

Nghiên cứu tác dụng kháng biofilm của gel chứa liposome metronidazole đối với vi khuẩn gây bệnh viêm nha chu *Porphyromonas gingivalis*

Trần Hoàng Long^{1,*,#}, Lê Thị Thanh Ngọc^{1,5,#}, Lê Thị Bảo Chi², Ung Thị Thủy²,
Nguyễn Văn Minh³, Võ Minh Tiếp⁴, Hồ Hoàng Nhân^{1,*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

²Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

³Khoa Răng Hàm Mất, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

⁴Bộ môn Ký sinh trùng, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

⁵Viện Công nghệ dược phẩm quốc gia, Trường Đại học Dược Hà Nội

*Các tác giả có đóng góp như nhau

*Tác giả liên hệ: Hồ Hoàng Nhân: hnhnhan@hueuni.edu.vn; hnhnhan@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài (Received): ;

Ngày duyệt đăng (Accepted):

Xuất bản trực tuyến (Published online):

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Metronidazole (MTZ) có tác dụng trên vi khuẩn kỵ khí; do đó, liposome chứa MTZ là hướng tiếp cận tiềm năng nhằm tăng tiếp cận biofilm, kéo dài tác dụng và có khả năng nâng cao hiệu quả điều trị tại chỗ.

Mục tiêu nghiên cứu: Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các điều kiện tạo biofilm *in vitro* của *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), đồng thời đánh giá tác dụng kháng biofilm của gel chứa MTZ dạng liposome đối với vi khuẩn này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: *P. gingivalis* ATCC 33277, MTZ nguyên liệu, MTZ chuẩn và các hóa chất liên quan được sử dụng trong nghiên cứu. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của môi trường, thời gian nuôi cấy đến khả năng tạo biofilm của *P. gingivalis* và tác dụng kháng biofilm của gel chứa liposome MTZ.

Kết quả: Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình tạo biofilm *in vitro* của *P. gingivalis*, với điều kiện phù hợp là môi trường Brain Heart Infusion bổ sung hemin 5 µg/mL và vitamin K 1 µg/mL, nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong 48 hoặc 72 h. *P. gingivalis* ATCC 33277 nhạy cảm với gel MTZ liposome và gel MTZ nguyên liệu, với MIC lần lượt ≤ 0,03 µg/mL và 0,06 µg/mL. Cả hai chế phẩm đều làm giảm đáng kể biofilm hình thành sẵn ở nồng độ MTZ 0,24 µg/mL và ức chế đáng kể sự hình thành biofilm ở nồng độ MTZ 0,24 µg/mL sau 48 h và 0,48 µg/mL sau 72 h.

Kết luận: Dữ liệu về khả năng kháng khuẩn, giảm sinh khối của gel MTZ liposome trong nghiên cứu này cung cấp dữ liệu *in vitro* ban đầu và tiềm năng định hướng trong các nghiên cứu về bệnh nha chu ở các giai đoạn tiếp sau.

Từ khóa: metronidazole, liposome, *Porphyromonas gingivalis*, biofilm

Antibiofilm activity of gel containing metronidazole liposome against *Porphyromonas gingivalis*

Tran Hoang Long^{1,*,#}, Le Thi Thanh Ngoc^{1,5,#}, Le Thi Bao Chi², Ung Thi Thuy²,
Nguyen Van Minh³, Vo Minh Tiep⁴, Ho Hoang Nhan^{1,*}

¹Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

²Department of Microbiology, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

³Faculty of Odonto-Stomatology, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

⁴Department of Parasitology, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

⁵National Institute of Pharmaceutical Technology, Hanoi University of Pharmacy

#These authors contributed equally to this work

Abstract

Background: Metronidazole (MTZ) is active against anaerobic bacteria; therefore, MTZ-loaded liposomes represent a potential approach to enhance biofilm penetration, prolong drug action, and improve the efficacy of local treatment. **Objective:** This study aimed to optimize an *in vitro* biofilm formation model of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and to evaluate the antibiofilm activity of gel containing MTZ liposome against this bacterium.

Materials and Methods: *P. gingivalis* ATCC 33277, raw MTZ, standard MTZ, and related chemicals were used in this study. The effects of culture medium and incubation time on the biofilm-forming ability of *P. gingivalis*, as well as the antibiofilm activity of gel containing MTZ liposome, were investigated.

Results: An *in vitro* biofilm formation model of *P. gingivalis* was successfully established, with suitable conditions consisting of Brain Heart Infusion medium supplemented with hemin 5 µg/mL and vitamin K 1 µg/mL, followed by anaerobic incubation at 37°C for 48 or 72 h. *P. gingivalis* ATCC 33277 was sensitive to both MTZ Liposome gel and raw MTZ gel, with MIC values of ≤ 0.03 µg/mL and 0.06 µg/mL, respectively. Both formulations significantly reduced preformed biofilms at MTZ concentration of 0.24 µg/mL and almost completely inhibited biofilm formation at MTZ concentration of 0.24 µg/mL after 48 h and 0.48 µg/mL after 72 h.

Conclusion: These findings provide preliminary *in vitro* evidence to support further studies on periodontal disease.

Keywords: metronidazole, liposome, *Porphyromonas gingivalis*, biofilm

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Biofilm là cộng đồng vi sinh vật bám dính bền vững trên bề mặt và được bao bọc trong chất nền polysaccharid ngoại bào do chúng tạo ra, với kiểu hình khác với tế bào sống tự do [1]. Về thành phần vi sinh vật, biofilm có thể bao gồm một hoặc nhiều loài vi khuẩn khác nhau. Về cấu trúc, quá trình tạo màng cần có sự tham gia của nhiều yếu tố để hình thành nên cấu trúc đặc trưng của màng. Tỷ lệ và mức độ bám dính của tế bào vi khuẩn vào một bề mặt phụ thuộc vào đặc tính kỵ nước của bề mặt tế bào, sự hiện diện của lông roi, tiêm mao và chất kết dính, ngoài ra còn có protein màng tế bào và sự sản xuất mạng lưới chất ngoại bào [1]. Trong nhiều bệnh nhiễm trùng mạn tính, sự hình thành biofilm làm cho vi khuẩn rất khó bị tiêu diệt bởi kháng sinh. Do được lớp polysaccharid bao bọc nên vi khuẩn có khả năng bám dính, tồn tại lâu trên bề mặt, đề kháng tốt với hiện tượng thực bào và sự tác động của kháng sinh. Dưới sự bảo vệ của lớp màng sinh học này, vi khuẩn có thể chống chịu được kháng sinh ở liều cao mà chỉ với liều kháng sinh bằng 1/1000 liều lượng này vi khuẩn không nằm trong màng sinh học đã bị tiêu diệt [2, 3].

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) là một loại trực khuẩn Gram âm, kỵ khí, có hình dạng thoi, không di động và không thể phân giải saccharid, tạo ra các khuẩn lạc có sắc tố đen trên đĩa thạch máu. Các nghiên cứu chỉ ra rằng vi khuẩn *P. gingivalis* xuất hiện với số lượng lớn trong các vùng viêm nha chu. Sự hiện diện của vi khuẩn này liên quan đến nguy cơ cao gây tiêu xương ổ răng và mất liên kết nha chu. Ngoài ra, *P. gingivalis* có khả năng xâm nhập sâu vào mô liên kết nha chu, dẫn đến nguy cơ tái phát bệnh rất lớn [4].

Metronidazole (MTZ) là một kháng sinh thuộc nhóm nitroimidazole, đã được sử dụng trong điều trị viêm nha chu do có thể tác động lên vi khuẩn kỵ khí bắt buộc bằng cách can thiệp vào quá trình tổng hợp acid nucleic [5]. Tuy nhiên, hiệu quả của MTZ có thể bị hạn chế do sự hiện diện của biofilm làm giảm khả năng thâm thấu và bảo vệ vi khuẩn khỏi tác động của kháng sinh. Bên cạnh đó, mặc dù hiệu quả của MTZ trong điều trị viêm nha chu tốt nhưng thời gian giải phóng nhanh của MTZ và số lần sử dụng nhiều lần trong đợt trị liệu sẽ là trở ngại khi điều trị viêm nha chu tại chỗ. Do đó, việc ứng dụng hệ mang liposome có thể giúp tăng khả năng tiếp cận biofilm, kéo dài thời gian tác dụng của MTZ và nâng cao hiệu quả kháng khuẩn tại chỗ là một hướng nghiên cứu có tiềm năng trong điều trị viêm nha chu [6].

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh khả năng ức chế sự hình thành và kháng biofilm của *P. gingivalis* bằng các hoạt chất và hệ mang thuốc khác nhau. Liang và cộng sự (2020) cho thấy chấm carbon chứa tinidazole có khả năng thâm nhập vào biofilm, làm giảm độc lực và ức chế các gen liên quan đến quá trình hình thành biofilm của *P. gingivalis* [7]. Tương tự, Li và cộng sự (2020) báo cáo D-arginine có khả năng ức chế sự hình thành cũng như thúc đẩy sự phân giải biofilm của vi khuẩn này [8]. Các nghiên cứu khác của Gong và cộng sự (2022), Kumbar và cộng sự (2021), He và cộng sự (2022) cũng ghi nhận bismuth subcitrat, curcumin và coumarin đều có khả năng làm giảm sinh khối biofilm, ức chế sự hình thành hoặc phá vỡ cấu trúc biofilm trưởng thành của *P. gingivalis* [9-11].

Tuy nhiên, MTZ là một trong những kháng sinh được sử dụng phổ biến trong điều trị viêm nha chu do tác dụng mạnh trên các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc, các nghiên cứu về khả năng kháng biofilm của MTZ dạng nano hóa, đặc biệt là dạng liposome khi đưa vào dạng gel, đối với *P. gingivalis* vẫn còn rất hạn chế. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về hoạt tính kháng biofilm chủ yếu tập trung trên các chủng vi khuẩn như *Staphylococcus aureus* và các dịch chiết dược liệu, trong khi các nghiên cứu xây dựng mô hình biofilm của *P. gingivalis* và đánh giá tác dụng của các hệ tiểu phân nano trên biofilm của vi khuẩn

này chưa được công bố nhiều [12-14]. Do đó, việc nghiên cứu tác dụng kháng biofilm của MTZ dạng liposome đối với *P. gingivalis* là cần thiết, vừa góp phần hoàn thiện mô hình đánh giá biofilm *in vitro*, vừa cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các hệ dẫn thuốc nano định hướng điều trị viêm nha chu và hạn chế nguy cơ kháng kháng sinh.

Xuất phát từ cơ sở trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các điều kiện tạo biofilm *in vitro* của *P. gingivalis*, đồng thời đánh giá tác dụng kháng biofilm của gel chứa MTZ dạng liposome đối với vi khuẩn này.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Chủng vi khuẩn *P. gingivalis* ATCC 33277 (Culti-Loops; catalog number: CL9008) được mua từ Oxoid Limited (Thermo Fisher Inc., Hoa Kỳ).

MTZ nguyên liệu có nguồn gốc từ Hubei Hongyuan Pharmaceutical Technology Co., Ltd. (Trung Quốc). MTZ chuẩn có hàm lượng 99,96%, đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V, do Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp. Liposome MTZ được bào chế và đưa vào dạng gel 0,75% tại Phòng Bào chế – Sản xuất thuốc, Khoa Dược, Trường Đại học Y – Dược, Đại học Huế [6, 15].

Các nguyên liệu dùng để bào chế liposome và gel gồm hydrogenated soybean phosphatidylcholin (HSPC), cholesterol, hydroxyethyl cellulose (HEC), Carbopol 934, glycerin, triethanolamin (Trung Quốc), nipagin và nipazol (Nhật Bản). Các nguyên liệu đạt tiêu chuẩn cơ sở của nhà sản xuất.

Các môi trường và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu vi sinh gồm môi trường Brain Heart Infusion (BHI) (Merck, Đức), Brucella blood hemin vitamin K agar base (Alphachem, Việt Nam), máu ngựa ly giải (Alphachem, Việt Nam), glucose 1% (Merck, Pháp), hemin và vitamin K dạng menadione (Himedia, Ấn Độ), dung dịch tím tinh thể (Crystal violet – CV, Merck, Đức), ethanol 95% và 99,6%, dung dịch đệm phosphate và nước cất vô khuẩn. Vi khuẩn được nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí bằng túi AnaeroPack Anaero (Mitsubishi Gas Chemical Company, Nhật Bản). Các thí nghiệm được tiến hành trên khay 96 giếng đáy phẳng hoặc đáy tròn (Costa, Mỹ) và các dụng cụ vô khuẩn phù hợp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường và thời gian nuôi cấy đến khả năng tạo biofilm của *P. gingivalis*

Tiến hành khảo sát môi trường nuôi cấy ở giai đoạn tạo biofilm bao gồm môi trường có bổ sung glucose 1% (môi trường glucose 1%) và môi trường BHI có bổ sung hemin và vitamin K; sau đó tiến hành khảo sát thời gian nuôi cấy trong 48–72 h. Cụ thể như sau:

+ Môi trường glucose 1%: Chuẩn bị huyền phù *P. gingivalis* (5×10^7 CFU/mL) trong dung dịch 1% glucose, sau đó, hút 100 μ L cho vào mỗi giếng của khay nuôi cấy 96 giếng đáy phẳng. Các khay này được ủ trong 48–72 h ở tủ ấm 37°C cùng với túi ủ kỵ khí để kiểm tra khả năng hình thành màng sinh học. Sau khi nuôi cấy, khay 96 giếng được rửa ba lần bằng dung dịch muối đệm phosphate (PBS) để loại bỏ vi khuẩn *P. gingivalis* không bám dính. Tiếp theo, 150 μ L methanol được thêm vào từng giếng để cố định màng sinh học trong 10 phút. Sau khi cố định, khay được rửa ba lần với PBS và để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng, nhuộm màu CV và rửa kỹ bằng PBS cho đến khi các giếng đối chứng âm xuất hiện không màu. Cuối cùng, phần màu nhuộm được hòa tan bằng 200 μ L ethanol 95% (v/v) và định lượng bằng cách đo mật độ quang ở 570 nm trên thiết bị đọc đĩa [7].

+ Môi trường BHI có chứa 5 μ g/mL Hemin và 1 μ g/mL Vitamin K: Sử dụng môi trường nuôi cấy là BHI có bổ sung thêm Hemin và Vitamin K, sau đó được ủ ở 37 °C trong điều kiện kỵ khí từ 48–72 h để hình thành biofilm. Đánh giá sinh khối bằng phương pháp nhuộm CV, rửa bằng dung dịch đệm PBS, thêm ethanol để hòa tan CV và đo mật độ quang ở 570 nm [9, 11].

Tiến hành xác định khả năng hình thành sinh khối biofilm thông qua kết quả đo mật độ quang OD theo công thức (1) như sau [16]:

$$OD_{\text{hiệu chỉnh}} = \left(\frac{\sum OD_1, OD_2, \dots, OD_n}{n} \right) - \left(\frac{\sum NC_1, NC_2, \dots, NC_n}{n} \right) \quad (1)$$

Trong đó, $OD_{1...n}$: giá trị mật độ quang của các mẫu thử; $NC_{1...n}$: giá trị OD của các mẫu đối chứng âm.

Dựa vào công thức trên xác định khả năng hình thành biofilm như sau:

- + Không sản xuất sinh khối biofilm ($OD_{\text{hiệu chỉnh}} \leq NC$),
- + Hình thành sinh khối biofilm yếu ($NC < OD_{\text{hiệu chỉnh}} \leq 2 \times NC$),
- + Hình thành sinh khối biofilm vừa phải ($2 \times NC < OD_{\text{hiệu chỉnh}} \leq 4 \times NC$),

+ Hình thành sinh khối biofilm mạnh ($OD_{\text{hiệu chỉnh}} > 4 \times NC$).

2.2.2. Đánh giá tác dụng kháng biofilm của gel chứa liposome MTZ đối với vi khuẩn *P. gingivalis*

2.2.2.1. Đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của gel chứa liposome MTZ đối với vi khuẩn *P. gingivalis*

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các chế phẩm thử được xác định bằng phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng, tham khảo hướng dẫn CLSI M11-A7 đối với vi khuẩn kỵ khí. Mẫu thử được pha loãng liên tiếp theo cấp số 2 trong môi trường sBHI trên khay 96 giếng đáy tròn, với dãy nồng độ từ 16 đến 0,03 $\mu\text{g/mL}$ [17]. Huyền dịch *P. gingivalis* được chuẩn hóa tương đương McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL), sau đó pha loãng đến 1×10^7 CFU/mL. Mỗi giếng chứa 100 μL mẫu thử đã pha loãng được bổ sung 10 μL huyền dịch vi khuẩn, đạt mật độ cuối khoảng $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL. Khay được ủ kỵ khí ở 37 °C trong 48 h.

2.2.2.2. Đánh giá khả năng kháng biofilm của gel chứa liposome MTZ đối với *P. gingivalis*

Quy trình đánh giá khả năng kháng biofilm và ức chế hình thành biofilm đối với vi khuẩn *P. gingivalis* của gel liposome MTZ và gel MTZ nguyên liệu được tóm tắt như sau:

a. Đánh giá khả năng kháng biofilm hình thành sẵn của gel liposome MTZ đối với vi khuẩn *P. gingivalis*

Huyền dịch vi khuẩn *P. gingivalis* (150 μL) được nuôi cấy tối ưu và ủ kỵ khí ở 37 °C trong 48 hoặc 72 h để tạo biofilm từ các điều kiện tối ưu ở khảo sát trên. Sau thời gian tạo biofilm, 150 μL mẫu thử được đưa vào giếng để thu được các nồng độ cuối từ 0,06 đến 30,72 $\mu\text{g/mL}$ và tiếp tục ủ trong điều kiện kỵ khí ở 37 °C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, dịch trong giếng được loại bỏ, các giếng được rửa ba lần bằng PBS để loại tế bào không bám dính và để khô ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Biofilm được cố định bằng 200 μL methanol trong 15 phút, rửa lại bằng PBS và nhuộm với 200 μL dung dịch CV trong 20 phút ở 25 °C. Thuốc nhuộm dư được loại bỏ, các giếng được rửa đến khi đối chứng âm không còn màu, sau đó, CV liên kết với biofilm được hòa tan bằng ethanol 95%. Tổng sinh khối biofilm được định lượng bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 570 nm [18].

b. Đánh giá khả năng ức chế hình thành biofilm của gel chứa liposome MTZ đối với vi khuẩn *P. gingivalis*

Khả năng ức chế hình thành biofilm của các chế phẩm thử đối với *P. gingivalis* được đánh giá bằng phương pháp đồng ủ vi khuẩn với mẫu thử trên khay 96 giếng đáy phẳng. Huyền dịch vi khuẩn được chuẩn hóa tương đương McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) trong môi trường nuôi cấy tối ưu. Mỗi giếng được bổ sung 150 μL huyền dịch vi khuẩn và 150 μL mẫu thử sao cho thu được các nồng độ cuối của thuốc thử từ 0,06 đến 30,72 $\mu\text{g/mL}$. Các khay được ủ kỵ khí ở 37°C trong 48 hoặc 72 h để đồng thời tạo biofilm và đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử lên quá trình hình thành biofilm. Sau thời gian ủ, dịch nuôi cấy được loại bỏ, các giếng được rửa ba lần bằng PBS, để khô ở nhiệt độ phòng, cố định biofilm bằng methanol và nhuộm bằng dung dịch CV. Thuốc nhuộm liên kết với biofilm được hòa tan bằng ethanol 95% và tổng sinh khối biofilm được định lượng bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 570 nm [18].

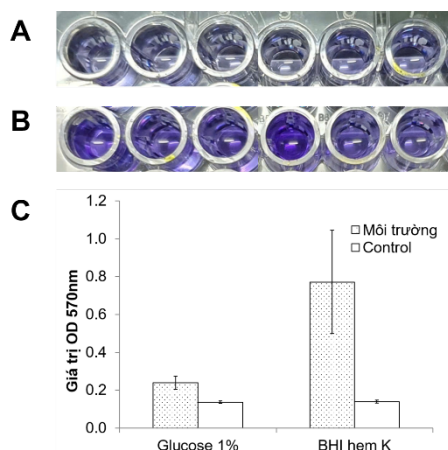
2.3. Xử lý và phân tích số liệu

Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD). Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất trên 3 giếng kỹ thuật trong một thí nghiệm, trừ khi có ghi chú khác. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel for Microsoft 365 Apps for enterprise.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo biofilm của *P. gingivalis*

Tiến hành tạo biofilm của chủng vi khuẩn *P. gingivalis* ATCC 33277, sử dụng môi trường glucose 1% và môi trường BHI + hemin + vitamin K để khảo sát khả năng hình thành biofilm. Biofilm tạo thành sau 48 h ủ kỵ khí ở 37 °C sẽ được đánh giá về tổng sinh khối bằng phương pháp nhuộm CV và đo mật độ quang OD ở 570 nm thu được kết quả ở hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của môi trường tạo biofilm: (A) glucose 1%, (B) BHI + Hem + Vitamin K đến khả năng tạo biofilm của *P. gingivalis*; (C) Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo biofilm của *P. gingivalis* (với 6 giếng lặp lại trong 1 lần thí nghiệm)

Quan sát các giếng bằng mắt thường có thể nhận thấy những giếng chứa môi trường BHI + hemin + vitamin K sau khi nhuộm CV sẽ cho màu xanh tím đậm hơn môi trường glucose 1%, nghĩa là sinh khối biofilm được tạo ra ở môi trường BHI + hemin + vitamin K là nhiều hơn (Hình 1A–B).

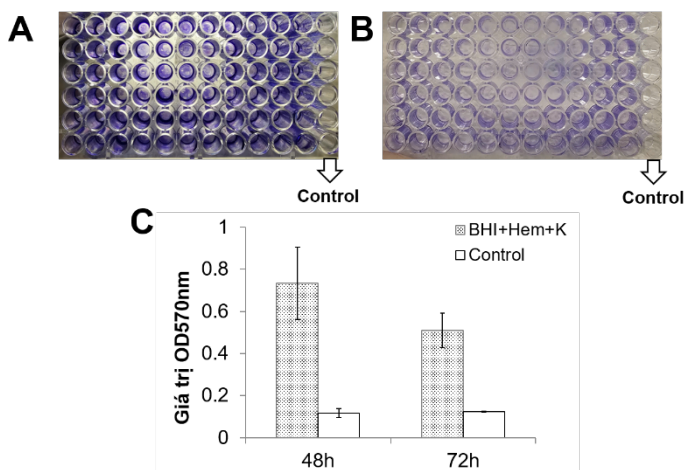
Kết quả khảo sát hai môi trường nuôi cấy cho thấy môi trường BHI bổ sung hemin và vitamin K cho khả năng hình thành biofilm của *P. gingivalis* tốt hơn so với môi trường glucose 1% với giá trị OD gần gấp 3 lần. Môi trường glucose 1% không tạo được biofilm ($OD_{hiệu chỉnh} (Glucose\ 1\%) = 0,238 - 0,137 = 0,101 < 0,137$); trong khi đó, môi trường BHI + hemin + K có khả năng hình thành biofilm mạnh ($OD_{hiệu chỉnh} (BHI\ hem\ K) = 0,771 - 0,139 = 0,632 > 4 \times 0,139$).

Do đó, môi trường BHI + 5 μ g/mL hemin + 1 μ g/mL vitamin K được lựa chọn làm môi trường nuôi cấy cho các thử nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tạo biofilm của *P. gingivalis*

Sử dụng môi trường nuôi cấy BHI + 5 μ g/mL hemin + 1 μ g/mL vitamin K làm điều kiện tối ưu để khảo sát về khả năng hình thành biofilm theo thời gian. Trong nghiên cứu này, hai mốc thời gian 48 h và 72 h được chọn nhằm đánh giá giai đoạn trưởng thành và biến đổi của biofilm *P. gingivalis*, qua đó xác định được thời điểm nuôi cấy thích hợp nhất cho các thử nghiệm tiếp theo.

Tiến hành nuôi cấy tạo biofilm trên 02 khay 96 giếng ở 02 thời điểm khác nhau trong các hộp kỵ khí riêng biệt (trong đó, các quy trình hút, rửa, nhuộm các giếng được lặp lại tương tự giữa 02 khay), thu được kết quả ở hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tạo biofilm: (A) Sau 48 h (80 giếng lặp lại trong 1 thí nghiệm), (B) Sau 72 h (86 giếng lặp lại trong 1 thí nghiệm); (C) Khả năng hình thành biofilm *P. gingivalis* tại thời gian 48 và 72 h

Các khay 96 giếng sau khi được nhuộm CV trong 20 phút, rửa bằng dung dịch đệm PBS và để khô ở nhiệt độ phòng, quan sát bằng mắt thường có thể dễ dàng nhận thấy ở khay 48 h phần đáy giếng có nhiều mảng bám màu tím đậm hơn khay 72 h, có thể cho thấy lượng biofilm bám dính vào đáy giếng cao hơn tương ứng với giá trị OD lớn hơn gần 1,5 lần (Hình 2). Đối với thời điểm 48 h, cho khả năng

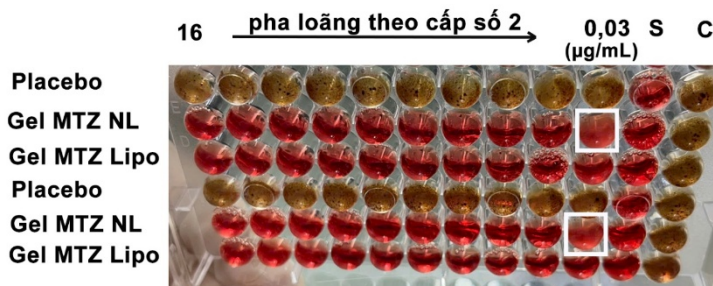
hình thành sinh khối biofilm mạnh ($OD_{48h} = 0,732 - 0,117 = 0,615 > 4 \times 0,117$), trong khi thời điểm 72 h cho khả năng hình thành sinh khối biofilm vừa phải ($OD_{72h} = 0,509 - 0,123 = 2 \times 0,123 < 0,386 < 4 \times 0,123$).

Vì cả hai thời điểm đều cho khả năng hình thành biofilm, mức độ sinh khối biofilm tạo ra từ vừa đến mạnh, nên cả hai mốc thời gian 48 h và 72 h được lựa chọn để thực hiện các thử nghiệm tiếp theo, mục đích lựa chọn cả hai mốc thời gian trên để cung cấp dữ liệu so sánh hữu ích cho đánh giá hiệu quả.

3.3. Đánh giá tác dụng kháng biofilm của gel chứa liposome MTZ đối với vi khuẩn *P. gingivalis*

Xác định giá trị MIC của gel chứa liposome MTZ đối với vi khuẩn *P. gingivalis*

Nồng độ gel MTZ liposome (Gel MTZ Lipo) và Gel MTZ nguyên liệu được chọn để khảo sát lần lượt từ 16–0,03 $\mu\text{g/mL}$ bằng phương pháp vi pha loãng (theo cấp số 2) với kết quả thu được ở hình 3.

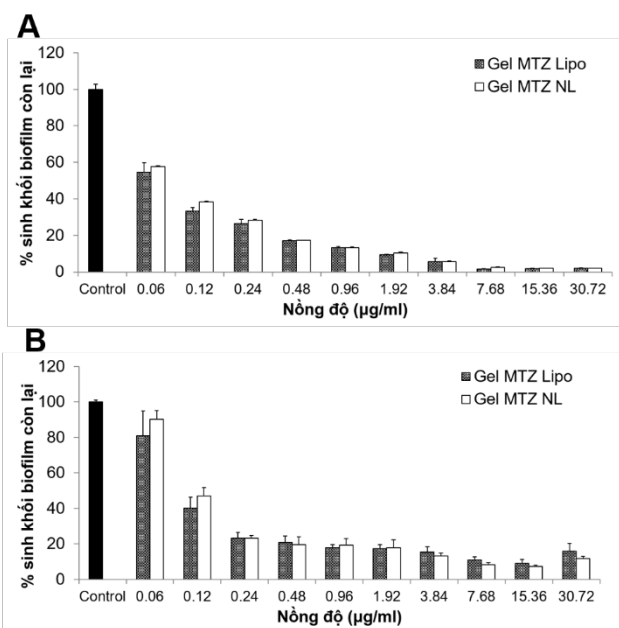


Hình 3. Kết quả thử MIC của gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu đối với *P. gingivalis* (nhìn từ dưới lên; ký hiệu: ô vuông: có sự phát triển vi khuẩn, S: môi trường, C: đối chứng)

Kết quả vi pha loãng cho thấy đối chứng dương có *P. gingivalis* phát triển tốt, trong khi đối chứng âm không ghi nhận vi khuẩn mọc. Gel MTZ Lipo ức chế sự phát triển của *P. gingivalis* ở toàn bộ dãy nồng độ khảo sát, với MIC nhỏ hơn hoặc bằng 0,03 $\mu\text{g/mL}$. Gel MTZ nguyên liệu ức chế vi khuẩn từ nồng độ 0,06 $\mu\text{g/mL}$, do đó MIC được xác định là 0,06 $\mu\text{g/mL}$. Gel liposome placebo không có khả năng ức chế *P. gingivalis*. Kết quả cho thấy gel MTZ Lipo có hoạt tính ức chế *P. gingivalis* tốt hơn gel MTZ nguyên liệu.

Đánh giá khả năng kháng biofilm hình thành sẵn của gel chứa liposome MTZ đối với *P. gingivalis*

Thử nghiệm về khả năng kháng biofilm hình thành sẵn sau 48 h hoặc 72 h của gel chứa liposome MTZ đối với *P. gingivalis* được tiến hành với dãy nồng độ từ 0,06–30,72 $\mu\text{g/mL}$ và ủ trong 24 h, thu được kết quả ở hình 4.



Hình 4. Khả năng kháng biofilm hình thành sẵn của gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu đối với *P. gingivalis*: (A) đối với biofilm hình thành trong 48 h và thử thuốc trong 24 h; (B) đối với biofilm hình thành trong 72 h và thử thuốc trong 24 h (3 giếng lặp lại trong 1 lần thí nghiệm ở mỗi nồng độ, đối với control: 6 giếng lặp lại trong 1 lần thí nghiệm)

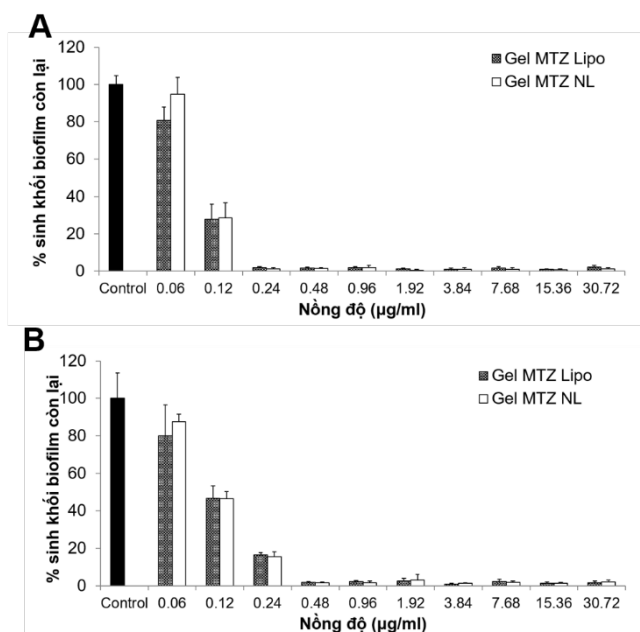
Đối với trường hợp biofilm hình thành trong 48 h và thử thuốc trong 24 h: Khi tăng dần nồng độ thuốc, hiệu quả kháng biofilm của gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu tăng dần. Tại nồng độ MTZ 0,24 $\mu\text{g/mL}$, cả hai chế phẩm gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu làm giảm đáng kể sinh khối biofilm với % sinh khối biofilm còn lại lần lượt là $26,34 \pm 2,51$ % và $28,36 \pm 0,33$ %.

Đối với trường hợp biofilm hình thành trong 72 h và thử thuốc trong 24 h: Xu hướng tác động tương tự như ở biofilm 48 h, sinh khối biofilm giảm dần khi nồng độ MTZ tăng lên, cả hai nhóm gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu cũng làm giảm đáng kể sinh khối biofilm với % sinh khối biofilm còn lại lần lượt là $23,34 \pm 3,02$ % và $23,17 \pm 1,53$ % ở nồng độ MTZ 0,24 $\mu\text{g/mL}$.

Ở toàn bộ dãy nồng độ khảo sát và hai thời điểm, khả năng kháng biofilm của hai chế phẩm gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu gần tương tự nhau với tỉ lệ % sinh khối biofilm còn lại tương ứng từ 0,85 đến 1,35 lần (ngoại trừ ở nồng độ 7,68 $\mu\text{g/mL}$, đối với biofilm hình thành trong 48 h và thử thuốc trong 24 h là 0,61 lần).

Đánh giá khả năng ức chế sự hình thành biofilm của gel chứa liposome MTZ đối với *P. gingivalis*

Thử nghiệm về khả năng ức chế sự hình thành biofilm của gel MTZ Lipo đối với *P. gingivalis* được tiến hành với dãy nồng độ từ 0,06–30,72 $\mu\text{g/mL}$ và ủ trong 48 h hoặc 72 h, thu được kết quả ở hình 5.



Hình 5. Khả năng ức chế sự hình thành biofilm của gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu đối với *P. gingivalis*: (A) trường hợp cho vi khuẩn và thuốc thử vào ủ chung trong 48 h; (B) trường hợp cho vi khuẩn và thuốc thử vào ủ chung trong 72 h (3 giếng lặp lại trong 1 lần thí nghiệm ở mỗi nồng độ, đối với control: 6 giếng lặp lại trong 1 lần thí nghiệm)

Đối với trường hợp cho vi khuẩn và thuốc thử vào ủ chung trong 48 h: Khi nồng độ MTZ tăng lên 0,12 $\mu\text{g/mL}$, tổng sinh khối biofilm còn lại giảm mạnh xuống còn <30% ở cả hai nhóm gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu. Từ nồng độ MTZ 0,24 $\mu\text{g/mL}$ trở lên, sự hình thành biofilm gần như bị ức chế hoàn toàn với % sinh khối biofilm còn lại lần lượt là $1,88 \pm 0,40$ % và $1,32 \pm 0,58$ % tại nồng độ MTZ 0,24 $\mu\text{g/mL}$.

Đối với trường hợp cho vi khuẩn và thuốc thử vào ủ chung trong 72 h: Xu hướng tác động tương tự cũng được quan sát thấy. Cả gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu đều làm giảm đáng kể tổng sinh khối biofilm với % sinh khối biofilm còn lại lần lượt là $16,49 \pm 1,20$ % và $15,61 \pm 2,44$ % tại nồng độ MTZ 0,24 $\mu\text{g/mL}$. Hiệu quả ức chế gần như hoàn toàn (>95%) đạt được khi nồng độ MTZ tiến tới mốc 0,48 $\mu\text{g/mL}$.

Ở các dãy nồng độ khảo sát từ 0,06–0,96 $\mu\text{g/mL}$ và cả 2 mốc thời gian 48 h và 72 h, khả năng ức chế hình thành sinh khối biofilm của gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu là gần tương tự nhau với tỉ lệ % sinh khối biofilm còn lại tương ứng từ 0,85 đến 1,40 lần.

4. BÀN LUẬN

Dạng gel dùng tại chỗ là hướng tiếp cận phù hợp trong điều trị viêm nha chu nhờ khả năng duy trì nồng độ kháng sinh cao tại túi nha chu và hạn chế tác dụng toàn thân. MTZ Lipo có hiệu quả trên vi khuẩn kỵ khí Gram âm nhưng dạng quy ước thường giải phóng nhanh, cần dùng nhiều lần. Vì vậy, gel

MTZ Lipo có thể giúp kéo dài thời gian lưu giữ thuốc, cải thiện hiệu quả điều trị hỗ trợ sau cạo vôi răng và làm nhẵn mặt gốc răng [19].

Qua thử nghiệm khảo sát môi trường ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh của vi khuẩn, chúng tôi đã tiến hành khảo sát 02 loại môi trường khác nhau cho giai đoạn hình thành biofilm, cụ thể là: Glucose 1%, BHI + Hemin + vitamin K. Trong đó, môi trường BHI + Hemin + vitamin K cho thấy sự phát triển nổi bật của *P. gingivalis*. BHI được dùng nuôi cấy các loại vi sinh vật có điều kiện sinh trưởng phức tạp. Thành phần của môi trường BHI gồm có dịch tim bò và dịch não bê cung cấp acid amin, nitơ, carbon, vitamin và khoáng chất cho quá trình sinh trưởng của vi khuẩn, disodium hydrogen phosphat có vai trò là hệ đệm pH, glucose (~ 0,2%) là nguồn carbohydrat cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn, natri clorid giúp duy trì sự cân bằng áp suất thẩm thấu giữa môi trường và tế bào vi sinh vật, từ đó hỗ trợ quá trình phát triển các chủng vi khuẩn khó tính.

Một số nghiên cứu đã bổ sung glucose trong môi trường nuôi cấy tạo biofilm của *P. gingivalis* như BHI + glucose với các nồng độ khác nhau [20] (trong đó, chưa thể hiện sự khác biệt về giá trị OD giữa các nồng độ glucose cao) [21]; hoặc chỉ sử dụng BHI [22, 23], hoặc các môi trường khác như Tryptic Soy Broth + glucose 1% [24], hoặc môi trường bovine serum albumin kết hợp α -ketoglutarat [25]. Trong nghiên cứu này, môi trường có bổ sung glucose trong giai đoạn tạo biofilm cũng đã thể hiện sự hình thành sinh khối biofilm tương tự nghiên cứu của Šmiga và cộng sự khi pha loãng môi trường basal media trong PBS ở giai đoạn tạo biofilm cũng đã thể hiện sự hình thành sinh khối biofilm không đáng kể so với môi trường sử dụng BSA có/không có kết hợp collagen [26].

Trong nuôi cấy *P. gingivalis*, môi trường thường được bổ sung hemin và vitamin K để hỗ trợ sự phát triển của vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, hemin 5 $\mu\text{g/mL}$ và vitamin K 1 $\mu\text{g/mL}$ được sử dụng, phù hợp với nghiên cứu của Kesavala và cộng sự, trong đó không ghi nhận khác biệt đáng kể về động học tăng trưởng khi so sánh hemin 5 $\mu\text{g/mL}$ với 500 $\mu\text{g/mL}$ [27]. Hemin là nguồn cung cấp sắt và nhân porphyrin quan trọng cho *P. gingivalis*, do vi khuẩn này không tự tổng hợp porphyrin và không sử dụng siderophore như nhiều vi khuẩn khác. Thay vào đó, *P. gingivalis* thu nhận sắt từ hem của ký chủ thông qua gingipain và các protein liên kết màng [28]. Do đó, hemin 5 $\mu\text{g/mL}$ và vitamin K 1 $\mu\text{g/mL}$ được lựa chọn cho các thử nghiệm nuôi cấy trong nghiên cứu này.

Trong khảo sát thời gian nuôi cấy, huyền dịch *P. gingivalis* $1,5 \times 10^8$ CFU/mL được nuôi cấy trong môi trường BHI bổ sung hemin và vitamin K, ủ kỵ khí ở 37°C trong 48 h hoặc 72 h. Kết quả định lượng bằng phương pháp nhuộm CV cho thấy sinh khối biofilm bám dính đạt mức cao hơn ở 48 h và giảm nhẹ ở 72 h. Sự giảm nhẹ sinh khối ở 72 h có thể liên quan đến giai đoạn phân tán hoặc thoái hóa một phần biofilm do thiếu hụt dinh dưỡng, tích lũy sản phẩm chuyển hóa và cơ chế điều hòa cảm biến số lượng [29, 30]. *P. gingivalis* được ghi nhận có hệ thống LuxS/AI-2 tham gia giao tiếp giữa các loài và điều hòa các quá trình liên quan đến biofilm [31]. Một số nghiên cứu trước đây cũng cho thấy thời gian nuôi cấy là yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành và cấu trúc biofilm của *P. gingivalis* [30], với các mốc thường được sử dụng như 16 h hoặc 48 h [9, 32]. Việc sử dụng cùng huyền phù vi khuẩn, cùng lô môi trường và khởi đầu thí nghiệm đồng thời đã giảm thiểu biến thiên liên quan đến mật độ giống, thành phần môi trường và thời điểm tiến hành. Chỉ thị kỵ khí cũng xác nhận rằng điều kiện kỵ khí được thiết lập trong cả hai hộp. Tuy nhiên, do các mẫu 48 và 72 giờ được nuôi trên các khay và trong các hộp kỵ khí riêng biệt, ảnh hưởng còn lại của khay và mẻ ủ chưa thể được loại trừ hoàn toàn; vì vậy, sự giảm sinh khối ở 72 giờ được xem là một xu hướng cần được xác nhận qua các thí nghiệm độc lập trong các nghiên cứu tiếp theo [33]. Do đó, việc lựa chọn cả hai thời điểm 48 h và 72 h trong nghiên cứu này là phù hợp nhằm đánh giá tác dụng kháng biofilm của MTZ Lipo dạng nano hóa trên các giai đoạn biofilm khác nhau.

Theo phương pháp vi pha loãng, kết quả được đọc bằng mắt thường theo hướng dẫn CLSI M11 – A7 “Phương pháp đánh giá độ nhạy cảm của vi khuẩn kỵ khí” [17]. Giá trị MIC thu được của chế phẩm gel MTZ Lipo là $\leq 0,03$ $\mu\text{g/mL}$ và gel MTZ nguyên liệu là 0,06 $\mu\text{g/mL}$. Giá trị này nằm trong khoảng dao động từ 0,02 đến 2 $\mu\text{g/mL}$ [34]. Điểm gãy (breakpoint) của MTZ đối với vi khuẩn kỵ khí tham khảo từ CLSI với MIC ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ [35]. Cả 2 chế phẩm thử nghiệm trên đều được xác định MIC < 8 $\mu\text{g/mL}$, nằm dưới breakpoint nhạy cảm tham chiếu của CLSI đối với MTZ và vi khuẩn kỵ khí (≤ 8 $\mu\text{g/mL}$).

Loại bỏ màng sinh học và ngăn ngừa tái phát vẫn là mục tiêu trọng tâm trong điều trị bệnh nha chu. Bên cạnh các biện pháp cơ học như cạo vôi, xử lý bề mặt chân răng và vệ sinh răng miệng, các liệu pháp hỗ trợ bằng kháng sinh, chất sát khuẩn hoặc men vi sinh thường được sử dụng nhằm nâng cao hiệu quả điều trị. Tuy nhiên, kháng sinh toàn thân không được khuyến khích thường quy do nguy cơ tác dụng phụ và khó đạt nồng độ hiệu quả tại túi nha chu [36]. Vì vậy, các hệ phân phối thuốc tại chỗ, đặc biệt là

hệ mang nano, được quan tâm phát triển nhằm tăng nồng độ dược chất tại vị trí đích, kéo dài thời gian lưu giữ, kiểm soát giải phóng và giảm tác dụng toàn thân. Nhờ kích thước nhỏ và diện tích bề mặt lớn, các tiểu phân nano có khả năng thâm nhập, tương tác và hỗ trợ phá vỡ màng sinh học. Một số hệ nano, bao gồm nano kim loại như nano vàng, nano bạc và các vật liệu nano khác, đã cho thấy tiềm năng kháng khuẩn đối với các nhiễm khuẩn vùng miệng [37].

Sự phát triển của y học nano đã thúc đẩy ứng dụng các hệ vật liệu nano trong điều trị nhiễm khuẩn, bao gồm bệnh nha chu. Trong đó, liposome là hệ tiểu phân được cấu tạo từ lớp phospholipid kép, có khả năng bao gói dược chất, cải thiện độ ổn định, hạn chế phân bố đến mô lành và duy trì hiệu quả điều trị với liều thấp hơn. Liposome đã được nghiên cứu rộng rãi trong điều trị ung thư, bệnh truyền nhiễm và gần đây được quan tâm trong điều trị nha chu. Một số nghiên cứu cho thấy các hoạt chất như superoxide dismutase, resveratrol hoặc lactoferrin khi được bao gói trong liposome có thể làm giảm chỉ số viêm nướu, độ sâu túi nha chu, nồng độ cytokine gây viêm và tiêu xương ổ răng trên các mô hình thực nghiệm hoặc nghiên cứu lâm sàng [38-40]. Những kết quả này gợi ý tiềm năng của liposome như một hệ mang thuốc sinh học trong hỗ trợ chăm sóc sức khỏe răng miệng và kiểm soát bệnh nha chu.

Trong nghiên cứu này, gel chứa liposome MTZ Lipo được đánh giá tác dụng trên biofilm đơn loài của *P. gingivalis* ATCC 33277 và so sánh với gel chứa MTZ Lipo nguyên liệu. Quy trình thử nghiệm được tham khảo từ một số nghiên cứu trước đây về đánh giá hoạt tính kháng biofilm đối với *P. gingivalis*, trong đó biofilm được hình thành trên đĩa vi giếng, sau đó tiếp xúc với mẫu thử ở các nồng độ khác nhau và định lượng sinh khối bằng phương pháp nhuộm CV [7].

Một số nghiên cứu gần đây cũng sử dụng mô hình tương tự để khảo sát tác dụng kháng biofilm của các hoạt chất mới. Ando và cộng sự (2025) cho thấy acid ferulic có khả năng ức chế sự hình thành biofilm của *P. gingivalis* ở nồng độ dưới MIC thông qua cơ chế ức chế sản xuất autoinducer-2 (AI-2) và hoạt động thụ thể liên quan đến cảm ứng số lượng. Cơ chế này có thể góp phần làm giảm hình thành biofilm và hạn chế biểu hiện các yếu tố độc lực như gingipain. Tuy nhiên, nghiên cứu mới dừng lại ở biofilm đơn loài, do đó cần thêm các khảo sát trên biofilm đa loài, mô hình *in vivo* và nghiên cứu lâm sàng để khẳng định hiệu quả ứng dụng [18].

Trong nghiên cứu này, biofilm *P. gingivalis* hình thành sau 48 h và 72 h được ủ với gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu ở dãy nồng độ 0,06–30,72 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy cả hai chế phẩm đều làm giảm rõ rệt sinh khối biofilm, kể cả ở khoảng nồng độ MTZ thấp 0,06–7,68 $\mu\text{g/mL}$. Cả hai chế phẩm đều làm giảm đáng kể sinh khối biofilm đã hình thành sẵn (>70%) ở nồng độ MTZ 0,24 $\mu\text{g/mL}$. Hệ gel liposome chứa MTZ chưa làm tăng đáng kể hiệu quả kháng biofilm so với gel MTZ nguyên liệu trong điều kiện *in vitro*. Kết quả này có thể liên quan đến đặc tính giải phóng dược chất từ liposome. Han và cộng sự (2024) cũng ghi nhận peptide LL17-32 khi tải vào liposome có hiệu suất liên kết cao nhưng hoạt tính diệt khuẩn đối với *P. gingivalis* giảm so với dạng tự do, có thể do hoạt chất được giải phóng hạn chế. Tuy vậy, đặc tính giải phóng chậm của hệ liposome vẫn có tiềm năng cho các dạng thuốc bám dính niêm mạc và giải phóng kéo dài tại khoang miệng [41].

Thử nghiệm ức chế hình thành biofilm trong nghiên cứu này được tham khảo từ Ando và cộng sự (2025), trong đó huyền dịch *P. gingivalis* được đồng ủ với hoạt chất thử trên khay 96 giếng đáy phẳng và sinh khối biofilm được định lượng bằng phương pháp nhuộm CV [18]. Một hướng tiếp cận tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Hiroshima và cộng sự (2023), khi peptide kháng khuẩn β -defensin 2 (BD-2) được bao gói trong liposome nhằm cải thiện khả năng vận chuyển đến tế bào biểu mô miệng. Cả BD-2 tự do và liposome BD-2 đều làm giảm đáng kể sự bám dính của *P. gingivalis*, có thể liên quan đến đặc tính cation và lưỡng tính của BD-2, giúp tương tác với màng vi khuẩn và cản trở quá trình bám dính. Kết quả này cho thấy liposome là hệ mang tiềm năng trong phát triển các tác nhân sinh học hỗ trợ phòng ngừa bệnh nha chu [42].

Trong nghiên cứu này, gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu ở dãy nồng độ 0,06–30,72 $\mu\text{g/mL}$ được đồng ủ với huyền dịch *P. gingivalis* trong môi trường BHI bổ sung hemin và vitamin K, ở 37°C, điều kiện kỵ khí trong 48 h hoặc 72 h. Sau ủ, tổng sinh khối biofilm hình thành được định lượng bằng phương pháp nhuộm CV và đo OD. Kết quả cho thấy cả hai chế phẩm đều ức chế rõ sự hình thành biofilm theo xu hướng phụ thuộc nồng độ. Trường hợp cho vi khuẩn và thuốc thử vào ủ chung trong 48 h, cả hai chế phẩm ức chế đáng kể (>70%) sự hình thành biofilm ở nồng độ MTZ 0,12 $\mu\text{g/mL}$ và ức chế gần như hoàn toàn (>95%) từ nồng độ MTZ 0,24 $\mu\text{g/mL}$. Trong khi đó, trường hợp cho vi khuẩn và thuốc thử vào ủ chung trong 72 h, hiệu quả ức chế >70% đạt được ở nồng độ MTZ cao hơn là 0,24 $\mu\text{g/mL}$ và từ nồng độ MTZ 0,48 $\mu\text{g/mL}$ trở lên hai chế phẩm ức chế đáng kể sự hình thành sinh khối biofilm.

Kết quả của cả hai thử nghiệm, gồm đánh giá tác dụng trên biofilm đã hình thành và ức chế sự hình thành biofilm, cho thấy gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu có hiệu quả gần như tương đương nhau. Điều này có thể do nghiên cứu sử dụng mô hình biofilm đơn loài *P. gingivalis* trên khay 96 giếng, là mô hình *in vitro* đơn giản, chưa tái hiện đầy đủ cấu trúc biofilm đa loài, ba chiều và các điều kiện động trong khoang miệng như dòng chảy nước bọt, dịch nước và ứng suất cắt. Trong điều kiện thử nghiệm tĩnh, nồng độ thuốc được duy trì ổn định và hàng rào biofilm đơn loài chưa đủ phức tạp, do đó lợi thế của hệ liposome có thể chưa thể hiện rõ so với MTZ nguyên liệu. Nhận định này phù hợp với nghiên cứu của Chen và cộng sự (2023), trong đó, liposome chứa ginsenoside Rh2 cho hiệu quả tương tự hoạt chất tự do trong mô hình đơn loài, nhưng hệ liposome gần kháng thể đặc hiệu với *P. gingivalis* thể hiện ưu thế rõ hơn trong mô hình đa loài và *in vivo*. Kết quả cho thấy các hệ nano có thể phát huy lợi thế tốt hơn trong những mô hình sinh học phức tạp, gần với điều kiện bệnh lý thực tế hơn [43]. Vì vậy, với kết quả nghiên cứu trên cho thấy sự tương đồng trong việc sử dụng liposome làm chất mang để đánh giá khả năng diệt khuẩn trong các thử nghiệm *in vitro* trên vi khuẩn đơn loài có thể chưa thấy được sự khác biệt rõ ràng giữa nano và nguyên liệu gốc [43]. Tuy nhiên, điều này lại mở ra hướng đi mới về việc tiếp tục thử nghiệm các công thức gel chứa MTZ liposome trên các mô hình gây viêm nha chu *in vivo* ở động vật thí nghiệm cũng như trên các chủng vi khuẩn gây bệnh viêm nha chu khác, đồng thời đánh giá các đặc tính, số phận của dạng liposome trong các điều kiện thử nghiệm sẽ góp phần luận giải thêm cho các kết quả đã đạt được trong các nghiên cứu tiếp theo. Ngoài ra, CV nhuộm cả tế bào sống, tế bào chết và chất nền ngoại bào, do đó sự thay đổi OD phản ánh tổng sinh khối còn bám trên giếng, không phản ánh trực tiếp khả năng sống của vi khuẩn. Do đó, các phương pháp resazurin, XTT, Syto9,... để định lượng tế bào sống/chết có thể được xem xét sử dụng trong nghiên cứu tiếp theo để làm rõ hơn cơ chế kháng biofilm của các công thức [44]. Trong nghiên cứu này, từng thử nghiệm được đánh giá trên các giếng kỹ thuật trong một lần thí nghiệm, do đó, việc không thực hiện kiểm định giả thuyết trên các giếng kỹ thuật giúp tránh hiện tượng giả lập và nguy cơ đánh giá thấp độ không chắc chắn [45, 46]. Do đó, các kết quả quan sát trong nghiên cứu này được xem là bằng chứng về xu hướng tác dụng của các thử nghiệm.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã khảo sát được các điều kiện tạo biofilm *in vitro* đối với vi khuẩn gây viêm nha chu *P. gingivalis*. Môi trường BHI bổ sung hemin 5 µg/mL và vitamin K 1 µg/mL được xác định là môi trường phù hợp nhất cho quá trình hình thành biofilm. Về thời gian nuôi cấy, tại cả hai thời điểm 48 và 72 h, *P. gingivalis* đều thể hiện khả năng tạo biofilm ở mức trung bình đến mạnh. Như vậy, điều kiện thích hợp để tạo biofilm *P. gingivalis* trong phạm vi nghiên cứu này là nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường BHI bổ sung hemin 5 µg/mL và vitamin K 1 µg/mL, ở 37 °C trong điều kiện kỵ khí trong 48 hoặc 72 h. *P. gingivalis* ATCC 33277 nhạy cảm với cả gel MTZ Lipo và gel MTZ nguyên liệu với giá trị MIC của hai chế phẩm lần lượt là ≤ 0,03 µg/mL và 0,06 µg/mL. Cả hai chế phẩm đều làm giảm đáng kể tổng sinh khối biofilm đã hình thành sẵn ở nồng độ MTZ 0,24 µg/mL. Đối với sự hình thành biofilm, hai chế phẩm ức chế đáng kể sinh khối biofilm ở nồng độ MTZ lần lượt là 0,24 µg/mL sau 48 h và 0,48 µg/mL sau 72 h. Gel MTZ Lipo có hoạt tính giảm sinh khối biofilm, nhưng ưu thế so với gel MTZ nguyên liệu chưa rõ trong mô hình *in vitro* này. Dữ liệu về khả năng kháng khuẩn, giảm sinh khối của gel MTZ Lipo trong nghiên cứu này cung cấp dữ liệu *in vitro* ban đầu và tiềm năng định hướng trong các nghiên cứu về bệnh nha chu ở các giai đoạn tiếp sau.

Tuyên bố về xung đột lợi ích

Các tác giả khẳng định không có xung đột lợi ích đối với các nghiên cứu, tác giả, và xuất bản bài báo.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài cấp Đại học Huế mã số DHH 2024-04-227 và được tài trợ một phần bởi Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế đối với nhóm nghiên cứu tiêu biểu mã số NCTB.YDH.2026.03.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-90. doi:10.3201/eid0809.020063.
2. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22. doi:10.1126/science.284.5418.1318.

3. Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, Schwartz SA, Bruggemann L, Aalinkel R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*. 2023;11(6). doi:10.3390/microorganisms11061614.
4. Võ Chí Hùng. *Porphyromonas gingivalis* - vai trò trong cơ chế bệnh sinh viêm nha chu và xu hướng mới trong điều trị. *Thời sự Y học*. 2016;11:63-4.
5. Bộ Y tế. Dược thư quốc gia Việt Nam. *Nhà xuất bản Y học*. 2018.
6. Lê TMN, Phạm TTH, Nguyễn TKN, Hồ HN. Nghiên cứu bào chế và đánh giá một số đặc tính lý hóa của liposome metronidazol. *Tạp chí Y Dược Huế, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế*. 2024;Số đặc biệt tháng 6/2024:131-7.
7. Liang G, Shi H, Qi Y, Li J, Jing A, Liu Q, et al. Specific Anti-biofilm Activity of Carbon Quantum Dots by Destroying *P. gingivalis* Biofilm Related Genes. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;Volume 15:5473-89. doi:10.2147/ijn.S253416.
8. Li YY, Li BS, Liu WW, Cai Q, Wang HY, Liu YQ, et al. Effects of D-arginine on *Porphyromonas gingivalis* biofilm. *J Oral Sci*. 2020;62(1):57-61. doi:10.2334/josnusd.19-0075.
9. He Z, Jiang W, Jiang Y, Dong J, Song Z, Xu J, Zhou W. Anti-biofilm activities of coumarin as quorum sensing inhibitor for *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Oral Microbiology*. 2022;14(1):2055523. doi:10.1080/20002297.2022.2055523.
10. Gong M, Zhang R, Qi J, Wang J, Liu Q, Zhou H, et al. In vitro evaluation of the antibacterial effect of colloidal bismuth subcitrate on *Porphyromonas gingivalis* and its biofilm. *Arch Oral Biol*. 2022;133:105300. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105300.
11. Kumbar VM, Peram MR, Kugaji MS, Shah T, Patil SP, Muddapur UM, Bhat KG. Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Odontology*. 2021;109(1):18-28. doi:10.1007/s10266-020-00514-y.
12. Nguyễn Văn Giáp, Cao Thị Bích Phượng. Nghiên cứu sự hình thành màng sinh học (biofilm) và tính đề kháng kháng sinh của tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus spp.*) sản sinh màng sinh học. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 2018;16(8):744-52.
13. Mai Thị Ngọc Lan Thanh, Dương Chí Ái, Lý Hoàng Giáp, Hoàng Anh Hoàng, Trương Vũ Thanh. Hoạt tính kháng sự hình thành biofilm trên chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* từ cao phân đoạn ethyl acetate trầm trôn (*syzygium glomeratum*). *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc*. 2020.
14. Mai Thị Ngọc Lan Thanh, Huỳnh Tấn Hưng, Nguyễn Sang, Nguyễn Thảo Vy, Hoàng Anh Hoàng, Trương Vũ Thanh. Xác định hoạt tính kháng khuẩn, kháng độc tính và kháng biofilm trên chủng *Staphylococcus aureus* của cao phân đoạn ethyl acetate cây cỏ ke (*grewia asiatica* L.). *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc*. 2020.
15. Phạm Thị Thu Hà. Nghiên cứu bào chế gel chứa liposome metronidazole. Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế. 2024.
16. Laranjo M, Andrade N, Queiroga MC. Antibiofilm activity of propolis extracts. In: Torres-Hergueta E, Méndez-Vilas A, editors. Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research. Badajoz, Spain: Formatek Research Center; 2018.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. 2007.
18. Ando D, Lwin HY, Aoki-Nonaka Y, Matsugishi-Nasu A, Minato Y, Warita Y, et al. Ferulic acid suppresses *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation via the inhibition of autoinducer-2 production and receptor activity. *Arch Oral Biol*. 2025;178:106365. doi:10.1016/j.archoralbio.2025.106365.
19. Mehravani M, Houshyar E, Jamalnia S, Gharaaghaji R. Effects of Local and Systemic Metronidazole as Adjunctive Treatment in Chronic Periodontitis Patients. *Clin Exp Dent Res*. 2024;10(6):e70050. doi:10.1002/cre2.70050.
20. Yamawaki I, Taguchi Y, Kato H, Okuda M, Katayama N, Hashimoto N, et al. Effects of pH and glucose concentration on the growth of *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Japanese Journal of Conservative Dentistry*. 2015;58(6):510-7. doi:<https://doi.org/10.11471/shikahozon.58.510>.
21. Al-Jabani MA, Al-Shamahy HA, Al-Akwa AAY, Al-Haddad KA, Al-Kabsia TA, Al-Najhi MMA, et al. *Porphyromonas gingivalis*: Biofilm Formation, Antimicrobial Susceptibility of Isolates from Cases of Localized Aggressive Periodontitis (Lap). *Universal Journal of Pharmaceutical Research*. 2021. doi:10.22270/ujpr.v6i4.633.
22. He L, Wang H, Zhang R, Li H. The regulation of *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation by ClpP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;509(2):335-40. doi:10.1016/j.bbrc.2018.12.071.
23. Qi H, Li B, Wang H, Cai Q, Quan X, Cui Y, Meng W. Effects of d-valine on periodontal or peri-implant pathogens: *Porphyromonas gingivalis* biofilm. *Journal of Periodontology*. 2018;89(3):303-14. doi:10.1002/jper.17-0405.
24. Ullah H, Minno AD, Filippis AD, Sommella E, Buccato DG, Lellis LFD, et al. In Vitro Antimicrobial and Antibiofilm Properties and Bioaccessibility after Oral Digestion of Chemically Characterized Extracts Obtained from *Cistus × incanus* L., *Scutellaria lateriflora* L., and Their Combination. *Foods*. 2023;12(9). doi:10.3390/foods12091826.
25. Milner P. Development of a simple chemically defined medium for *Porphyromonas gingivalis*: requirement for α -ketoglutarate. *FEMS Microbiology Letters*. 1996;140(2-3):125-30. doi:10.1016/0378-1097(96)00159-0.
26. Smiga M, Smalley JW, Ślęzak P, Brown JL, Siemińska K, Jenkins RE, et al. Glycation of Host Proteins Increases Pathogenic Potential of *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(21). doi:10.3390/ijms222112084.
27. Kesavalu L, Holt SC, Ebersole JL. In vitro environmental regulation of *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(4):226-33. doi:10.1034/j.1399-302x.2003.00071.x.
28. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(1):119-44. doi:10.1016/j.femsre.2004.09.001.
29. Hunt SM, Werner EM, Huang B, Hamilton MA, Stewart PS. Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(12):7418-25. doi:10.1128/aem.70.12.7418-7425.2004.
30. Tavares LJ, Klein MI, Panariello BHD, Dorigatti de Avila E, Pavarina AC. An in vitro model of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* in single- and dual-species biofilms. *Journal of Periodontal & Implant Science*. 2018;48(1). doi:10.5051/jpis.2018.48.1.12.
31. Gerits E, Verstraeten N, Michiels J. New approaches to combat *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Oral Microbiol*. 2017;9(1):1300366. doi:10.1080/20002297.2017.1300366.

32. He Z, Zhang X, Song Z, Li L, Chang H, Li S, Zhou W. Quercetin inhibits virulence properties of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *Sci Rep*. 2020;10(1):18313. doi:10.1038/s41598-020-74977-y.
33. Allkja J, Bjarnsholt T, Coenye T, Cos P, Fallarero A, Harrison JJ, et al. Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates. *Biofilm*. 2020;2:100010. doi:10.1016/j.biofilm.2019.100010.
34. Serbanescu MA, Oveisi M, Sun C, Fine N, Bosy A, Glogauer M. Metronidazole enhances killing of *Porphyromonas gingivalis* by human PMNs. *Front Oral Health*. 2022;3:933997. doi:10.3389/froh.2022.933997.
35. Conrads G, Klomp T, Deng D, Wenzler JS, Braun A, Abdelbary MMH. The Antimicrobial Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis*: Genetic Repertoire, Global Phenotype, and Review of the Literature. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(12). doi:10.3390/antibiotics10121438.
36. Basudan AM. Nanoparticle based periodontal drug delivery - A review on current trends and future perspectives. *Saudi Dent J*. 2022;34(8):669-80. doi:10.1016/j.sdentj.2022.09.006.
37. Dash A, Ragavendran C. Innovative approaches to combating dental biofilms: Nanotechnology and its applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2024;61. doi:10.1016/j.bcab.2024.103406.
38. Petelin M, Pavlica Z, Ivanusa T, Sentjurc M, Skaleric U. Local delivery of liposome-encapsulated superoxide dismutase and catalase suppress periodontal inflammation in beagles. *J Clin Periodontol*. 2000;27(12):918-25. doi:10.1034/j.1600-051x.2000.027012918.x.
39. Shi J, Zhang Y, Zhang X, Chen R, Wei J, Hou J, et al. Remodeling immune microenvironment in periodontitis using resveratrol liposomes as an antibiotic-free therapeutic strategy. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):429. doi:10.1186/s12951-021-01175-x.
40. Ishikado A, Uesaki S, Suido H, Nomura Y, Sumikawa K, Maeda M, et al. Human trial of liposomal lactoferrin supplementation for periodontal disease. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(10):1758-62. doi:10.1248/bpb.33.1758.
41. Han J, Meade J, Devine D, Sadeghpour A, Rappolt M, Goycoolea FM. Chitosan-coated liposomal systems for delivery of antibacterial peptide LL17-32 to *Porphyromonas gingivalis*. *Heliyon*. 2024;10(14):e34554. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e34554.
42. Hiroshima Y, Kido JI, Kido R, Yoshida K, Bando M, Kajimoto K, et al. beta-defensin 2 synthesized by a cell-free protein synthesis system and encapsulated in liposomes inhibits adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to oral epithelial cells. *Odontology*. 2023;111(4):830-8. doi:10.1007/s10266-023-00789-x.
43. Chen R, Ji Y, Li T, Zhao B, Guo H, Wang Z, et al. Anti-*Porphyromonas gingivalis* nanotherapy for maintaining bacterial homeostasis in periodontitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2023;61(6):106801. doi:10.1016/j.ijantimicag.2023.106801.
44. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):157-65. doi:10.1016/j.mimet.2007.11.010.
45. Czuba LC, Isoherranen N. LX-2 Stellate Cells Are a Model System for Investigating the Regulation of Hepatic Vitamin A Metabolism and Respond to Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin 1beta. *Drug Metab Dispos*. 2024;52(5):442-54. doi:10.1124/dmd.124.001679.
46. Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, Binshtein E, Chen RE, Nkolola JP, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;584(7821):443-9. doi:10.1038/s41586-020-2548-6.