: Current Status and Future Perspectives, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, pp. 112951. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112951>.
  13. Sidhic J., Aswathi M. K., Prasad A., Tom A., Mohan P., Sarbadhikary P., Narayanankutty A., George S., Abrahamse H., George B. P., 2025, Advancements in Metal and Metal Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy and Imaging: Mechanisms, Applications, and Safety Concerns, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105, pp. 106622. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106622>.
  14. Shariatzadeh S., Moghimi N., Khalafi F., Shafiee S., Mehrabi M., Ilkhani S., Tosan F., Nakhaei P., Alizadeh A., Varma R. S., Taheri M., 2022, Metallic Nanoparticles for the Modulation of Tumor Microenvironment; A New Horizon, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.847433>.
  15. Bisht G., Rayamajhi S., 2016, ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent, *Nanobiomedicine*, 3. <https://doi.org/10.5772/63437>.
  16. Akbar A., Sadiq M. B., Zinc Oxide Nanomaterials as Antimicrobial Agents for Food Applications,. In *Zinc-Based Nanostructures for Environmental and Agricultural Applications*; Elsevier, 2021; pp 167–180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822836-4.00012-4>.
  17. Costa M. I., Sarmiento-Ribeiro A. B., Gonçalves A. C., 2023, Zinc: From Biological Functions to Therapeutic Potential, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), pp. 4822. <https://doi.org/10.3390/ijms24054822>.

18. Kiouri D. P., Tsoupra E., Peana M., Perlepes S. P., Stefanidou M. E., Chasapis C. T., MULTIFUNCTIONAL ROLE OF ZINC IN HUMAN HEALTH: AN UPDATE,. *EXCLI Journal*. Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors January 2, 2023, pp 809–827. <https://doi.org/10.17179/excli2023-6335>.
19. Anjum S., Hashim M., Malik S. A., Khan M., Lorenzo J. M., Abbasi B. H., Hano C., 2021, Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment, *Cancers*, 13(18), pp. 4570. <https://doi.org/10.3390/cancers13184570>.
20. Mongy Y., Shalaby T., 2024, Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Rhus Coriaria Extract and Their Anticancer Activity against Triple-Negative Breast Cancer Cells, *Scientific Reports*, 14(1), pp. 13470. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63258-7>.
21. Mousa A. B., Moawad R., Abdallah Y., Abdel-Rasheed M., Zaher A. M. A., 2023, Zinc Oxide Nanoparticles Promise Anticancer and Antibacterial Activity in Ovarian Cancer, *Pharmaceutical Research*, 40(10), pp. 2281–2290. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03505-0>.
22. Ibraheem S., Kadhim A. A., Kadhim K. A., Kadhim I. A., Jabir M., 2022, Zinc Oxide Nanoparticles as Diagnostic Tool for Cancer Cells, *International Journal of Biomaterials*, 2022, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/2807644>.
23. Tafech A., Stéphanou A., 2024, On the Importance of Acidity in Cancer Cells and Therapy, *Biology*, 13(4), pp. 225. <https://doi.org/10.3390/biology13040225>.
24. Shen Y., Tang H., Radosz M., Van Kirk E., Murdoch W. J., PH-Responsive Nanoparticles for Cancer Drug Delivery,; 2008; pp 183–216. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-210-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-210-6_10).
25. Palanikumar L., Al-Hosani S., Kalmouni M., Nguyen V. P., Ali L., Pasricha R., Barrera F. N., Magzoub M., 2020, PH-Responsive High Stability Polymeric Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Therapeutics, *Communications Biology*, 3(1), pp. 95. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0817-4>.
26. Shen C., James S. A., de Jonge M. D., Turney T. W., Wright P. F. A., Feltis B. N., 2013, Relating Cytotoxicity, Zinc Ions, and Reactive Oxygen

- in ZnO Nanoparticle–Exposed Human Immune Cells, *Toxicological Sciences*, 136(1), pp. 120–130. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft187>.
27. Song W., Zhang J., Guo J., Zhang J., Ding F., Li L., Sun Z., 2010, Role of the Dissolved Zinc Ion and Reactive Oxygen Species in Cytotoxicity of ZnO Nanoparticles, *Toxicology Letters*, 199(3), pp. 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.10.003>.
  28. Yi C., Yu Z., Ren Q., Liu X., Wang Y., Sun X., Yin S., Pan J., Huang X., 2020, Nanoscale ZnO-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30, pp. 101694. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101694>.
  29. Ancona A., Dumontel B., Garino N., Demarco B., Chatzitheodoridou D., Fazzini W., Engelke H., Cauda V., 2018, Lipid-Coated Zinc Oxide Nanoparticles as Innovative ROS-Generators for Photodynamic Therapy in Cancer Cells, *Nanomaterials*, 8(3), pp. 143. <https://doi.org/10.3390/nano8030143>.
  30. Aranda-Rivera A. K., Cruz-Gregorio A., Arancibia-Hernández Y. L., Hernández-Cruz E. Y., Pedraza-Chaverri J., 2022, RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts, *Oxygen*, 2(4), pp. 437–478. <https://doi.org/10.3390/oxygen2040030>.
  31. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y., 2013, Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity, *BioMed Research International*, 2013, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/942916>.
  32. Rauf A., Khalil A. A., Awadallah S., Khan S. A., Abu-Izneid T., Kamran M., Hemeg H. A., Mubarak M. S., Khalid A., Wilairatana P., 2024, Reactive Oxygen Species in Biological Systems: Pathways, Associated Diseases, and Potential Inhibitors—A Review, *Food Science & Nutrition*, 12(2), pp. 675–693. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3784>.
  33. Yang T., Fruergaard A. S., Winther A. K., Zelikin A. N., Chandrawati R., 2020, Zinc Oxide Particles Catalytically Generate Nitric Oxide from Endogenous and Exogenous Prodrugs, *Small*, 16(27). <https://doi.org/10.1002/sml.201906744>.
  34. Farias-Eisner R., Chaudhuri G., Aeberhard E., Fukuto J. M., 1996, The Chemistry and Tumoricidal Activity of Nitric Oxide/Hydrogen Peroxide and the Implications to Cell Resistance/Susceptibility, *Journal of*

- Biological Chemistry*, 271(11), pp. 6144–6151.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6144>.
35. Cao Y., Liu M., Cheng J., Yin J., Huang C., Cui H., Zhang X., Zhao G., 2020, Acidity-Triggered Tumor-Targeted Nanosystem for Synergistic Therapy via a Cascade of ROS Generation and NO Release, *ACS Applied Materials & Interfaces*, pp. acsami.0c04791.  
<https://doi.org/10.1021/acsami.0c04791>.
36. Myśliwiec A., Bartusik-Aebischer D., Aebischer D., 2025, The Role of Nitric Oxide in Cancer Treatment: Ally or Foe?, *Molecules*, 30(13), pp. 2802. <https://doi.org/10.3390/molecules30132802>.
37. Singh S. P., Wishnok J. S., Keshive M., Deen W. M., Tannenbaum S. R., 1996, The Chemistry of the S -Nitrosoglutathione/Glutathione System, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), pp. 14428–14433. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14428>.
38. Hogg N., Singh R. J., Kalyanaraman B., 1996, The Role of Glutathione in the Transport and Catabolism of Nitric Oxide, *FEBS Letters*, 382(3), pp. 223–228. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00086-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00086-5).
39. Kovacs I., Durner J., Lindermayr C., 2015, Crosstalk between Nitric Oxide and Glutathione Is Required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-Dependent Defense Signaling in Arabidopsis Thaliana, *New Phytologist*, 208(3), pp. 860–872. <https://doi.org/10.1111/nph.13502>.
40. Ortega A. L., Mena S., Estrela J. M., 2011, Glutathione in Cancer Cell Death, *Cancers*, 3(1), pp. 1285–1310.  
<https://doi.org/10.3390/cancers3011285>.
41. Liu P., Hao L., Liu M., Hu S., 2023, Glutathione-Responsive and -Exhausting Metal Nanomedicines for Robust Synergistic Cancer Therapy, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1161472>.
42. Wang S., Zang W., Peng M., Miao L., Wu A., Zhang Y., 2024, Multicolor Detection of Glutathione by Manganese Dioxide Nanosheets and Gold Nanotetrapods Based on an Anti-Etching Mechanism, *Talanta*, 268, pp. 125366. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125366>.

43. Ding Y., Dai Y., Wu M., Li L., 2021, Glutathione-Mediated Nanomedicines for Cancer Diagnosis and Therapy, *Chemical Engineering Journal*, 426, pp. 128880. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128880>.
44. Bansal A., Simon M. C., 2018, Glutathione Metabolism in Cancer Progression and Treatment Resistance, *Journal of Cell Biology*, 217(7), pp. 2291–2298. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804161>.
45. Elda Valenti G., Tasso B., Traverso N., Domenicotti C., Marengo B., 2023, Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance: An Update, *Redox Experimental Medicine*, 2023(1). <https://doi.org/10.1530/REM-22-0023>.
46. Roy N., Paira P., 2024, Glutathione Depletion and Stalwart Anticancer Activity of Metallotherapeutics Inducing Programmed Cell Death: Opening a New Window for Cancer Therapy, *ACS Omega*, 9(19), pp. 20670–20701. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08890>.
47. Xiong Y., Xiao C., Li Z., Yang X., 2021, Engineering Nanomedicine for Glutathione Depletion-Augmented Cancer Therapy, *Chemical Society Reviews*, 50(10), pp. 6013–6041. <https://doi.org/10.1039/D0CS00718H>.
48. Schnelldorfer T., Gansauge S., Gansauge F., Schlosser S., Beger H. G., Nussler A. K., 2000, Glutathione Depletion Causes Cell Growth Inhibition and Enhanced Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells., *Cancer*, 89(7), pp. 1440–1447.
49. Fei B., Qian B., Yang Z., Wang R., Liu W. C., Mak C. L., Xin J. H., 2008, Coating Carbon Nanotubes by Spontaneous Oxidative Polymerization of Dopamine, *Carbon*, 46(13), pp. 1795–1797. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.06.049>.
50. Mondal A., Paul P., Banerjee S., Applications of Metal Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy,. In *Advances in Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems*; Elsevier, 2022; pp 471–516. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88450-1.00013-2>.
51. Espina A., Cañamares M. V., Jurašeková Z., Sanchez-Cortes S., 2022, Analysis of Iron Complexes of Tannic Acid and Other Related Polyphenols as Revealed by Spectroscopic Techniques: Implications in the Identification and Characterization of Iron Gall Inks in Historical

- Manuscripts, *ACS Omega*, 7(32), pp. 27937–27949. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01679>.
52. Lee H. A., Park E., Lee H., 2020, Polydopamine and Its Derivative Surface Chemistry in Material Science: A Focused Review for Studies at KAIST, *Advanced Materials*, 32(35). <https://doi.org/10.1002/adma.201907505>.
53. Bizuayen Adamu T., Melese Mengesha A., Assefa Kebede M., Lake Bogale B., Walle Kassa T., 2024, Facile Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) Using *Lupinus Albus L* (Gibto) Seed Extract for Antibacterial and Photocatalytic Applications, *Results in Chemistry*, 10, pp. 101724. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101724>.
54. Klinbumrung A., Panya R., Pung-Ngama A., Nasomjai P., Saowalakhmea J., Sirirak R., 2022, Green Synthesis of ZnO Nanoparticles by Pineapple Peel Extract from Various Alkali Sources, *Journal of Asian Ceramic Societies*, 10(4), pp. 755–765. <https://doi.org/10.1080/21870764.2022.2127504>.
55. Jan H., Shah M., Usman H., Khan M. A., Zia M., Hano C., Abbasi B. H., 2020, Biogenic Synthesis and Characterization of Antimicrobial and Antiparasitic Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Using Aqueous Extracts of the Himalayan Columbine (*Aquilegia Pubiflora*), *Frontiers in Materials*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00249>.
56. A. Youness R., Kamel R., A. Elkasabgy N., Shao P., A. Farag M., 2021, Recent Advances in Tannic Acid (Gallotannin) Anticancer Activities and Drug Delivery Systems for Efficacy Improvement; A Comprehensive Review, *Molecules*, 26(5), pp. 1486. <https://doi.org/10.3390/molecules26051486>.
57. Swidan M. M., Wahba N. S., Sakr T. M., 2024, An Intelligent and Self-Assembled Nanoscale Metal Organic Framework (99mTC-DOX Loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@FeIII-Tannic Acid) for Tumor Targeted Chemo/Chemodynamic Theranostics, *Cancer Nanotechnology*, 15(1), pp. 28. <https://doi.org/10.1186/s12645-024-00265-3>.
58. Guo Z., Xie W., Lu J., Guo X., Xu J., Xu W., Chi Y., Takuya N., Wu H., Zhao L., 2021, Tannic Acid-Based Metal Phenolic Networks for Bio-

- Applications: A Review, *Journal of Materials Chemistry B*, 9(20), pp. 4098–4110. <https://doi.org/10.1039/D1TB00383F>.
59. Ghasemian M., Kazeminava F., Naseri A., Mohebzadeh S., Abbaszadeh M., Kafil H. S., Ahmadian Z., 2023, Recent Progress in Tannic Acid Based Approaches as a Natural Polyphenolic Biomaterial for Cancer Therapy: A Review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 166, pp. 115328. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115328>.
  60. Fu Y., Sun J., Wang Y., Li W., 2023, Glucose Oxidase and Metal Catalysts Combined Tumor Synergistic Therapy: Mechanism, Advance and Nanodelivery System, *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), pp. 400. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02158-w>.
  61. Yu S., Chen Z., Zeng X., Chen X., Gu Z., 2019, Advances in Nanomedicine for Cancer Starvation Therapy, *Theranostics*, 9(26), pp. 8026–8047. <https://doi.org/10.7150/thno.38261>.
  62. Li S., Wang Q., Jia Z., Da M., Zhao J., Yang R., Chen D., 2023, Recent Advances in Glucose Oxidase-Based Nanocarriers for Tumor Targeting Therapy, *Heliyon*, 9(10), pp. e20407. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20407>.
  63. Bhatti H. N., Madeeha M., Asgher M., Batool N., 2006, Purification and Thermodynamic Characterization of Glucose Oxidase from a Newly Isolated Strain of *Aspergillus Niger*, *Canadian Journal of Microbiology*, 52(6), pp. 519–524. <https://doi.org/10.1139/w05-158>.
  64. Zia M. A., Rahman K., Saeed M. K., Andaleeb F., Rajoka M. I., Sheikh M. A., Khan I. A., Khan A. I., 2007, Thermal Characterization of Purified Glucose Oxidase from A Newly Isolated *Aspergillus Niger* UAF-1, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41(2), pp. 132–138. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.2007018>.
  65. Yu J., Wei Z., Li Q., Wan F., Chao Z., Zhang X., Lin L., Meng H., Tian L., 2021, Advanced Cancer Starvation Therapy by Simultaneous Deprivation of Lactate and Glucose Using a MOF Nanoplatform, *Advanced Science*, 8(19). <https://doi.org/10.1002/adv.202101467>.
  66. Agrawal S., Singh G. K., Tiwari S., 2024, Focused Starvation of Tumor Cells Using Glucose Oxidase: A Comprehensive Review, *International*

- Journal of Biological Macromolecules*, 281, pp. 136444. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136444>.
67. Rusu A., Chiriac A., Nita L., Balan V., Serban A., Croitoriu A., 2022, Synthesis and Comparative Studies of Glucose Oxidase Immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles Using Different Coupling Agents, *Nanomaterials*, 12(14), pp. 2445. <https://doi.org/10.3390/nano12142445>.
  68. Zhao W., Hu J., Gao W., 2017, Glucose Oxidase–Polymer Nanogels for Synergistic Cancer-Starving and Oxidation Therapy, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(28), pp. 23528–23535. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b06814>.
  69. Fan W., Lu N., Huang P., Liu Y., Yang Z., Wang S., Yu G., Liu Y., Hu J., He Q., Qu J., Wang T., Chen X., 2017, Glucose-Responsive Sequential Generation of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide for Synergistic Cancer Starving-Like/Gas Therapy, *Angewandte Chemie International Edition*, 56(5), pp. 1229–1233. <https://doi.org/10.1002/anie.201610682>.
  70. Hoang D. Q., Tran T. V., Tran N. Q., Nguyen C. K., Nguyen T. H., Truong M. D., Tran D. L., Thu L. Van, Nguyen D. H., 2016, Functionalization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles with Biodegradable Chitosan-Grafted-MPEG for Paclitaxel Delivery, *Green Processing and Synthesis*, 5(5), pp. 459–466. <https://doi.org/10.1515/gps-2016-0093>.
  71. Vu M. T., Bach L. G., Nguyen D. C., Ho M. N., Nguyen N. H., Tran N. Q., Nguyen D. H., Nguyen C. K., Hoang Thi T. T., 2019, Modified Carboxyl-Terminated PAMAM Dendrimers as Great Cytocompatible Nano-Based Drug Delivery System, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), pp. 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms20082016>.
  72. Nguyen V. T., Doan P., Nguyen D. T., Doan V.-D., Dao T. P., Plavskii V., Nguyen B. T., Tran N. Q., 2022, Effect of Targeting Ligand Designation of Self-Assembly Chitosan-Poloxamer Nanogels Loaded Paclitaxel on Inhibiting MCF-7 Cancer Cell Growth, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(4), pp. 426–442. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1992587>.
  73. Thanh V. M., Nguyen T. H., Tran T. V., Ngoc U.-T. P., Ho M. N., Nguyen T. T., Chau Y. N. T., Le V. T., Tran N. Q., Nguyen C. K., Nguyen D. H., 2018, Low Systemic Toxicity Nanocarriers Fabricated from Heparin-

- MPEG and PAMAM Dendrimers for Controlled Drug Release, *Materials Science and Engineering: C*, 82, pp. 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.051>.
74. Nguyen Thi T. T., Tran T. V., Tran N. Q., Nguyen C. K., Nguyen D. H., 2017, Hierarchical Self-Assembly of Heparin-PEG End-Capped Porous Silica as a Redox Sensitive Nanocarrier for Doxorubicin Delivery, *Materials Science and Engineering: C*, 70, pp. 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.085>.
75. Le Thi P., Trung Nguyen D., An Nguyen Huu T., Tran Q.-H., Truong M.-D., Thanh Hang N., Quyen Tran N., Dong Park K., 2025, Hyaluronic Acid-Coated Silver Nanoparticles Releasing Doxorubicin for Combinatorial Antitumor Therapy, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 142, pp. 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2024.07.049>.
76. Zhang T., Li Y., Hong W., Chen Z., Peng P., Yuan S., Qu J., Xiao M., Xu L., 2019, Glucose Oxidase and Polydopamine Functionalized Iron Oxide Nanoparticles: Combination of the Photothermal Effect and Reactive Oxygen Species Generation for Dual-Modality Selective Cancer Therapy, *Journal of Materials Chemistry B*, 7(13), pp. 2190–2200. <https://doi.org/10.1039/C8TB03320J>.
77. Xu Z., Luo Q., He Y., He Y., Zhang X., Wang J., Ni S., Gao D., Wang D., 2024, Endogenous Nitric Oxide Releases In Situ for RNS/ROS Synergistic Cancer Therapy, *Advanced Functional Materials*, 34(17). <https://doi.org/10.1002/adfm.202314536>.
78. Villamena F. A., UV–Vis Absorption and Chemiluminescence Techniques, In *Reactive Species Detection in Biology*; Elsevier, 2017; pp 203–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420017-3.00006-2>.
79. Moon J.-K., Shibamoto T., 2009, Antioxidant Assays for Plant and Food Components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), pp. 1655–1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>.
80. Gay C., Gebicki J. M., 2000, A Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric–Xylenol Orange Hydroperoxide Assay, *Analytical Biochemistry*, 284(2), pp. 217–220. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>.

81. Geng S., Zhou Y., Ng G., Fan Q., Cheong S., Mazur F., Boyer C., Chandrawati R., 2025, Selenium Nanoparticles as Catalysts for Nitric Oxide Generation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 251, pp. 114592. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2025.114592>.
82. Hoang Thi T. T., Lee Y., Le Thi P., Park K. D., 2018, Nitric Oxide-Releasing Injectable Hydrogels with High Antibacterial Activity through in Situ Formation of Peroxynitrite, *Acta Biomaterialia*, 67, pp. 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.005>.
83. Kang M. H., Yoon H. Y., Choi Y. W., RIPL Peptide as a Novel Cell-Penetrating and Homing Peptide: Design, Characterization, and Application to Liposomal Nanocarriers for Hepsin-Specific Intracellular Drug Delivery,. In *Nanostructures for Cancer Therapy*; Elsevier, 2017; pp 129–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3.00005-2>.
84. Khalef L., Lydia R., Filicia K., Moussa B., 2024, Cell Viability and Cytotoxicity Assays: Biochemical Elements and Cellular Compartments, *Cell Biochemistry and Function*, 42(3). <https://doi.org/10.1002/cbf.4007>.
85. Masson-Meyers D. S., Bumah V. V., Enwemeka C. S., 2016, A Comparison of Four Methods for Determining Viability in Human Dermal Fibroblasts Irradiated with Blue Light, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 79, pp. 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.01.001>.
86. Murthy N. S., Damodaran V. B., Lee S. H., Hwang A. S., Sung H.-J., Characterization of Thin Films for Biomedical Applications,. In *Thin Film Coatings for Biomaterials and Biomedical Applications*; Elsevier, 2016; pp 81–115. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-453-6.00005-5>.
87. Kim H., Xue X., 2020, Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining, *Journal of Visualized Experiments*, No. 160. <https://doi.org/10.3791/60682>.
88. Karges J., 2026, Reactive Oxygen Species Detection with Fluorescent Probes: Limitations and Recommendations beyond DCFH-DA, *Journal of Medicinal Chemistry*, 69(3), pp. 1970–1981. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c03494>.

89. Fu Z., Chen R., 2019, Study of Complexes of Tannic Acid with Fe(III) and Fe(II), *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/3894571>.
90. Liu C., Liu H., Tang K., Zhang K., Zou Z., Gao X., 2020, High-Strength Chitin Based Hydrogels Reinforced by Tannic Acid Functionalized Graphene for Congo Red Adsorption, *Journal of Polymers and the Environment*, 28(3), pp. 984–994. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01663-5>.
91. Kamaruzaman A., Lah N. A. C., 2021, Formation of ZnO Nanoparticles in the Presence of Tannic Acid, *Materials Today: Proceedings*, 41, pp. 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.1007>.
92. Talam S., Karumuri S. R., Gunnam N., 2012, Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles, *ISRN Nanotechnology*, 2012, pp. 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/372505>.
93. Yedurkar S., Maurya C., Mahanwar P., 2016, Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Ixora Coccinea* Leaf Extract—A Green Approach, *Open Journal of Synthesis Theory and Applications*, 05(01), pp. 1–14. <https://doi.org/10.4236/ojsta.2016.51001>.
94. Altun S., Çakıroğlu B., Özacar M., Özacar M., 2015, A Facile and Effective Immobilization of Glucose Oxidase on Tannic Acid Modified CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, pp. 963–970. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.053>.
95. Benavidez T. E., Torrente D., Marucho M., Garcia C. D., 2014, Adsorption and Catalytic Activity of Glucose Oxidase Accumulated on OTCE upon the Application of External Potential, *Journal of Colloid and Interface Science*, 435, pp. 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.08.012>.
96. Tokmakov A. A., Kurotani A., Sato K.-I., 2021, Protein PI and Intracellular Localization, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.775736>.
97. Sharma S., Shukla P., Misra A., Mishra P. R., Interfacial and Colloidal Properties of Emulsified Systems,. In *Colloid and Interface Science in*

- Pharmaceutical Research and Development*; Elsevier, 2014; pp 149–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62614-1.00008-9>.
98. Kamble S., Agrawal S., Cherumukkil S., Sharma V., Jasra R. V., Munshi P., 2022, Revisiting Zeta Potential, the Key Feature of Interfacial Phenomena, with Applications and Recent Advancements, *ChemistrySelect*, 7(1). <https://doi.org/10.1002/slct.202103084>.
  99. Pate K., Safier P., Chemical Metrology Methods for CMP Quality,. In *Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)*; Elsevier, 2016; pp 299–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100165-3.00012-7>.
  100. Vagena I.-A., Malapani C., Gatou M.-A., Lagopati N., Pavlatou E. A., 2025, Enhancement of EPR Effect for Passive Tumor Targeting: Current Status and Future Perspectives, *Applied Sciences*, 15(6), pp. 3189. <https://doi.org/10.3390/app15063189>.
  101. Leporatti S., 2022, Thinking about Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR), *Journal of Personalized Medicine*, 12(8), pp. 1259. <https://doi.org/10.3390/jpm12081259>.
  102. Sultan M., Youssef A., Baseer R. A., 2024, Fabrication of Multifunctional ZnO@tannic Acid Nanoparticles Embedded in Chitosan and Polyvinyl Alcohol Blend Packaging Film, *Scientific Reports*, 14(1), pp. 18533. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68571-9>.
  103. Balogun S. W., James O. O., Sanusi Y. K., Olayinka O. H., 2020, Green Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles Using Bashful (*Mimosa Pudica*), Leaf Extract: A Precursor for Organic Electronics Applications, *SN Applied Sciences*, 2(3), pp. 504. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2127-3>.
  104. Gatou M.-A., Kontoliou K., Volla E., Karachalios K., Raptopoulos G., Paraskevopoulou P., Lagopati N., Pavlatou E. A., 2023, Optimization of ZnO Nanoparticles' Synthesis via Precipitation Method Applying Taguchi Robust Design, *Catalysts*, 13(10), pp. 1367. <https://doi.org/10.3390/catal13101367>.
  105. Pucci C., Martinelli C., De Pasquale D., Battaglini M., di Leo N., Degl'Innocenti A., Belenli Gümüş M., Drago F., Ciofani G., 2022, Tannic Acid–Iron Complex-Based Nanoparticles as a Novel Tool against

- Oxidative Stress, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(14), pp. 15927–15941. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c24576>.
106. Wahyono T., Astuti D. A., Gede Wiryawan I. K., Sugoro I., Jayanegara A., 2019, Fourier Transform Mid-Infrared (FTIR) Spectroscopy to Identify Tannin Compounds in The Panicle of Sorghum Mutant Lines, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 546(4), pp. 042045. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/546/4/042045>.
107. Chey C., Ibupoto Z., Khun K., Nur O., Willander M., 2012, Indirect Determination of Mercury Ion by Inhibition of a Glucose Biosensor Based on ZnO Nanorods, *Sensors*, 12(11), pp. 15063–15077. <https://doi.org/10.3390/s121115063>.
108. Uc-Cayetano E. G., Ordóñez L. C., Cauich-Rodríguez J. V., Avilés F., 2016, Enhancement of Electrochemical Glucose Sensing by Using Multiwall Carbon Nanotubes Decorated with Iron Oxide Nanoparticles, *International Journal of Electrochemical Science*, 11(7), pp. 6356–6369. <https://doi.org/10.20964/2016.07.85>.
109. Ma T. M., Zeng H., Zhao S. X., Huo W. S., 2019, Spectroscopic and Electrochemical Features of Glucose Oxidase Incorporation into Polyaniline-Cobaltous Oxalate Nano-Complex, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 29(1), pp. 279–289. <https://doi.org/10.1007/s10904-018-0986-5>.
110. Ahamed M., Javed Akhtar, Kumar, Khan M., Ahmad, Alrokayan, 2012, Zinc Oxide Nanoparticles Selectively Induce Apoptosis in Human Cancer Cells through Reactive Oxygen Species, *International Journal of Nanomedicine*, pp. 845. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29129>.
111. Biju R. F., G J., J J., A M., A S. P., V V., J M. L., J A. M. M., 2025, Structural, Spectroscopic, Thermal and Morphological Evaluation of Biogenic ZnO/Ag Nanocomposite Using Moringa Oleifera Seed Extract for Enhanced Antimicrobial Efficacy, *Chemical Physics Impact*, 10, pp. 100850. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2025.100850>.
112. Baek S.-H., Lee H.-J., Lee S.-N., 2018, Thickness Dependence of Crystal and Optical Characterization on ZnO Thin Film Grown by Atomic Layer Deposition, *AIP Advances*, 8(6). <https://doi.org/10.1063/1.5025685>.

113. Al-Shehaby N., Elshoky H. A., Zidan M., Salaheldin T. A., Gaber M. H., Ali M. A., El-Sayed N. M., 2025, In Vitro Localization of Modified Zinc Oxide Nanoparticles Showing Selective Anticancer Effects against Colorectal Carcinoma Using Biophysical Techniques, *Scientific Reports*, 15(1), pp. 16811. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-00434-3>.
114. Xu A., Vita J. A., Keaney J. F., 2000, Ascorbic Acid and Glutathione Modulate the Biological Activity of S-Nitrosoglutathione, *Hypertension*, 36(2), pp. 291–295. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.36.2.291>.
115. Tochigi M., Inoue T., Suzuki-Karasaki M., Ochiai T., Ra C., Suzuki-Karasaki Y., 2013, Hydrogen Peroxide Induces Cell Death in Human TRAIL-Resistant Melanoma through Intracellular Superoxide Generation, *International Journal of Oncology*, 42(3), pp. 863–872. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1769>.
116. Singh M., Sharma H., Singh N., 2007, Hydrogen Peroxide Induces Apoptosis in HeLa Cells through Mitochondrial Pathway, *Mitochondrion*, 7(6), pp. 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.07.003>.
117. Vilema-Enríquez G., Arroyo A., Grijalva M., Amador-Zafra R. I., Camacho J., 2016, Molecular and Cellular Effects of Hydrogen Peroxide on Human Lung Cancer Cells: Potential Therapeutic Implications, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1). <https://doi.org/10.1155/2016/1908164>.
118. Confino H., Goldshtein M., Puyesky S., Yarkoni S., Avniel A., Lisi S., Wolf I., 2022, Ultra-High Concentrations of Gaseous Nitric Oxide Show Rapid Cytotoxic Capabilities against Colon, Breast, Pancreatic and Other Cancer Cells *in Vitro*, *Cancer Research*, 82(12\_Supplement), pp. 1848–1848. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-1848>.
119. Gordon J. L., Hinsin K. J., Reynolds M. M., Smith T. A., Tucker H. O., Brown M. A., 2021, Anticancer Potential of Nitric Oxide (NO) in Neuroblastoma Treatment, *RSC Advances*, 11(16), pp. 9112–9120. <https://doi.org/10.1039/D1RA00275A>.
120. Gülден M., Jess A., Kammann J., Maser E., Seibert H., 2010, Cytotoxic Potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Cell Cultures: Impact of Cell Concentration and

- Exposure Time, *Free Radical Biology and Medicine*, 49(8), pp. 1298–1305. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.015>.
121. Chu Z., Yang J., Zheng W., Sun J., Wang W., Qian H., 2023, Recent Advances on Modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tumor Microenvironment for Enhanced Cancer Therapeutic Efficacy, *Coordination Chemistry Reviews*, 481, pp. 215049. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215049>.
  122. Toledano M. B., Planson A.-G., Delaunay-Moisan A., 2010, Reining in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for Safe Signaling, *Cell*, 140(4), pp. 454–456. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.003>.
  123. Di Marzo N., Chisci E., Giovannoni R., 2018, The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells, *Cells*, 7(10), pp. 156. <https://doi.org/10.3390/cells7100156>.
  124. Ul-Islam M., Alabbosh K. F., Manan S., Khan S., Ahmad F., Ullah M. W., 2024, Chitosan-Based Nanostructured Biomaterials: Synthesis, Properties, and Biomedical Applications, *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 7(1), pp. 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2023.07.002>.
  125. Liu H.-Y., Du L., Zhao Y.-T., Tian W.-Q., 2015, In Vitro Hemocompatibility and Cytotoxicity Evaluation of Halloysite Nanotubes for Biomedical Application, *Journal of Nanomaterials*, 2015(1). <https://doi.org/10.1155/2015/685323>.
  126. Serra M., Columbano A., Ammarah U., Mazzone M., Menga A., 2020, Understanding Metal Dynamics Between Cancer Cells and Macrophages: Competition or Synergism?, *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00646>.
  127. Bendellaa M., Lelièvre P., Coll J., Sancey L., Deniaud A., Busser B., 2024, Roles of Zinc in Cancers: From Altered Metabolism to Therapeutic Applications, *International Journal of Cancer*, 154(1), pp. 7–20. <https://doi.org/10.1002/ijc.34679>.
  128. Wang J., Zhao H., Xu Z., Cheng X., 2020, Zinc Dysregulation in Cancers and Its Potential as a Therapeutic Target, *Cancer Biology and Medicine*, 17(3), pp. 612–625. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0106>.

129. John E., Laskow T. C., Buchser W. J., Pitt B. R., Basse P. H., Butterfield L. H., Kalinski P., Lotze M. T., 2010, Zinc in Innate and Adaptive Tumor Immunity, *Journal of Translational Medicine*, 8(1), pp. 118. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-118>.
130. Tkachenko A., 2025, Ferroptosis Mediates Zinc Toxicity: Implications for Cancer Therapy, *BIOCELL*, 49(5), pp. 721–741. <https://doi.org/10.32604/biocell.2025.063301>.
131. Chen B., Yu P., Chan W. N., Xie F., Zhang Y., Liang L., Leung K. T., Lo K. W., Yu J., Tse G. M. K., Kang W., To K. F., 2024, Cellular Zinc Metabolism and Zinc Signaling: From Biological Functions to Diseases and Therapeutic Targets, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), pp. 6. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01679-y>.
132. Che Lah N. A., Kamaruzaman A., 2024, The Physico-Chemical and Antimicrobial Properties of Nano ZnO Functionalised Tannic Acid, *Scientific Reports*, 14(1), pp. 18596. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69632-9>.
133. Guo Y., Morshedi M., 2025, Cutting-Edge Nanotechnology: Unveiling the Role of Zinc Oxide Nanoparticles in Combating Deadly Gastrointestinal Tumors, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1547757>.
134. Bian S.-W., Mudunkotuwa I. A., Rupasinghe T., Grassian V. H., 2011, Aggregation and Dissolution of 4 Nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of PH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid, *Langmuir*, 27(10), pp. 6059–6068. <https://doi.org/10.1021/la200570n>.
135. Qu Z., Liu Q., Kong X., Wang X., Wang Z., Wang J., Fang Y., 2023, A Systematic Study on Zinc-Related Metabolism in Breast Cancer, *Nutrients*, 15(7), pp. 1703. <https://doi.org/10.3390/nu15071703>.
136. Mazzaccara C., Labruna G., Cito G., Scarfò M., De Felice M., Pastore L., Sacchetti L., 2008, Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains, *PLoS ONE*, 3(11), pp. e3772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003772>.

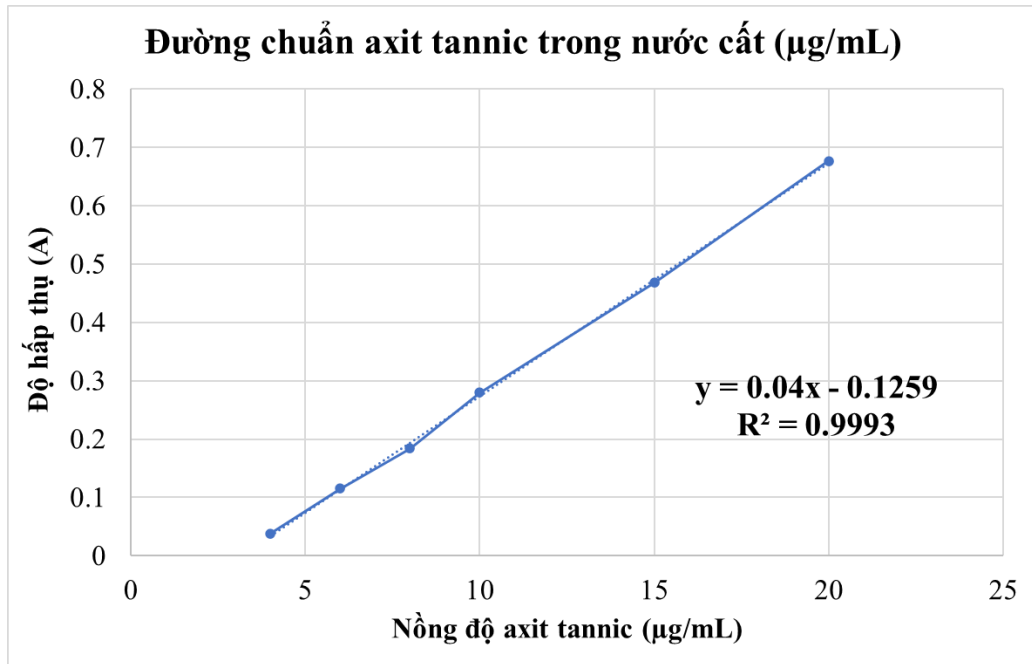
137. Santos E. W., Oliveira D. C. de, Hastreiter A., Silva G. B. da, Beltran J. S. de O., Tsujita M., Crisma A. R., Neves S. M. P., Fock R. A., Borelli P., 2016, Hematological and Biochemical Reference Values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c Mice, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 53(2), pp. 138. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145>.
138. Das B., Chattopadhyay P., Mishra D., Maiti T. K., Maji S., Narayan R., Karak N., 2013, Nanocomposites of Bio-Based Hyperbranched Polyurethane/Functionalized MWCNT as Non-Immunogenic, Osteoconductive, Biodegradable and Biocompatible Scaffolds in Bone Tissue Engineering, *Journal of Materials Chemistry B*, 1(33), pp. 4115. <https://doi.org/10.1039/c3tb20693a>.
139. O'Connell K. E., Mikkola A. M., Stepanek A. M., Vernet A., Hall C. D., Sun C. C., Yildirim E., Staropoli J. F., Lee J. T., Brown D. E., 2015, Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research., *Comparative medicine*, 65(2), pp. 96–113.
140. Raabe B. M., Artwohl J. E., Purcell J. E., Lovaglio J., Fortman J. D., 2011, Effects of Weekly Blood Collection in C57BL/6 Mice., *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 50(5), pp. 680–685.
141. Everds N., Hematology of the Mouse., In *The Laboratory Mouse*; Elsevier, 2004; pp 271–286. <https://doi.org/10.1016/B978-012336425-8/50070-4>.
142. Anandani G., Bhankhodia V., Dholariya S., 2025, Variations in Complete Blood Counts in Patients With Non-Hematological Malignancies: Insights From a Retrospective Hospital-Based Study, *Cureus*, <https://doi.org/10.7759/cureus.81257>.
143. Aynalem M., Adem N., Wendesson F., Misganaw B., Mintesnot S., Godo N., Getawa S., Adane T., Woldu B., Shiferaw E., 2022, Hematological Abnormalities before and after Initiation of Cancer Treatment among Breast Cancer Patients Attending at the University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital Cancer Treatment Center, *PLOS ONE*, 17(8), pp. e0271895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271895>.

144. Kassie T. D., Yimenu B. W., Baye Temesgen G., Shimelash R. A., Abneh A. A., 2025, Differences in the Count of Blood Cells Pre-and Post-Chemotherapy in Patients with Cancer: A Retrospective Study (2022), *Frontiers in Medicine*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1485676>.
145. Sultana G. S., Haque S. A., Sultana T., Ahmed A. N., 2013, Value of Red Cell Distribution Width (RDW) and RBC Indices in the Detection of Iron Deficiency Anemia., *Mymensingh medical journal: MMJ*, 22(2), pp. 370–376.
146. Haenggi E., Kaegi-Braun N., Wunderle C., Tribolet P., Mueller B., Stanga Z., Schuetz P., 2024, Red Blood Cell Distribution Width (RDW) – A New Nutritional Biomarker to Assess Nutritional Risk and Response to Nutritional Therapy?, *Clinical Nutrition*, 43(2), pp. 575–585. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.01.001>.
147. Sökmen F. C., Kasapoğlu B., Yozgat A., Engin H., 2019, Assessment of Hematological Parameters Before and After Adjuvant Chemotherapy in Patients with Colorectal Cancer, *Acta Oncologica Turcica*, 52(3), pp. 405–409. <https://doi.org/10.5505/aot.2019.20982>.

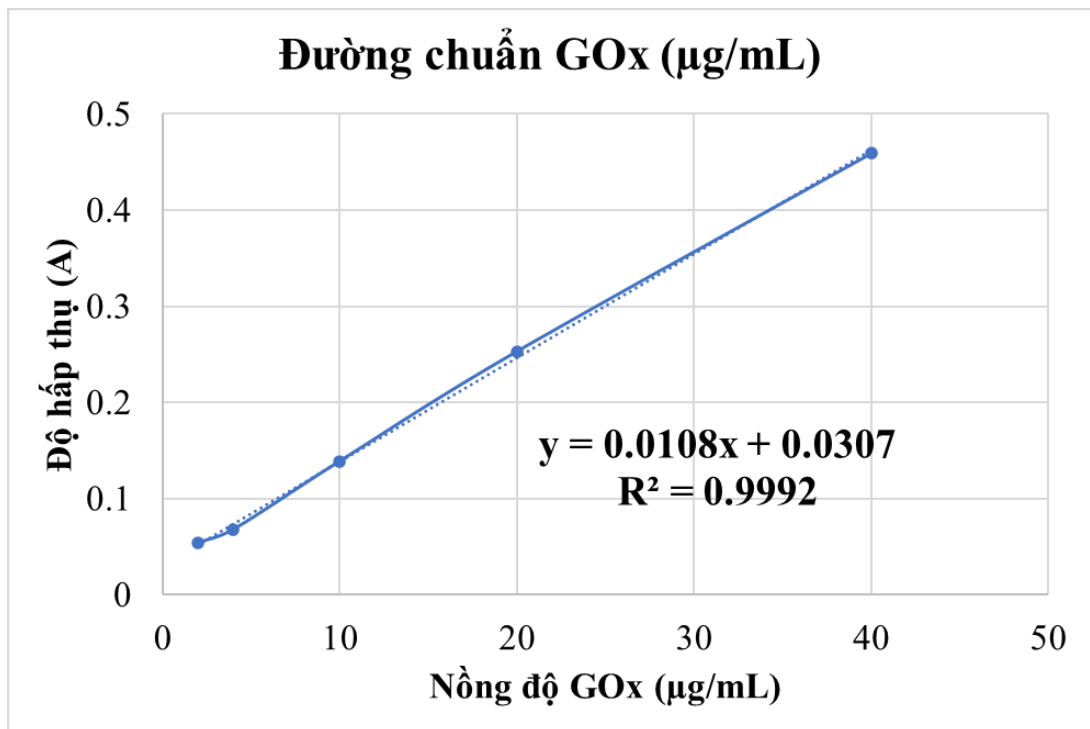
a

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1: Đường chuẩn axit tannic trong nước cất

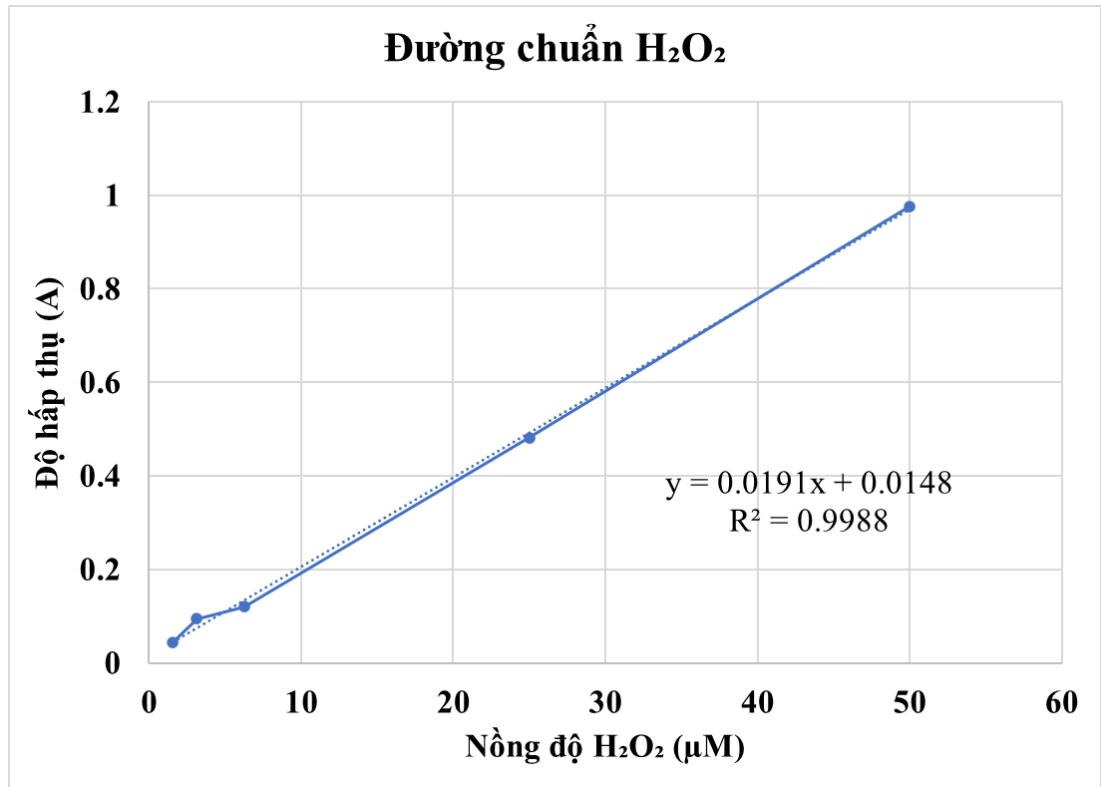


### Phụ lục 2: Đường chuẩn glucose oxidase

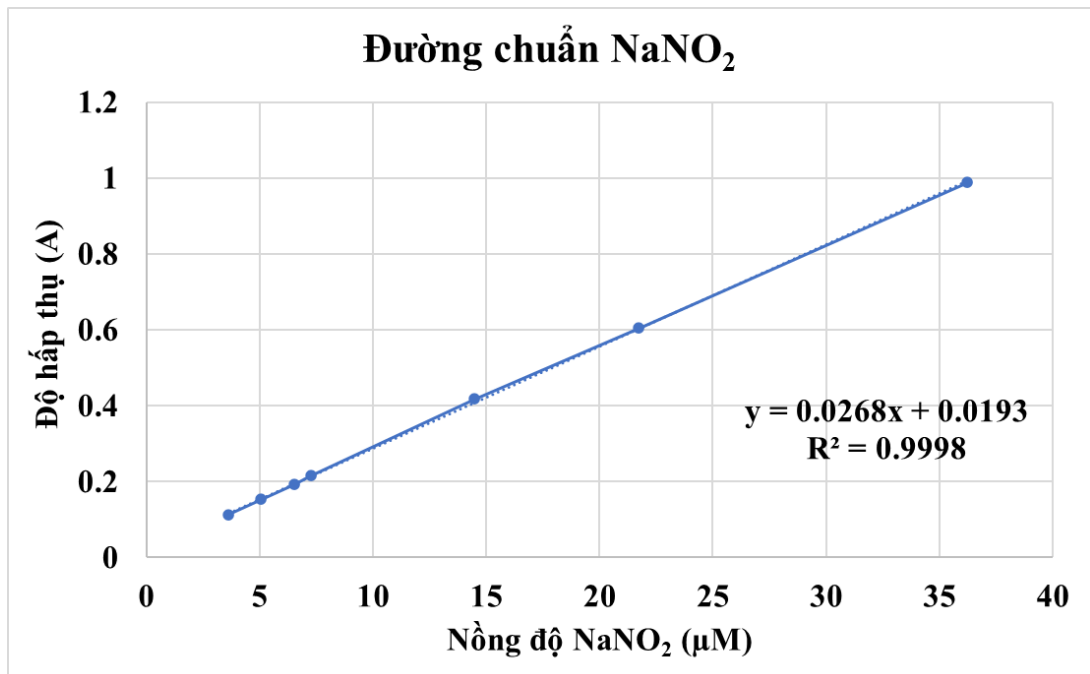


b

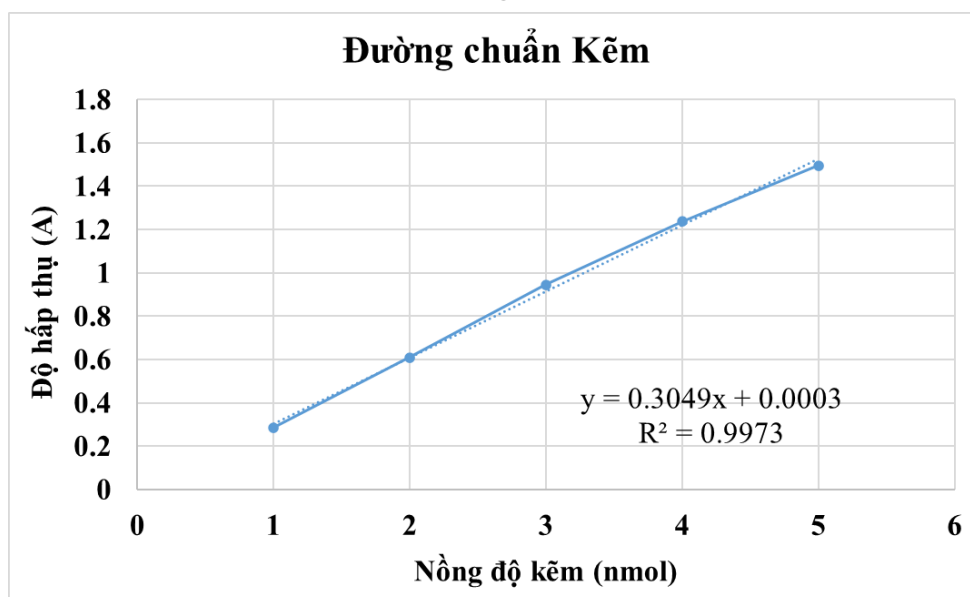
### Phụ lục 3: Đường chuẩn H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



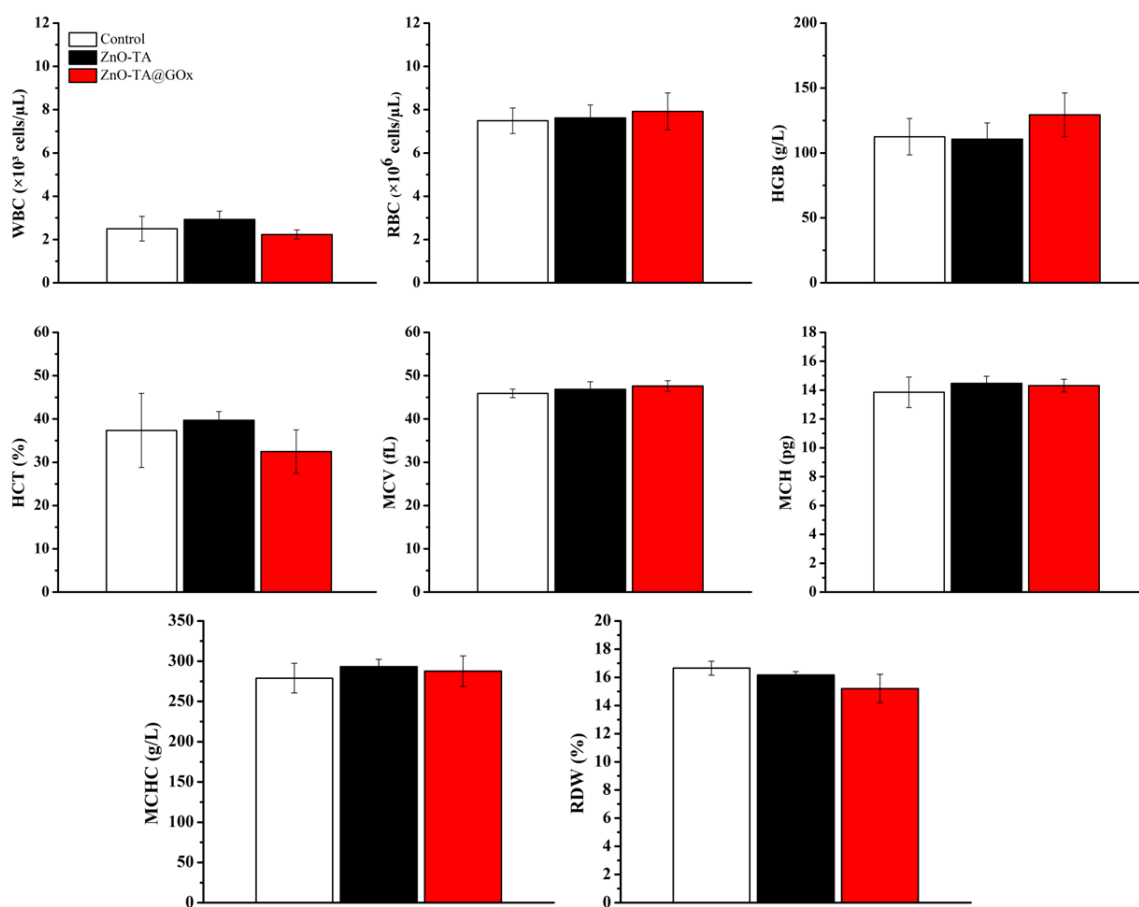
### Phụ lục 4: Đường chuẩn NaNO<sub>2</sub>



### Phụ lục 5: Đường chuẩn Kẽm

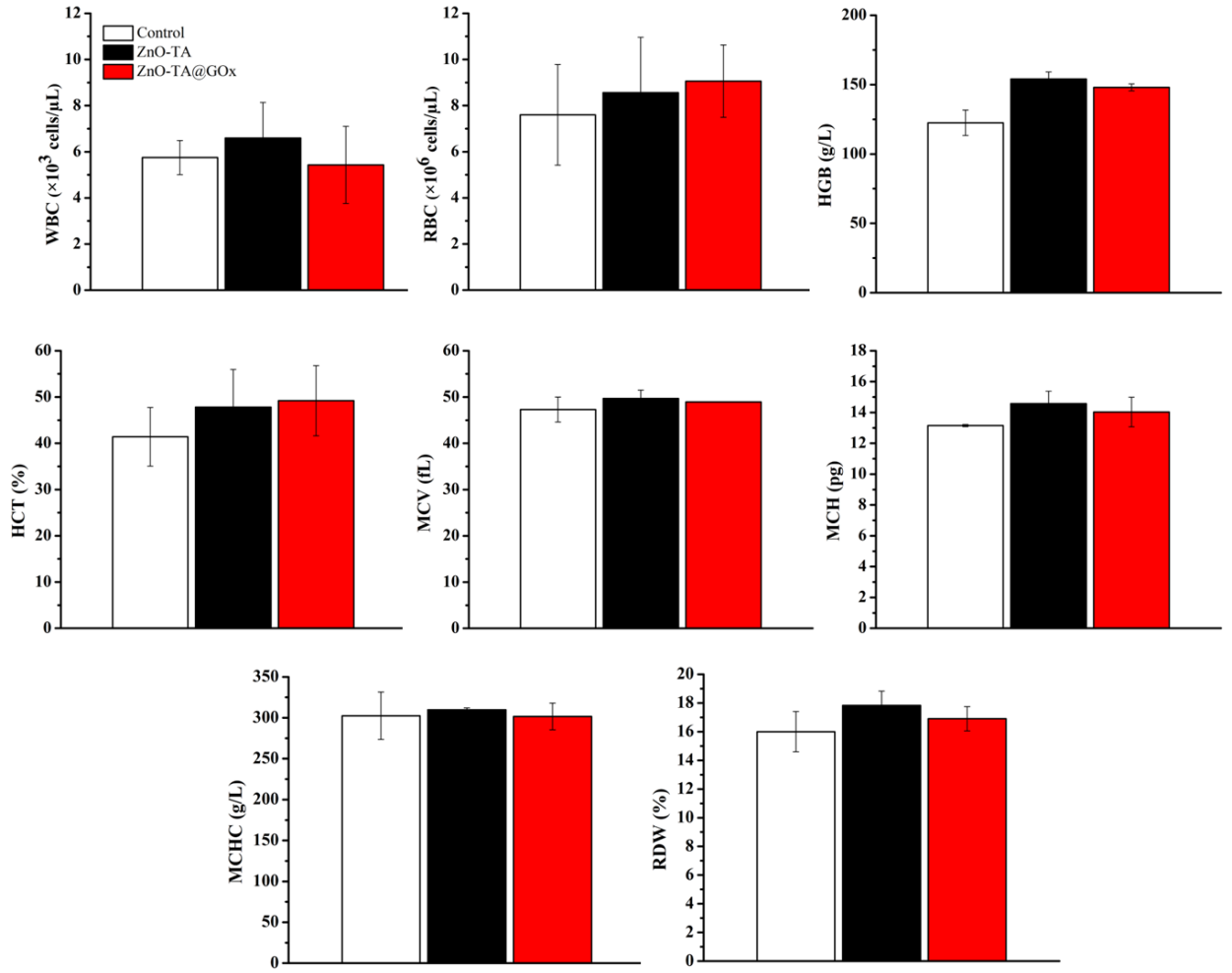


**Phụ lục 6:** Biểu đồ biểu diễn thông số huyết học của các nhóm chuột được xử lý với PBS, ZnO-TA và ZnO-TA@GOx NPs



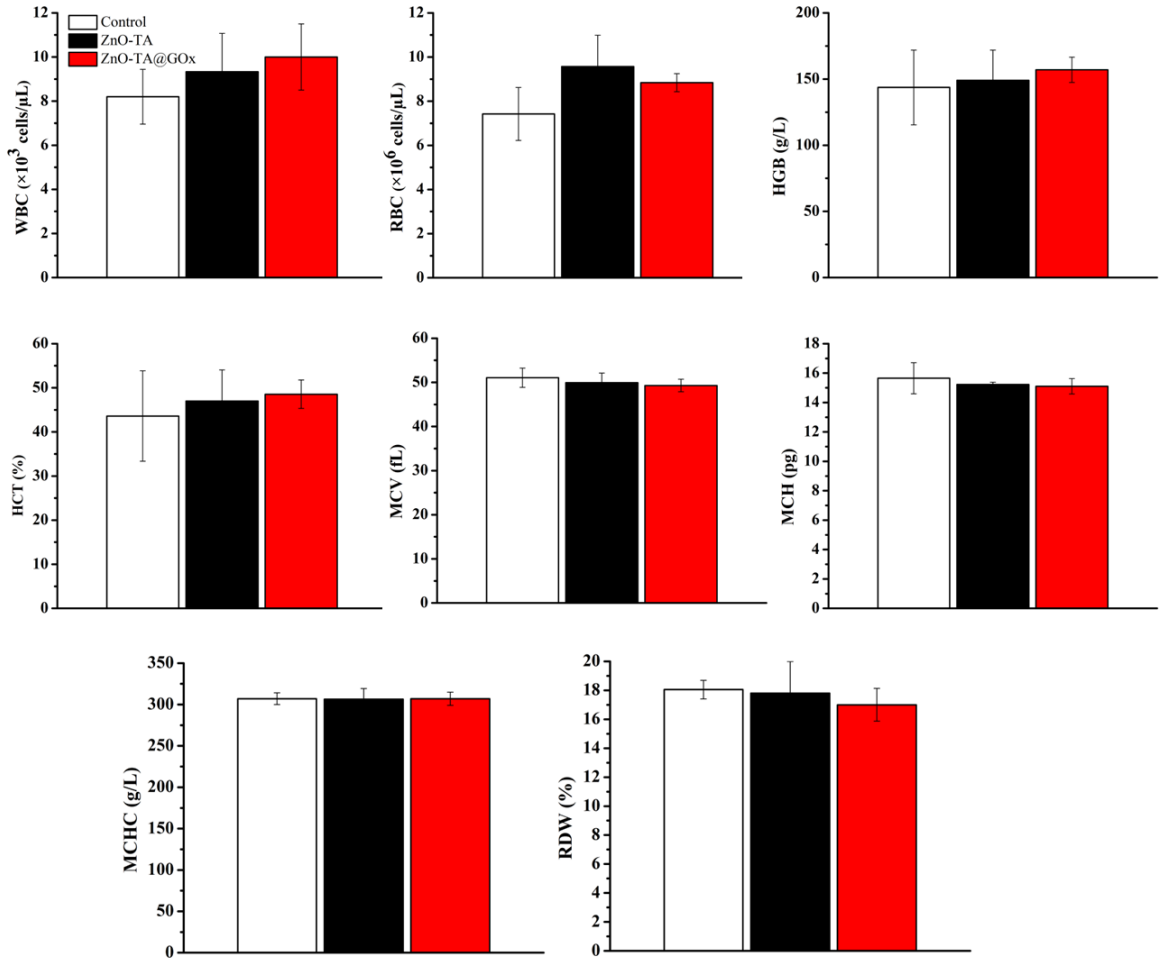
**Hình S1:** Các thông số huyết học toàn phần của chuột được điều trị và không điều trị tại ngày 0 của quá trình điều trị.

d



**Hình S2:** Các thông số huyết học toàn phần của chuột được điều trị và không điều trị tại ngày 6 của quá trình điều trị.

e



**Hình S3:** Các thông số huyết học toàn phần của chuột được điều trị và không điều trị sau 16 ngày điều trị.

Số 310 - QĐ/HVKHCN

Hà Nội, ngày 25 tháng 5 năm 2026

**QUYẾT ĐỊNH**  
**về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ**

- 
- Căn cứ Quyết định số 175-QĐ/VHLKHCNVN ngày 28/4/2026 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế Tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;
  - Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/8/2021 của Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;
  - Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;
  - Căn cứ Quyết định số 724/QĐ-HVKHCN ngày 28/6/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học đợt 1 năm 2024;
  - Căn cứ Quyết định số 987/QĐ-HVKHCN ngày 02/10/2025 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;
  - Xét đề nghị của Trưởng khoa Hóa học, Trưởng phòng Đào tạo,

**GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**  
**QUYẾT ĐỊNH**

**Điều 1.** Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Hoàng Kim Hường với đề tài: **“Nghiên cứu điều chế hệ nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư”**

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

**Điều 2.** Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký và phải đảm bảo thời hạn đào tạo theo quy định của Học viện. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

**Điều 3.** Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng khoa Hóa học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. *gks*

Nơi nhận:

- Như Điều 3,
- Lưu hồ sơ NCS,
- Lưu VT,ĐT, TN(9).



**GIÁM ĐỐC**

**PGS.TS. Hoàng Anh Sơn**

# DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 210/QĐ-HVKHCN ngày 25/5/2026  
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận văn của học viên: Hoàng Kim Hùng

Tên đề tài: "Nghiên cứu điều chế hệ nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư".

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

Người hướng dẫn: TS. Lê Thị Phương - Viện Công nghệ tiên tiến, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa	Hóa hữu cơ	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	GS.TS. Trần Ngọc Quyển	Hóa hữu cơ	Viện Công nghệ tiên tiến, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 1
3.	TS. Trương Minh Dũng	Hóa hữu cơ	Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh	Phản biện 2
4.	PGS.TS. Trần Quang Hiếu	Hóa phân tích	Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh	Ủy viên
5.	TS. Trần Diệu Linh	Hóa hữu cơ	Viện Công nghệ tiên tiến, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên- Thư ký

Hội đồng gồm 05 thành viên. *PL*

TP.HCM, ngày 09 tháng 6 năm 2026

## BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 310-QĐ/HVKHCN ngày 25/5/2026 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Hoàng Kim Hùng

Tên đề tài: **Nghiên cứu điều chế hệ nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư**

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

Hôm nay, ngày 09/6/2026 Hội đồng đã họp tại hội trường tầng trệt Viện Công nghệ tiên tiến vào lúc 14h00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

TT	Họ và tên	Chức danh
1.	GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa	Chủ tịch
2.	GS.TS. Trần Ngọc Quyên	Phản biện 1
3.	TS. Trương Minh Dũng	Phản biện 2
4.	PGS.TS. Trần Quang Hiếu	Ủy viên
5.	TS. Trần Diệu Linh	Ủy viên-Thư ký

Thành viên vắng mặt: 0

## NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lý lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
- Phản biện 1 đọc bản nhận xét và đặt câu hỏi:

- Trong kết quả WST-1, tại sao mẫu ZnO-TA ở nồng độ 100-200 ppm làm tăng khả năng sống của tế bào ung thư lên khoảng 110%, trong khi mẫu ZnO-TA@GOx ở cùng nồng độ hạt nano chỉ duy trì khả năng sống ở khoảng 80%?

- Tại sao lại chọn phương pháp tiêm trực tiếp lên khối u ung thư vú thay vì tiêm thông qua tĩnh mạch IV? Hàm lượng nano tiêm vào chuột được tính dựa trên khối u hay cơ thể chuột?

*Học viên trả lời:*

- Học viên cho biết ZnO-TA có khả năng tạo ra một lượng nhỏ ROS, chủ yếu là  $H_2O_2$ , dưới tác động của UV hoặc nhiệt độ. Ở nồng độ thấp,  $H_2O_2$  đóng vai trò như một phân tử tín hiệu tham gia điều hòa các quá trình tăng sinh tế bào, do đó có thể làm tăng khả năng sống của tế bào. Sau khi cố định glucose oxidase (GOx) lên bề mặt vật liệu, enzym này xúc tác quá trình oxy hóa glucose tạo ra lượng  $H_2O_2$  cao hơn, gây stress oxy hóa và làm giảm khả năng sống của tế bào. Vì vậy, ở cùng nồng độ khảo sát, ZnO-TA@GOx thể hiện độc tính tế bào cao hơn so với ZnO-TA.

- Về phương pháp đưa vật liệu vào cơ thể, học viên giải thích rằng mặc dù hệ nano có khả năng tích lũy thụ động tại khối u thông qua hiệu ứng EPR, hiệu quả phân bố thực tế thường còn hạn chế. Do đó, phương pháp tiêm trực tiếp vào khối u được lựa chọn nhằm đảm bảo đưa được lượng vật liệu tối đa đến vị trí điều trị, đồng thời giảm thất thoát do phân bố đến các cơ quan khác. Liều lượng vật liệu sử dụng trong thí nghiệm được tính toán dựa trên khối lượng cơ thể chuột ở mức 5 mg/kg.

6. Phân biệt 2 đọc bản nhận xét và đặt câu hỏi:

- Cơ chế nào giải thích việc ZnO-TA@GOx gây độc đối với tế bào ung thư nhưng vẫn duy trì độ an toàn tương đối đối với tế bào thường?

- Khi tiêm trực tiếp thì hàm lượng nano dư thừa trong cơ thể sẽ đi đâu, có thể bị phân hủy không?

*Học viên trả lời:*

- Học viên giải thích rằng tế bào ung thư có nhu cầu tiêu thụ glucose cao và nhạy cảm hơn với stress oxy hóa so với tế bào bình thường. Kết hợp với đặc điểm vi môi trường khối u có tính axit, hệ ZnO-TA@GOx có khả năng tạo ra lượng RONS cao hơn tại vị trí khối u, từ đó tăng hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư. Trong khi đó, tế bào bình thường có cơ chế chống oxy hóa hiệu quả hơn nên mức độ ảnh hưởng được hạn chế.

- Về khả năng phân hủy và đào thải, học viên cho biết trong môi trường axit của khối u, ZnO có thể hòa tan và giải phóng ion  $Zn^{2+}$ , làm giảm dần kích thước hạt. Đồng thời, axit tannic có thể bị phân hủy thành các phân tử nhỏ hơn như axit gallic, còn enzyme GOx bị các enzyme nội sinh phân giải thành peptide và axit amin. Các sản phẩm phân hủy này sau đó tiếp tục tham gia các quá trình chuyển hóa sinh học hoặc được đào thải qua gan và thận..

7. Các thành viên Hội đồng đọc bản nhận xét và đặt câu hỏi:

- PGS. TS. Trần Quang Hiếu: Hạt nano ZnO-TA được hình thành như thế nào?
- GS. TS. Nguyễn Cửu Khoa: ZnO ở dạng nào, nano hay ion  $Zn^{2+}$  tác động lên quá trình giết chết tế bào ung thư và tác động lên bộ phận nào để giết chết tế bào?

*Học viên trả lời:*

- Học viên cho biết hạt nano ZnO được tổng hợp thông qua quá trình kết tủa  $Zn(OH)_2$  từ ion  $Zn^{2+}$  trong môi trường kiềm, sau đó  $Zn(OH)_2$  bị phân hủy nhiệt tạo thành ZnO. Axit tannic với nhiều nhóm phenol có khả năng tạo liên kết phối trí với ion  $Zn^{2+}$  trên bề mặt hạt nano, từ đó hình thành lớp phủ TA ổn định.

- Về cơ chế tác động lên tế bào ung thư, học viên giải thích rằng trong môi trường axit đặc trưng của khối u, hạt nano ZnO bị hòa tan và giải phóng ion  $Zn^{2+}$ . Các ion này có thể tương tác với màng tế bào, đồng thời sau khi hạt nano được nội hóa vào tế bào, ZnO tiếp tục phân hủy trong lysosome và giải phóng thêm  $Zn^{2+}$  nội bào. Quá trình này kích thích sản sinh ROS, gây tổn thương DNA, rối loạn chức năng ty thể và thúc đẩy quá trình chết theo chương trình của tế bào ung thư.

8. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: TS. Trương Minh Dũng.

Ủy viên: PGS.TS. Trần Quang Hiếu.

Ủy viên: TS. Trần Diệu Linh.

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 05

Số phiếu thu về: 05

Tổng số điểm: 44

Điểm trung bình: 8,8

Điểm thưởng công trình công bố: 1,0

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 9,8

- Kết luận của Hội đồng: Luận văn đạt yêu cầu
- Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công bố: Nội dung và tên đề tài không trùng lặp với các công bố trước đây.

9. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

Luận văn đáp ứng các yêu cầu của một luận văn thạc sĩ. Yêu cầu học viên chỉnh sửa theo các góp ý của Hội đồng

Buổi họp đã kết thúc vào 14 giờ 50 phút ngày 09/6/2026.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 09 tháng 6 năm 2026

**THƯ KÝ HỘI ĐỒNG**



**TS. Trần Diệu Linh**

**CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG**



**GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa**

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO,  
KT. GIÁM ĐỐC  
PHÓ GIÁM ĐỐC**



**Nguyễn Thị Trung**



# CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

**Độc lập – Tự do – Hạnh phúc**

## **BẢN NHẬN XÉT LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ và tên người nhận xét: GS.TS. Trần Ngọc Quyên

Học hàm, học vị: Giáo sư, Tiến sĩ

Ngành: Hoá hữu cơ

Cơ quan công tác: Viện Công tiên tiến

Họ và tên học viên: Hoàng Kim Hương

Tên đề tài: Nghiên cứu điều chế hệ nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư

Ngành: Hoá hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

### **NỘI DUNG NHẬN XÉT**

#### **1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:**

Đề tài tập trung vào hướng nghiên cứu vật liệu nano ứng dụng trong điều trị ung thư - một lĩnh vực đang nhận được nhiều sự quan tâm trong nước và quốc tế do nhu cầu tìm kiếm các giải pháp điều trị hiệu quả và an toàn hơn cho người bệnh. Việc khai thác các hệ nano đa chức năng nhằm tăng khả năng tiêu diệt tế bào ung thư theo cơ chế chọn lọc, đồng thời hạn chế tác động lên tế bào bình thường, là xu hướng nghiên cứu phù hợp với định hướng phát triển của y học hiện đại.

Luận văn lựa chọn nền vật liệu nano oxit kẽm kết hợp với axit tannic và glucose oxidase là hướng tiếp cận có cơ sở khoa học và tính ứng dụng. ZnO là vật liệu có nhiều ưu điểm như dễ tổng hợp, chi phí thấp, có khả năng tạo các gốc oxy hóa trong môi trường khối u; trong khi đó axit tannic góp phần tăng độ ổn định của hệ vật liệu và hỗ trợ biến tính bề mặt. Việc tích hợp enzyme glucose oxidase giúp khai thác thêm cơ chế bổ đói tế bào ung thư thông qua quá trình tiêu thụ glucose nội bào. Sự phối hợp nhiều cơ chế trong cùng một hệ nano cho thấy định hướng nghiên cứu có tính mới và phù hợp với xu hướng phát triển các hệ trị liệu hiệp đồng hiện nay. Về mặt khoa học, luận văn đã xây dựng và khảo sát tương đối đầy đủ đặc tính của hệ nano ZnO-TA@GOx thông qua các phương pháp phân tích hiện đại, đồng thời đánh giá được hoạt tính sinh học của vật liệu trên cả mô hình *in vitro* và *in vivo*. Kết quả nghiên cứu góp phần bổ sung thêm dữ liệu cho hướng nghiên cứu vật liệu nano oxit kim loại biến tính sinh học trong điều trị ung thư, đặc biệt là các hệ nano có khả năng kết hợp đồng thời liệu pháp stress oxy hóa và liệu pháp chuyển hóa. Về mặt thực tiễn, kết quả của đề tài cho thấy hệ nano

nghiên cứu có tiềm năng ứng dụng trong phát triển các hệ dẫn truyền và điều trị ung thư thể hệ mới. Nghiên cứu cũng góp phần mở rộng định hướng ứng dụng công nghệ nano trong lĩnh vực y sinh tại Việt Nam, đồng thời tạo tiền đề cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn cũng như khả năng phát triển thành các công bố khoa học trong tương lai.

**2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:**

Đề tài có tính mới nhất định khi tích hợp đồng thời ZnO, axit tannic và glucose oxidase trong cùng một hệ nano nhằm khai thác hiệu ứng hiệp đồng giữa stress oxy hóa và liệu pháp bổ dôi tế bào ung thư. Qua phân tổng quan cho thấy tác giả đã có đối chiếu với nhiều công trình trong và ngoài nước, đồng thời xác định được khoảng trống nghiên cứu tương đối rõ ràng. Luận văn được trình bày trung thực, có hệ thống tài liệu tham khảo tương đối đầy đủ, cập nhật và phù hợp với nội dung nghiên cứu.

**3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:**

Tên đề tài phù hợp với lĩnh vực hóa dược thuộc chuyên ngành hóa hữu cơ và khớp với nội dung nghiên cứu thực hiện trong luận văn.

**4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:**

Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong luận văn phù hợp với nội dung và mục tiêu của đề tài, đảm bảo độ tin cậy cho quá trình đánh giá hệ vật liệu nano nghiên cứu. Quy trình thực nghiệm được xây dựng tương đối hợp lý, bao gồm từ giai đoạn tổng hợp vật liệu, khảo sát đặc tính hóa lý đến đánh giá hoạt tính sinh học của hệ nano. Các kỹ thuật phân tích và thử nghiệm được lựa chọn đều là những phương pháp phổ biến và được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực vật liệu nano y sinh hiện nay. Bên cạnh đó, các kết quả thực nghiệm được trình bày khá rõ ràng, có xử lý và so sánh số liệu giữa các nhóm nghiên cứu, góp phần tăng độ tin cậy và giá trị khoa học của luận văn.

**5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:**

Luận văn đã tổng hợp thành công hệ nano ZnO biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase theo định hướng ứng dụng trong điều trị ung thư. Hệ vật liệu thu được được đánh giá tương đối đầy đủ về đặc tính cấu trúc, hình thái và hoạt tính sinh học bằng các phương pháp phân tích phù hợp. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc biến tính bề mặt bằng axit tannic và glucose oxidase giúp cải thiện độ ổn định của hệ nano. Hệ ZnO-TA@GOx có khả năng kết hợp giữa cơ chế sinh ROS/RNS và liệu pháp bổ dôi tế bào thông qua phản ứng xúc tác oxy hoá glucose nội bào, qua đó góp phần nâng cao hiệu quả gây độc trên tế bào ung thư.

Thử nghiệm *in vitro* ghi nhận hệ vật liệu có khả năng ức chế đáng kể sự phát triển của dòng tế bào ung thư MCF-7, trong khi mức độ ảnh hưởng lên tế bào thường thấp hơn. Các phép thử tương thích sinh học cũng cho thấy vật liệu có khả năng tương thích máu tương đối tốt trong điều kiện khảo sát.

Đối với mô hình chuột mang khối u, hệ nano nghiên cứu cho thấy khả năng làm chậm sự phát triển của khối u so với nhóm đối chứng mà chưa ghi nhận dấu hiệu độc tính rõ rệt trong điều kiện khảo sát. Các kết quả thu được bước đầu cho thấy hệ nano ZnO-TA@GOx có tiềm năng ứng dụng trong phát triển các hệ vật liệu nano đa chức năng phục vụ điều trị ung thư.

## **6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung và hình thức:**

Luận văn còn tồn tại nhiều hạn chế và thiếu sót như sau:

### *Về nội dung:*

Các thử nghiệm *in vivo* bước đầu cho thấy hiệu quả ức chế khối u khả quan, tuy nhiên, thời gian theo dõi còn tương đối ngắn và chưa đánh giá đầy đủ độc tính lâu dài trên các cơ quan như gan, thận hoặc khả năng phân bố sinh học của vật liệu trong cơ thể.

Luận văn chưa thực hiện so sánh trực tiếp với các thuốc hóa trị thương mại hoặc các hệ nano tương tự đã được công bố trước đó, do đó ưu thế nổi bật của hệ vật liệu nghiên cứu vẫn chưa được thể hiện thật rõ nét.

Luận văn mới chỉ dừng ở bước đánh giá hiệu quả sinh học ban đầu của hệ nano ZnO-TA@GOx mà chưa khảo sát đầy đủ quá trình phân hủy sinh học và khả năng đào thải của vật liệu trong cơ thể. Các dữ liệu liên quan đến tốc độ phân hủy của hệ nano trong môi trường sinh lý, sự giải phóng ion  $Zn^{2+}$  theo thời gian cũng như khả năng tích lũy của vật liệu tại các cơ quan chưa được làm rõ. Ngoài ra, cơ chế đào thải của hệ nano sau điều trị và nguy cơ tồn lưu vật liệu trong cơ thể vẫn chưa được đánh giá đầy đủ, do đó cần có thêm các nghiên cứu chuyên sâu hơn để khẳng định tính an toàn sinh học và tiềm năng ứng dụng lâu dài của hệ vật liệu trong điều trị ung thư.

### *Về hình thức:*

Về hình thức trình bày, luận văn nhìn chung được trình bày tương đối rõ ràng và có bố cục hợp lý. Tuy nhiên vẫn còn một số lỗi nhỏ trong quá trình xử lý văn bản như khoảng cách dòng chưa đều, căn lề giữa các mục chưa thống nhất hoặc lỗi định dạng ký tự. Học viên cần rà soát kỹ hơn để hoàn thiện hình thức trình bày của luận văn. Một số hình ảnh còn chưa thật sự rõ nét, học viên cần điều chỉnh lại chất lượng hình ảnh. Trong luận văn, cách trình bày dấu thập phân ở một số bảng biểu và số liệu chưa thật sự thống nhất, còn xen kẽ giữa dấu phẩy và dấu chấm trong cùng văn bản.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nội dung nghiên cứu của luận văn đã được xuất bản trên tạp chí uy tín quốc tế (Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Q1 (SJR), IF 5.4)

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Nội dung và các kết quả của luận văn đáp ứng được yêu cầu của một luận văn Thạc sĩ chuyên ngành hoá hữu cơ. Luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 04 tháng 6 năm 2026

**Người phản biện**

(Ký, ghi rõ họ tên)



Trần Ngọc Duyên

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**  
**Độc lập – Tự do – Hạnh phúc**

**BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ và tên người phản biện: Trương Minh Dũng

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Ngành: Công nghệ sinh học

Cơ quan công tác: Trung tâm Công nghệ sinh học TPHCM.

Họ và tên học viên: Hoàng Kim Hường

Tên đề tài: Nghiên cứu điều chế hệ nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư.

Ngành: Hoá hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

**NỘI DUNG NHẬN XÉT**

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Tính cấp thiết và tính thời sự của đề tài: Trong bối cảnh ung thư đang trở thành gánh nặng bệnh tật và kinh tế - xã hội toàn cầu với tỷ lệ tử vong cao, việc tìm kiếm các phương pháp điều trị mới là một yêu cầu cấp bách. Các liệu pháp truyền thống như hóa trị hay xạ trị hiện vẫn đối mặt với nhiều thách thức lớn, như độc tính toàn thân cao, tính chọn lọc kém và nguy cơ kháng da thuốc (MDR). Đề tài mang tính thời sự cao khi tiếp cận xu hướng phát triển các hệ vật liệu nano đa chức năng, tích hợp liệu pháp "bỏ đói" tế bào (starvation therapy) thông qua enzyme glucose oxidase và gây stress oxy hóa bằng các gốc tự do RONS từ hạt nano ZnO. Đây là hướng đi tiên phong tại Việt Nam, khi chưa có nghiên cứu nào ghi nhận việc kết hợp đồng thời khả năng tạo RONS của ZnO và liệu pháp bỏ đói dựa trên GOx trong cùng một hệ thống để điều trị ung thư.

Ý nghĩa khoa học của đề tài: Về mặt lý luận và thực nghiệm, luận văn đã đóng góp một quy trình điều chế hệ nano ZnO-TA@GOx ổn định, đồng thời làm sáng tỏ cơ chế tác động hiệp đồng giữa việc tiêu thụ glucose nội bào và khuếch đại tổn thương oxy hóa. Nghiên cứu đã chứng minh tính chọn lọc sinh học vượt trội của hệ vật liệu thông qua khả năng đáp ứng với vi môi trường khối u (pH thấp, nồng độ glucose cao) để giải phóng ion  $Zn^{2+}$ ,  $H_2O_2$  và NO. Kết quả thử nghiệm in vitro xác nhận hệ nano gây độc chọn lọc trên tế bào ung thư MCF-7 mà không ảnh hưởng đáng kể đến tế bào lành HDFs, qua đó cung cấp cơ sở dữ liệu khoa học quan trọng cho việc phát triển các hệ dẫn truyền thông minh dựa trên nền tảng oxit kim loại.

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài: Kết quả nghiên cứu mang lại giá trị thực tiễn lớn khi mở ra tiềm năng ứng dụng một nền tảng vật liệu mới giúp nâng cao hiệu quả điều trị và giảm tác dụng phụ so với hóa trị truyền thống. Thử nghiệm in vivo trên mô hình chuột đã chứng minh khả năng ức chế khối u thực tế (thể tích khối u giảm hơn 50% so với nhóm đối chứng sau 16 ngày), mà không gây độc tính toàn thân và không làm thay đổi tiêu cực các chỉ số huyết học. Luận văn không chỉ dừng lại ở các kết quả thực nghiệm mà còn đặt nền móng cho các nghiên cứu tiếp theo về việc gắn thêm phối tử hướng đích

hoặc bao gói thuốc hoá trị để tối ưu hoá liệu pháp điều trị ung thư đa cơ chế trong tương lai.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Về tính không trùng lặp của đề tài nghiên cứu: Đề tài "Nghiên cứu điều chế hệ nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư" được khẳng định là công trình nghiên cứu độc lập của học viên. Các kết quả thực nghiệm về hệ nano ZnO-TA@GOx tích hợp đa cơ chế (liệu pháp bổ đỏi và stress oxy hóa) là mới và chưa từng xuất hiện trong các nghiên cứu đã công bố trước đây. Tại Việt Nam, mặc dù đã có nhiều công trình về hệ phân phối thuốc nano kim loại, nhưng chưa ghi nhận nghiên cứu nào về việc kết hợp đồng thời khả năng tạo gốc tự do RONS của ZnO NPs với liệu pháp bổ đỏi dựa trên enzyme GOx. Điều này khẳng định tính độc lập và hướng đi mới mẻ của đề tài trong nước. Trên thế giới, việc tích hợp đồng thời ba thành phần ZnO, TA và GOx vào một hệ nano đa chức năng để khai thác hiệu ứng hiệp đồng vẫn còn rất hạn chế. Đề tài đã lấp đầy khoảng trống nghiên cứu này bằng các minh chứng khoa học cụ thể về cơ chế tác động phối hợp.

Về tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn: Học viên đã thể hiện sự nghiêm túc và trung thực trong nghiên cứu, cam đoan các số liệu và kết quả trong luận văn là khách quan và do chính mình thực hiện. Sự công nhận quốc tế thông qua việc công bố kết quả nghiên cứu trên tạp chí khoa học uy tín Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects (2026) là minh chứng rõ nét cho giá trị cũng như tính chính xác của dữ liệu này. Luận văn thực hiện trích dẫn tài liệu tham khảo một cách rõ ràng và đầy đủ, với danh mục gồm 148 tài liệu trong và ngoài nước. Các thông tin về tổng quan tình hình nghiên cứu, các cơ chế khoa học và phương pháp thực nghiệm đều được dẫn nguồn cụ thể từ các công trình khoa học uy tín trên thế giới. Hệ thống danh mục ký hiệu, chữ viết tắt, danh mục bảng và hình vẽ được trình bày khoa học, giúp việc tra cứu và đối chiếu thông tin trong luận văn trở nên thuận tiện và minh bạch hơn.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Sự phù hợp giữa tên đề tài và chuyên ngành đào tạo: Tên đề tài "Nghiên cứu điều chế hệ nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư" hoàn toàn phù hợp với chuyên ngành Hóa hữu cơ. Nội dung tập trung vào việc sử dụng các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc tự nhiên (axit tannic) và các phân tử sinh học (enzyme glucose oxidase) để biến tính bề mặt vật liệu nano. Đây là những đối tượng nghiên cứu then chốt trong lĩnh vực hóa hữu cơ hiện đại và hóa học các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Sự phù hợp với mã số đào tạo: Đề tài được thực hiện đúng theo mã số chuyên ngành đào tạo thạc sĩ Hóa hữu cơ là 8440114. Các phương pháp tổng hợp hữu cơ, kỹ thuật phân tích cấu trúc (FTIR, UV-Vis) và đánh giá hoạt tính sinh học được trình bày trong luận văn đều nằm trong chương trình đào tạo và yêu cầu khoa học của mã số này.

Đề tài có sự thống nhất cao từ tên gọi đến nội dung triển khai, đáp ứng hoàn toàn các tiêu chí về chuyên môn và quy định đào tạo đối với trình độ Thạc sĩ chuyên ngành Hóa hữu cơ.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Tính hiện đại của các kỹ thuật phân tích hóa lý: Luận văn đã sử dụng hệ thống các thiết bị phân tích hiện đại và đồng bộ để xác định đặc tính của vật liệu nano, bao gồm: Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) và Nhiễu xạ tia X (XRD) để xác định cấu trúc hóa học và cấu trúc tinh thể wurtzite của ZnO; Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và quét (SEM) giúp quan sát trực quan hình thái hạt dạng cầu và kích thước hạt ở mức độ nanomet, Tán xạ ánh sáng động (DLS) và thế Zeta để đánh giá độ đồng nhất (PDI) cũng như độ ổn định của hệ hạt trong môi trường phân tán.

Độ tin cậy của các thử nghiệm sinh học in vitro: Các phương pháp đánh giá hoạt tính enzyme và khả năng tạo gốc tự do được thực hiện thông qua các bộ kit chuẩn hóa (Micro BCA, Peroxide Assay, thuốc thử Griess) và đo quang phổ trên máy đọc đĩa hiện đại, đảm bảo độ chính xác và khả năng lặp lại cao. Độc tính tế bào được đánh giá định lượng bằng phép thử WST-1 và định tính bằng nhuộm sống/chết (calcein-AM/EthD-1) trên 2 dòng tế bào đối chứng: tế bào ung thư (MCF-7) và tế bào lành (hDFBs), qua đó khẳng định tính chọn lọc sinh học của vật liệu.

Tính toàn diện của thử nghiệm in vivo: Nghiên cứu không chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm mà còn được triển khai trên mô hình chuột mang khối u dị ghép (xenograft), đồng thời tuân thủ các quy định nghiêm ngặt của Hội đồng Đạo đức. Việc theo dõi thể tích khối u, khối lượng cơ thể, kết hợp với phân tích huyết học toàn phần và nhuộm H&E mô bệnh học, cung cấp bằng chứng thực tế, tin cậy về hiệu quả điều trị và độ an toàn sinh học của hệ nano trên cơ thể sống.

Kết quả của công trình đã được công bố trên tạp chí quốc tế uy tín thuộc hệ thống Elsevier (Colloids and Surfaces A), qua đó khẳng định mạnh mẽ độ tin cậy và giá trị khoa học của phương pháp nghiên cứu mà tác giả đã lựa chọn.

Đánh giá chung: Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong luận văn có tính hệ thống, hiện đại và đạt độ tin cậy cao, phù hợp với tiêu chuẩn nghiên cứu trong lĩnh vực hóa sinh và nano y sinh hiện nay.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Tính toàn diện và tính hệ thống của kết quả nghiên cứu: Luận văn đã đạt được các kết quả nghiên cứu một cách toàn diện và có tính hệ thống cao, bám sát các nội dung và mục tiêu đề ra ban đầu. Học viên đã xây dựng thành công quy trình tổng hợp hệ nano ZnO-TA@GOx với đặc trưng hóa lý ổn định, hạt có hình cầu đồng nhất và kích thước thủy động học khoảng 210 nm. Các kỹ thuật phân tích hiện đại đã xác nhận sự hiện diện của các thành phần và cấu trúc mạng tinh thể wurtzite đặc trưng của ZnO vẫn được bảo toàn sau khi biến tính bề mặt. Kết quả thực nghiệm cho thấy hệ vật liệu có khả năng phân tán tốt trong nước và đạt kích thước tối ưu để tích lũy tại khối u thông qua hiệu ứng EPR.

Đóng góp về mặt khoa học và cơ chế tác động: Về mặt khoa học, luận văn đã minh chứng thành công khả năng đáp ứng yêu cầu về môi trường khối u của hệ nano để tạo ra hiệu ứng hiệp đồng trong điều trị ung thư. Các thử nghiệm in vitro khẳng định enzyme GOx sau khi cố định vẫn duy trì hoạt tính xúc tác mạnh mẽ, tiêu thụ glucose để tạo ra  $H_2O_2$  (542  $\mu M$ ) và làm giảm pH môi trường, từ đó thúc đẩy sự giải phóng ion  $Zn^{2+}$  gây độc. Đồng thời, khả năng xúc tác của ZnO trong việc giải phóng NO (187  $\mu M$ ) từ các chất nội sinh cũng được làm rõ, tạo nên một hệ thống sản sinh RONS đa dạng giúp khuếch đại stress oxy hóa nội bào.

Hiệu quả điều trị và tính an toàn sinh học: Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học cho thấy giá trị thực tiễn rất lớn của đề tài khi chứng minh được độc tính chọn lọc trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 với giá trị IC50 khoảng 100 ppm khi có mặt glucose, trong khi vẫn đảm bảo độ tương thích cao với tế bào lành hDFBs. Đặc biệt, trên mô hình in vivo, hệ nano đã thể hiện khả năng ức chế khối u vượt trội, làm giảm đáng kể thể tích khối u so với nhóm đối chứng sau 16 ngày điều trị. Tính an toàn sinh học của vật liệu cũng được khẳng định qua tỷ lệ tán huyết thấp (dưới 5%) và sự ổn định của các chỉ số huyết học, cũng như trọng lượng cơ thể chuột, trong suốt quá trình thử nghiệm.

Đánh giá chung: Các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận văn là đáng tin cậy, có giá trị đóng góp mới cho lĩnh vực y sinh nano và đã được cộng đồng khoa học công nhận thông qua việc công bố trên các tạp chí quốc tế uy tín.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung và hình thức:

Lỗi định dạng văn bản: Trong phần Mục lục, một số mục vẫn còn hiển thị lỗi "Error! Bookmark not defined" (ví dụ: mục 3.1.4 và Danh mục công trình của tác giả), cho thấy sự thiếu sót trong khâu kiểm tra kỹ thuật cuối cùng trước khi hoàn thiện bản in.

Chú thích hình ảnh: Cần giải thích chi tiết hơn cho từng hình ảnh.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Nội dung của luận văn đã được viết thành một bài báo.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Câu hỏi:

1/ Tại sao ở cùng nồng độ xử lý, hệ nano lại có thể gây độc mạnh lên tế bào ung thư MCF-7 (hơn 70%) nhưng vẫn đảm bảo an toàn cho tế bào hDFBs? Tác giả hãy làm rõ hơn các cơ chế bảo vệ nội sinh khác nhau giữa tế bào lành và tế bào ung thư.

2/ Phương pháp được sử dụng trong thí nghiệm in vivo là tiêm trực tiếp vào khối u. Tác giả hãy đánh giá khả năng duy trì hiệu quả ức chế khối u và tính an toàn nếu chuyển sang đường tiêm tĩnh mạch.

Kết luận chung: Đề nghị luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

TP. HCM, ngày 29 tháng 5 năm 2026

**Người phản biện**

(Ký, ghi rõ họ tên)



Trương Minh Dũng

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Thanh Ngân, phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT: 0989322368

\*  
BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN  
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ tên học viên: Hoàng Kim Hùng

Lớp: CHE2024A-1

Tên đề tài luận văn: Nghiên cứu điều chế hệ nano oxit kẽm biến tính bề mặt với axit tannic và glucose oxidase định hướng tăng cường hiệu quả điều trị ung thư

Chuyên ngành: Hoá hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

Người hướng dẫn khoa học: TS. Lê Thị Phương

Ngày bảo vệ luận văn: 09/6/2026

Căn cứ biên Bản họp Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Chỉnh sửa phần chú thích hình ảnh trong mục kết quả chi tiết hơn	Học viên đã tiếp thu ý kiến của hội đồng và đã chỉnh sửa lại phần chú thích hình ảnh chi tiết và rõ ràng hơn.
2	Chỉnh sửa cách viết đề mục cho thống nhất, phần thực nghiệm sử dụng động từ, kết quả sử dụng danh từ	Học viên đã chỉnh sửa đề mục phần thực nghiệm và kết quả theo góp ý của hội đồng
3	Chỉnh sửa lại nội dung trong phần phạm vi nghiên cứu trang 21	Học viên đã chỉnh sửa nội dung trong phần phạm vi nghiên cứu cho hợp lý hơn (trang 21).
4	Rà soát lỗi chính tả và định dạng theo mẫu của Học viện trong toàn bộ bài	Học viên đã rà soát kỹ lỗi chính tả, chỉnh sửa câu văn và định dạng đúng theo mẫu của Học viện.
5	Chỉnh sửa hình ảnh cho rõ nét hơn, một số tên mẫu, trục Ox và Oy trên biểu đồ còn để Tiếng Anh, cần dịch	Học viên đã chỉnh sửa độ phân giải của hình ảnh và dịch tên mẫu, tên trục Ox và Oy sang Tiếng Việt (trang 51 và 55)




	sang Tiếng Việt ở trang 51, 55.	
6	Cần biểu diễn thông số máu của chuột trong bảng 3.2 trang 58 dưới dạng biểu đồ để dễ dàng quan sát, so sánh hơn.	Học viên đã vẽ thông số máu của chuột trong Bảng 3.2 trang 58 thành dạng biểu đồ cột và bổ sung trong phần phụ lục.


Lưu ý: Trong trường hợp Hội đồng yêu cầu xin ý kiến của 02 phản biện sau bảo vệ, học viên cần xin chữ ký của 02 phản biện xác nhận.

Thành phố Hồ Chí Minh, ngày 16 tháng 6 năm 2026

**CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG TẬP THỂ HƯỚNG DẪN**

**HỌC VIÊN**

  
Nguyễn Cửu Khoa

  
Lê Thị Phương

  
Hoàng Kim Hùng

**XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ  
KT.GIÁM ĐỐC  
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung

