

CÔNG NGHỆ SINH HỌC Y DƯỢC

THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CỦA TINH DẦU QUẢ MÀNG TANG (*Litsea cubeba*)

Chu Thanh Bình^{1*}, Trương Thị Chiên², Đào Ngọc Ánh², Nguyễn Hữu Thắng³

¹Viện Y học Dự phòng Quân đội

²Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này nhằm phân tích thành phần hóa học của tinh dầu quả Màng tang (*Litsea cubeba*) thu thập tại Lai Châu, Việt Nam và đánh giá khả năng kháng của tinh dầu này với các vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy *Shigella sonnei* ATCC25931, *Salmonella enterica* YHDP01 và *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Bằng phương pháp GC-MS, kết quả cho thấy, đã phân tích và nhận diện được 24 chất trong tinh dầu quả Màng tang, trong đó citral là thành phần chính (75,65%). Với phương pháp khuếch tán đĩa thạch, tinh dầu quả Màng tang thể hiện hoạt tính kháng với cả 3 chủng vi khuẩn kiểm định ở nồng độ tinh dầu từ 1%. Nồng độ tối thiểu ức chế sinh trưởng đối với ba chủng vi khuẩn *S. sonnei* ATCC25931, *S. enterica* YHDP01, *S. aureus* ATCC25923 của tinh dầu quả Màng tang là 0,75 $\mu\text{L/mL}$. Đây là nghiên cứu mới về thành phần hóa học và khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy của tinh dầu từ quả Màng tang thu thập tại Lai Châu. Với những kết quả nghiên cứu này đạt được cho thấy, tinh dầu quả Màng tang là nguồn hoạt chất tự nhiên tiềm năng để phát triển sản phẩm ứng dụng trong lĩnh vực y dược cũng như trong thực phẩm.

Từ khóa: Kháng khuẩn, *Litsea cubeba*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, tinh dầu.

MỞ ĐẦU

Dự báo đến năm 2050, trên thế giới có khoảng 10 triệu người chết do kháng kháng sinh, trong đó khu vực châu Á chiếm khoảng 4,7 triệu người, châu Phi khoảng 4,1 triệu người (Anderson, 2023). Việc nghiên cứu, lựa chọn các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên như tinh dầu thay thế các chất kháng sinh đang rất được quan tâm trên thế giới. Tại Việt Nam, có 8 vùng trồng cây dược liệu lớn như Lai Châu, Hưng Yên, Lâm Đồng... đây là nguồn nguyên liệu tự nhiên cho nghiên cứu và khai thác các hoạt chất kháng khuẩn. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, tinh dầu từ thực vật có hoạt tính kháng khuẩn, chống ô xi hóa, chống côn trùng và bảo quản thực phẩm (Borotova *et al.*, 2022). Tinh dầu được tích lũy trong các tế bào tiết tại các bộ phận như hạt, chồi, lá, hoa, thân, cành, rễ nên có hương thơm tự nhiên và dễ chịu. Do đó, tinh dầu được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm (Matera *et al.*, 2023).

Shigella, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* là vi khuẩn gây nhiễm độc đường ruột, có khả năng thành dịch tiêu chảy cấp. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã khuyến cáo những vi khuẩn này năm 2024 được xếp vào nhóm vi khuẩn gây bệnh nguy cơ cao bởi sự trầm trọng của mức độ bệnh cũng như chống lại phác đồ điều trị thông thường. Theo số liệu của CDC Hoa Kỳ 2024, ước tính hàng năm trên thế giới có 80-165 triệu ca mắc bệnh và 600.000 ca tử vong gây ra bởi *Shigella*. Trong số đó có khoảng 20-119 triệu ca bệnh và 6.900-30.000 ca tử vong là do lây truyền qua thực phẩm (Garcia *et al.*, 2024). Nghiên cứu lâm sàng cho thấy, riêng *S. aureus* đã gây ra 94.000 ca nhiễm khuẩn nghiêm trọng hàng năm (KaiMa *et al.*, 2014). Sự gia tăng kháng thuốc của vi khuẩn *Salmonella*, *Shigella* và *S. aureus* là một thách thức toàn cầu. Vấn đề này ngày càng trầm trọng hơn ở các nước khi mà việc sử dụng kháng sinh ở người và động vật phần lớn không bị hạn chế (Bedada *et al.*, 2019). Tại Việt Nam, theo số liệu của Cục an toàn thực phẩm (Bộ Y tế), trong Quý 1 năm 2024, có 16 vụ ngộ độc thực phẩm làm 700 người ngộ độc trong đó có 3 người tử vong, tăng gấp 3 lần so với cùng kỳ năm 2023. Tính riêng trong tháng 3 năm 2024, cả nước đã xảy ra 6 vụ ngộ độc thực phẩm làm 369 người bị ngộ độc. Kết quả kiểm nghiệm của Viện Pasteur Nha Trang nhận định những vụ ngộ độc này do vi khuẩn gây ra như *Salmonella*, *S. aureus*, *Shigella*.

Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, tinh dầu Màng tang có khả năng kháng các chủng *S. aureus* đa kháng thuốc. Thành phần citral là thành phần hóa học chính tạo nên hoạt tính kháng *S. aureus* của tinh dầu Màng tang (Hu *et al.*, 2019). Ngoài ra, tinh dầu Màng tang còn thể hiện hoạt tính kháng với *S. enterica*, *Escherichia coli*, *S. sonnei*. Cơ chế kháng khuẩn của tinh dầu Màng tang là gây tổn thương thành và màng tế bào vi khuẩn (Mei *et al.*, 2020; Bai *et al.*, 2023). Trong các loại tinh dầu Màng tang tách chiết từ lá, rễ... thì tinh dầu tách chiết từ quả có hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn (Su *et al.*, 2016).

Tại Việt Nam, cây Màng tang được trồng nhiều tại Lai Châu, Quảng Ninh, Cao Bằng, Lạng Sơn, Lào Cai... Tuy nhiên, chưa có nhiều công bố về thành phần hóa học và khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy của tinh

dầu quả Màng tang thu thập ở các địa phương này. Nghiên cứu này sẽ đưa ra những kết quả cho thấy khả năng ứng dụng tinh dầu từ quả Màng tang trong việc kiểm soát vi khuẩn tiêu chảy nhằm ứng dụng trong lĩnh vực y dược và thực phẩm.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Quả Màng tang (*Litsea cubeba*) thu hái tại tỉnh Lai Châu dùng cho tách chiết tinh dầu. Quả Màng tang dùng trong nghiên cứu được thu hoạch vào tháng 7- 2023 từ cây 5 năm tuổi.

Các chủng vi khuẩn kiểm định thuộc bộ sưu tập chủng Vi sinh vật-Khoa Vi sinh vật, Viện Y học Dự phòng Quân đội: *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Salmonella enterica* YHDP01, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Môi trường nuôi cấy LB (Luria-Bertani) với thành phần (g/L): Pepton 10; Cao nấm men 05; NaCl 1; Agar 20; pH 6,5.

Phương pháp

Phương pháp tách chiết tinh dầu

Quả Màng tang tươi sau thu hoạch được rửa sạch, để khô và nghiền vỡ, sử dụng cho tách chiết tinh dầu bằng hệ thống Clevenger theo phương pháp chưng cất lôi kéo hơi nước. Tinh dầu sau tách chiết được loại nước bằng Na_2SO_4 khan. Mẫu tinh dầu được lưu giữ trong lọ tối màu và bảo quản ở 4°C (Tống Thị Ánh Ngọc, Nguyễn Văn Kiên, 2011).

Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu quả Màng tang

Thành phần hóa học của tinh dầu Màng tang được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí GC/MS (Adam, 2001). Thiết bị sử dụng là GC/MS-QP2020 của Hãng Shimadzu (Nhật Bản), với cột mao quản SH-Rxi-5Sil MS có kích thước 30 m x 0,25 mm, độ dày màng 0,25 μm . Nhiệt độ cột được đặt ở điều kiện 60°C (giữ 2 phút), tăng lên nhiệt độ 120°C với tốc độ 10°C/phút, sau đó tăng lên 240°C với tốc độ 5°C/phút, tiếp đến giữ ở 240°C trong 5 phút. Khí Heli được sử dụng làm khí mang với tốc độ dòng chảy 1,0 ml/phút. Detector khối phổ được cài đặt trong khoảng tín hiệu 50-900 m/z. Thể tích mẫu tiêm vào cột là 1 μl với dung dịch mẫu tinh dầu có nồng độ 1% (w/v) trong hexan. Tỷ lệ chia dòng là 1:20. Kết quả phân tích các thành phần trong mẫu tinh dầu được xử lý bằng cách so sánh về phổ khối của các chất với thư viện NIST.

Đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn kiểm định của tinh dầu bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Vi khuẩn được nuôi cấy 150 vòng/phút, trong môi trường LB dịch thể, ở 37°C, trong 24 giờ. Dịch nuôi được xác định mật độ vi khuẩn dựa trên tiêu chuẩn McFarland 0,5 (BioMerieux Vitek2 compact). Mẫu dịch nuôi vi khuẩn được pha loãng về nồng độ 10^6 tế bào/mL để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Dịch vi khuẩn (50 μL) ở mật độ 10^6 tế bào/mL được cấy trải trên môi trường LB. Các đĩa LB được tạo 1 lỗ ở giữa đĩa với đường kính là 8 mm (Hadacek *et al.*, 2000).

Tinh dầu được pha loãng bằng dimethyl sulfoxide (DMSO) và bổ sung 50 μL tinh dầu pha loãng ở các nồng độ khác nhau (20, 10, 5, 2,5, 1%) vào mỗi giếng. Đĩa đối chứng sử dụng DMSO thay vì tinh dầu, sau đó đem ủ 37°C trong vòng 24 giờ. Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo công thức: $D - d$ (mm), trong đó D là đường kính vòng vô khuẩn, d là đường kính giếng thạch. Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 03 lần, mỗi lần được thực hiện trên 3 đĩa khác nhau cho mỗi công thức xác định hoạt tính kháng (Hadacek *et al.*, 2000).

Xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) sinh trưởng các chủng vi khuẩn kiểm định

Nồng độ tối thiểu ức chế sinh trưởng (MIC) các chủng vi khuẩn kiểm định của tinh dầu quả Màng tang được xác định theo Vu và đồng tác giả (2024) có cải tiến. Môi trường LB được khử trùng ở 121°C trong 20 phút, để nguội xuống 50°C và bổ sung tinh dầu Màng tang vào môi trường đạt tới các nồng độ tinh dầu là 1, 0,75, 0,5 $\mu\text{L/mL}$ và đổ ra đĩa nhựa petri (SPL Life Sciences). Dịch nuôi vi khuẩn được pha loãng thành các nồng độ $10^5, 10^4$ tế bào/mL. Tại mỗi đĩa môi trường chia thành 3 hàng, 3 cột (tức lặp lại thí nghiệm 3 lần/đĩa), nhỏ 5 μL mỗi nồng độ của mỗi loại dịch vi khuẩn vào 1 cột từ $10^6, 10^5, 10^4$ tương đương với số tế bào vi khuẩn là 5000, 500 và 50. Quan sát kết quả sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C. Giá trị MIC là nồng độ tinh dầu mà tại đó 5000 tế bào vi khuẩn bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn (Vu *et al.*, 2024),

Phân tích và xử lý kết quả

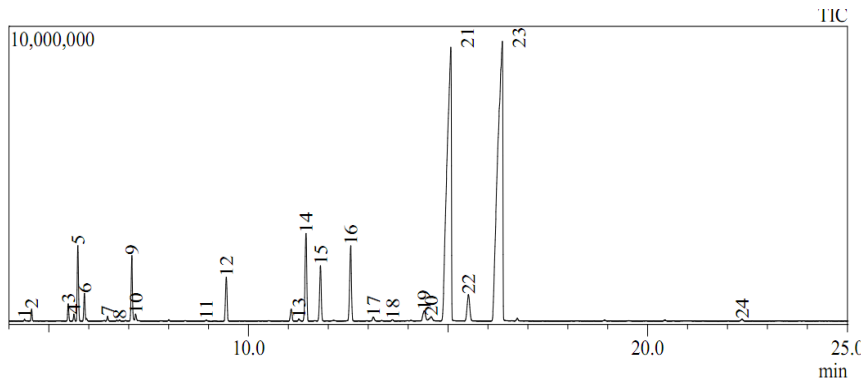
Kết quả được phân tích và xử lý thống kê với kiểm định t-test, sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013. Các kết quả được coi là có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thành phần hóa học của tinh dầu quả Màng tang

Tinh dầu quả Màng tang thu được có màu vàng sáng, hương thơm đặc trưng. Thành phần hóa học của tinh dầu là một trong những căn cứ quan trọng để đánh giá chất lượng tinh dầu, vì vậy, nghiên cứu này tiến hành phân tích thành phần hóa học của mẫu tinh dầu Màng tang, kết quả được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1.

Kết quả nghiên cứu ở Bảng 1 cho thấy, tinh dầu quả Màng tang gồm 24 chất, trong đó, citral là thành phần chủ yếu, chiếm tới 75,65%. Citral là một monoterpene có hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm, làm giảm lo âu, chống ung thư, kháng khuẩn (Pacheco *et al.*, 2023). Các nghiên cứu về thành phần hóa học của tinh dầu quả Màng tang tại Việt Nam chưa có nhiều. Theo các nghiên cứu của Zhao và đồng tác giả (2010), tinh dầu Màng tang có thể được chiết xuất từ các bộ phận khác nhau của cây như quả, rễ, hoa, thân, lá... Kết quả nghiên cứu đã xác định được 18 chất trong tinh dầu từ quả Màng tang chiếm 93,57% tổng lượng tinh dầu; 17 chất từ tinh dầu rễ cây Màng tang, chiếm 98,1% tổng lượng tinh dầu, 28 chất xác định từ tinh dầu lá Màng tang chiếm 95,33% tổng lượng tinh dầu. Trong đó, citral là thành phần chính trong tinh dầu màng tang chiếm tỷ lệ từ 56,64% đến 81,4% (Zhao *et al.*, 2010).



Hình 1. Sắc ký đồ GC/MS của tinh dầu quả Màng tang.

(Ký hiệu pic 1 - 24 tương ứng với 24 chất được liệt kê tại Bảng 1)

Bảng 1. Thành phần hóa học của tinh dầu quả Màng tang thu thập tại Lai Châu

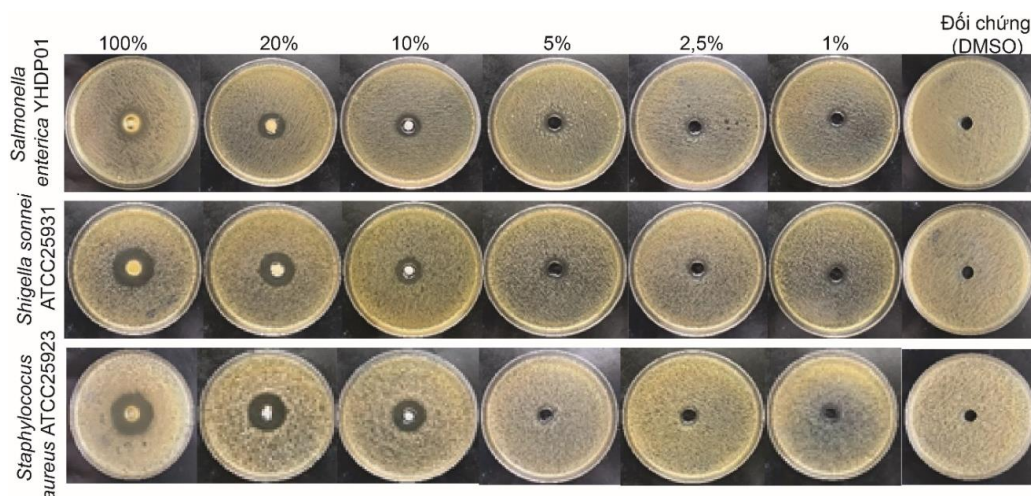
STT	Thành phần hóa học	Thời gian lưu (phút)	Tỷ lệ (%)
1	α -phellandrene	4,394	0,05
2	α -Pinene	4,571	0,34
3	β -Phellandrene	5,488	0,55
4	β -Pinene	5,630	0,24
5	Sulcatone	5,728	2,60
6	β -Myrcene	5,893	0,96
7	γ -Terpinene	6,473	0,16
8	<i>o</i> -Cymene	6,772	0,04
9	<i>D</i> -Limonene	7,080	2,52
10	Eucalyptol	7,176	0,25
11	Terpinolene	8,944	0,03
12	Linalool	9,446	1,96
13	Isopulegol	11,263	0,08
14	Citronellal	11,443	4,40
15	Isoneral	11,806	2,70
16	Isogeranial	12,562	3,93
17	L- α -Terpineol	13,130	0,20
18	<i>Cis</i> -Carveol	13,608	0,05
19	Nerol	14,402	0,77
20	Citronellol	14,579	0,36
21	Z-Citral	15,070	34,23
22	Geraniol	15,510	1,97
23	E-Citral	16,358	41,42
24	Caryophyllene	22,363	0,12

Wang *et al.*, (2010) đã tách chiết tinh dầu Màng tang từ các bộ phận của cây thu thập tại Trung Quốc. Kết quả cho thấy, hàm lượng citral ở quả của Màng tang chiếm 63,57% (Wang *et al.*, 2010). Một nghiên cứu khác của Saikia và đồng tác giả (2013) đã công bố tinh dầu quả Màng tang thu thập tại vùng Prades của Ấn Độ có hàm lượng citral chiếm 84% (Saikia *et al.*, 2013).

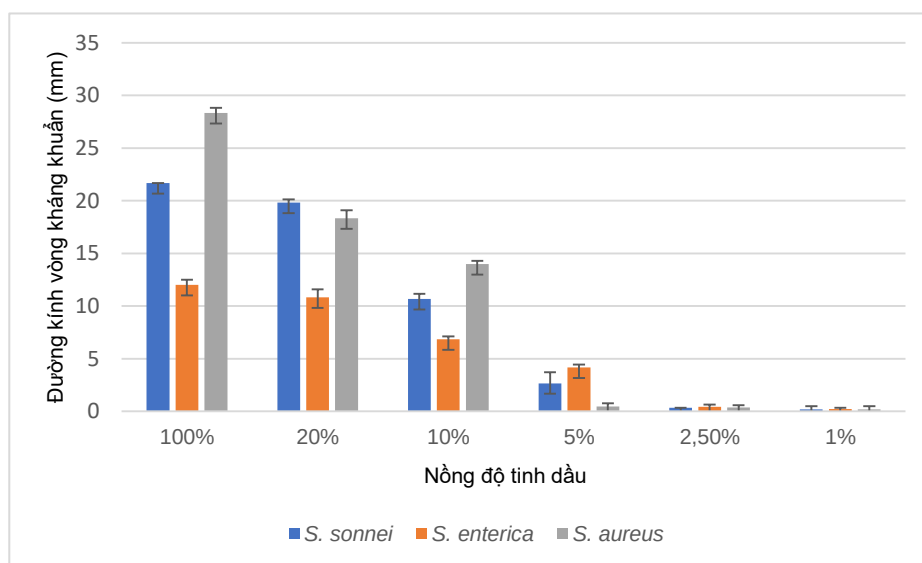
Trong nghiên cứu này, hàm lượng citral có trong tinh dầu quả Màng tang thu thập tại Lai Châu chiếm 75,65%. Sự khác nhau về hàm lượng citral trong tinh dầu Màng tang có thể do ảnh hưởng bởi yếu tố thổ nhưỡng, điều kiện chăm sóc, thời điểm thu hoạch quả. Như vậy, tinh dầu Màng tang trồng tại Việt Nam có chất lượng tương đương với các mẫu tinh dầu Màng tang trên thế giới, đây là nguồn hoạt chất tiềm năng cho phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe và trong công nghiệp thực phẩm.

Hoạt tính kháng vi khuẩn kiểm định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Nhằm định hướng ứng dụng tinh dầu quả Màng tang vào việc phát triển các sản phẩm kháng khuẩn, nghiên cứu này tiến hành đánh giá khả năng kháng 3 chủng vi khuẩn *S. sonnei* ATCC 25931, *S. enterica* YHDP01, *S. aureus* ATCC 25923 của tinh dầu quả Màng tang. Kết quả cho thấy, tinh dầu quả Màng tang thể hiện hoạt tính kháng trên cả 3 chủng vi khuẩn kiểm định ở nồng độ tinh dầu từ 1-100%, tuy nhiên, khả năng kháng khuẩn giảm đi khi tinh dầu quả Màng tang được pha loãng. Tại nồng độ tinh dầu pha loãng tới 1%, tinh dầu vẫn thể hiện hoạt tính kháng cả 3 chủng vi khuẩn trên (Hình 2 và Hình 3). Tinh dầu có hoạt tính kháng khuẩn là do chúng có khả năng phá vỡ cấu trúc tế bào của vi khuẩn (Nazzaro *et al.*, 2013). Tinh dầu làm mất đi sự ổn định của lớp photpholipid, tăng tính thấm của màng tế bào (Tassou *et al.*, 2000).



Hình 2. Khả năng kháng các chủng vi khuẩn của tinh dầu quả Màng tang ở các nồng độ pha loãng khác nhau



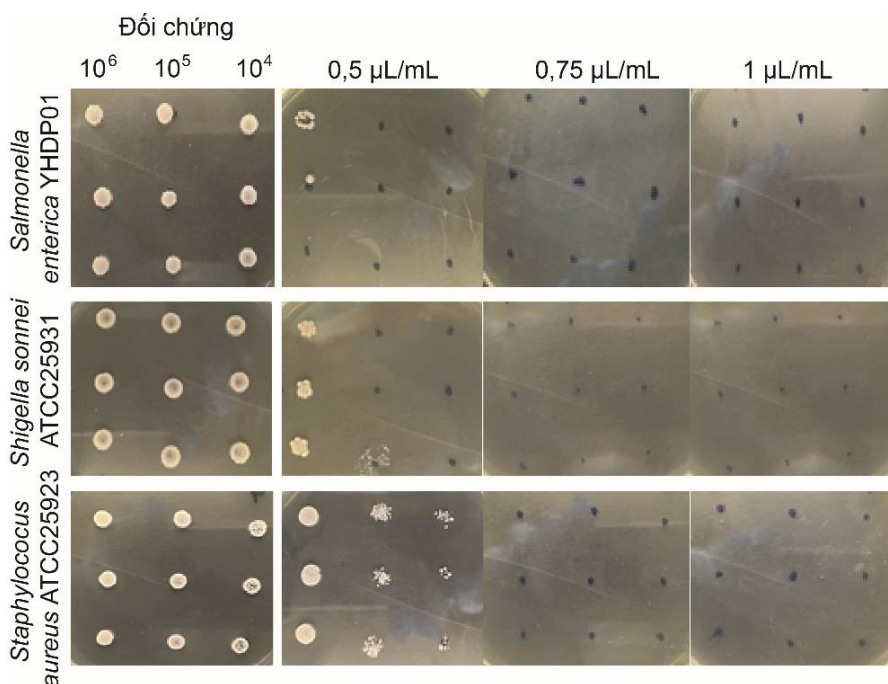
Hình 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của tinh dầu quả Màng tang ở các nồng độ khác nhau
(Các kết quả có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$)

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy của tinh dầu quả Màng tang chưa nhiều, đặc biệt là chưa có nghiên cứu về hoạt tính kháng với *S. enterica* và *S. sonnei*. Nhóm nghiên cứu của Đại học Bách khoa Hà Nội đã thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của tinh dầu quả Màng tang với *S. typhimurium* và *S. aureus* cho kết quả đường kính kháng khuẩn trung bình là 33 và 45 mm (Nguyễn Hải Vân *et al.*, 2021). Vũ Thu Trang và Nguyễn Thị Hoa (2015) đã nghiên cứu khảo sát khả năng kháng *S. aureus* của tinh dầu Màng tang. Kết quả cho thấy tinh dầu Màng tang có hoạt tính kháng *S. aureus* với đường kính vòng kháng khuẩn là 60 mm (Vũ Thu Trang, Nguyễn Thị Hoa, 2015). Lê Huy Hoàng và đồng tác giả (2023) đã thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết từ quả Màng tang với các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* và *S. typhi* cho đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 16,8; 13,5; 13,3 mm.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu quả Màng tang với các chủng vi khuẩn kiểm định

Với mục đích ứng dụng tinh dầu Màng tang vào sản xuất các sản phẩm dược liệu thì việc xác định được giá trị MIC của tinh dầu ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng *S. enterica* YHDP01, *S. sonnei* ATCC 25931, *S. aureus* ATCC 25923 là yêu cầu đầu tiên. Kết quả nghiên cứu đã xác định được giá trị MIC của tinh dầu Màng tang đối với 3 chủng vi khuẩn trên là 0,75 $\mu\text{L/mL}$ (Hình 4).

Qiu và đồng tác giả (2021) đã cho thấy giá trị MIC của tinh dầu Màng tang đối với *S. aureus* là 20 $\mu\text{g/mL}$, *Shigella* là 625 $\mu\text{g/mL}$, *Salmonella* là 625 $\mu\text{g/mL}$. Nghiên cứu của Mei và đồng tác giả (2020) cho thấy giá trị MIC của tinh dầu Màng tang đối với *S. enterica* và *E. coli* là 0,9 $\mu\text{g/mL}$. Bai và đồng tác giả (2023) đã công bố giá trị MIC của tinh dầu Màng tang với *S. sonnei* ATCC 25931 và *S. sonnei* CMCC 51592 lần lượt là 4 và 6 $\mu\text{L/mL}$. Như vậy, tinh dầu quả Màng tang thu thập tại Lai Châu thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh. Đây là nguồn hoạt chất tự nhiên tiềm năng cho phát triển các sản phẩm kháng khuẩn ứng dụng trong y dược và thực phẩm.



Hình 4. Nồng độ tối thiểu ức chế sinh trưởng của tinh dầu quả Màng tang

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã đánh giá được thành phần hóa học của tinh dầu quả Màng tang thu thập tại Lai Châu gồm 24 chất trong đó citral chiếm tới 75,65%. Tinh dầu quả Màng tang thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với 3 chủng *S. sonnei* ATCC 25931, *S. enterica* YHDP01, *S. aureus* ATCC 25923 với giá trị MIC là 0,75 $\mu\text{L/mL}$. Như vậy, tinh dầu quả Màng tang thu thập tại Lai Châu có nhiều tiềm năng ứng dụng trong y dược và thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adam (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. *Allured publishing corp*, 456-466.
- Anderson S (2023). Antimicrobial resistance death toll could catch up to cancer by 2050, and pollution is fuelling its spread. *Health Policy Watch, Climate and Health*.
- Bai X, Chen T, Liu X, Liu Z, Ma R, Su R, Li X, Lü X, Xia X, Shi C (2023). Antibacterial activity and possible mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against *Shigella sonnei* and its application in lettuce. *Foodborne Pathog Dis*, 20: 138-148.

- Bedada T, Zelalem T (2019). *Salmonella* and *Shigella* among patients with diarrhea at public health facilities in Adama, Ethiopia: Prevalence, antimicrobial susceptibility pattern, and associated factors. *SAGE Open Med*, 7: 38-43.
- Borotová P, Galovičová L, Nenad L, Vukovic M, Kunová S, Hanus P (2022). Role of *Litsea cubeba* essential oil in agricultural products safety: antioxidant and antimicrobial applications. *Plants (Basel)*, 11: 1504-1515.
- Garcia A, Williams, Esschert K, Logan N (2024). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024 Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. *US CDC Yellow Book 2024 Shigellosis*.
- Hadacek F, Greger (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal*, 11: 137-147.
- Hu W, Li C, Dai J, Cui H, Lin L (2019). Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Ind Crop Prod*, 130: 34-41.
- KaiMa, Yi D, Yu B, Dixon X, Erning C, Huijuan W, Baoming L, Lijuan G (2014). Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. *Food Control*, 42: 87-93.
- Lê Huy Hoàng, Lê Thúy Anh, NghiêM Ngọc Hoa, Phạm Kiên Cường (2023). Chiết xuất và khảo sát thành phần hóa học của các cao chiết từ quả Màng tang *Litsea cubeba* Lour. Pers. *Tạp chí KH và CN Đại học Thái Nguyên*, 228: 13-18.
- Matera R, Lucchi E, Valgimigli L (2023). Plant Essential Oils as Healthy Functional Ingredients of Nutraceuticals and Diet Supplements: A Review. *Molecules*, 28: 901-925.
- Mei C, Wang X, Chen Y, Wang Y, Yao F, Li Z, Gu Q, Song D (2020). Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Food Safety*, 40: 12809-12820.
- Nazzaro F, Fratianni F, Martino L, Coppola R, Feo V (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6: 1451-1474.
- Nguyễn Hải Vân, Phan Thanh Tâm, Chu Kỳ Sơn, Nguyễn Thị Thu Trang (2021). Hoạt tính và tương tác kháng khuẩn của tinh dầu quả màng tang và chitosan đối với vi khuẩn gây bệnh thực phẩm. *Engin Technol Sus Dev*, 31: 001-006.
- Pacheco M, Moreno H, Lopez M, Guadarrama N, Zavala J, Ramirez L, Romero J (2023). Mechanisms and applications of citral's antimicrobial properties in food preservation and pharmaceuticals formulations. *Antibiotics*, 12: 11-23.
- Qiu Y, Yu Y, Lan P, Wang Y, Li Y (2021). An overview on total valorization of *Litsea cubeba* as a new woody oil plant resource toward a Zero-Waste Biorefinery. *Molecules*, 26: 3948-3961.
- Saikia A, Chetia D, D'Arrigo M, Smeriglio A (2013). Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. From north-east India-chemical composition and antimicrobial activity. *J Essent Oil Res*, 25: 330-338.
- Su YC, Ho CL (2016). Essential oil compositions and antimicrobial activities of various parts of *Litsea cubeba* from Taiwan. *Nat Prod Com*, 11(4), 515-518.
- Tassou C, Koutsoumanis K., Nychas G (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res Int*, 33: 273-280.
- Tổng Thị Ánh Ngọc, Nguyễn Văn Kiên (2011). Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chưng cất tinh dầu gừng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 19:62-69.
- Vu XT, Tran T, Vu HH, Le THY, Nguyen PH, Do TT, Nguyen TH, Tran VT (2024). Ethanolic extract from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* HL8 exhibits cytotoxic activities against cancer cells, skin pathogenic yeasts, and postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. *Arch Microbiol*, 206: 97-109.
- Vũ Thu Trang, Nguyễn Thị Hoa (2015). Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* khi sử dụng kết hợp các loại tinh dầu Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53: 417-424.
- Wang H, Liu Y (2010). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Different Parts of *Litsea cubeba*. *Chem Biodiver*, 7: 11-19.
- Zhao, Zhou O, Ban M (2010). Analysis of volatile oil from different parts of *Litsea cubeba* (in Chinese). *J Chin Med Mater*, 33: 1417-1419.

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST DIARRHEA-CAUSING BACTERIA OF *Litsea cubeba* FRUIT ESSENTIAL OIL

Chu Thanh Binh^{1*}, Truong Thi Chien², Dao Ngoc Anh², Nguyen Huu Thang³

¹Military Institute of Preventive Medicine

²Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology

³Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

The aim of this study was to determine the chemical composition essential oils of *Litsea cubeba* fruit collected in Lai Chau, Viet Nam and antimicrobial properties antagonistic diarrhea – causing bacteria *Shigella sonnei* ATCC25931, *Salmonella enterica* YHDP01, *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Using the GC-MS method, the results analyzed and identified 24 compounds in *Litsea cubeba* fruit essential oil collected from Lai Chau, with citral being the main component (75.65%). By the agar disk diffusion method, *Litsea cubeba* fruit essential oil demonstrated strong antibacterial activity against all three diarrhea-causing bacterial strains (*S. sonnei* ATCC 25931, *S. enterica* YHDP01, *S. aureus* ATCC 25923) with essential oil concentration from 1%. The minimum inhibitory concentration for the growth of the three bacterial strains of *Litsea cubeba* fruit essential oil is 0.75 µL/mL. This is a novel study on the chemical composition and antibacterial activity against diarrhea-causing bacteria of the essential oil from *Litsea cubeba* fruit collected in Lai Chau. These results of this research indicate that *Litsea cubeba* fruit essential oil is a potential natural source of active ingredients for developing products in the fields of medicine and food.

Keywords: Antibacterial, *Litsea cubeba*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, essential oil.

* Author for correspondence: Tel.: 0977408574; Email: chuthanhbinhvn@gmail.com

SÀNG LỌC DI TRUYỀN TIỀN LÀM TỔ BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI CHO BỆNH DI TRUYỀN HIẾM GẶP LY THƯỢNG BÌ BÓNG NƯỚC: BÁO CÁO MỘT TRƯỜNG HỢP

Nguyễn Trương Thái Hà¹, Nguyễn Bảo Trâm², Hà Nhật Anh¹

¹IVFMD, Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức

²IVFMDPN, Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận

TÓM TẮT

Ly thượng bì bóng nước vùng kết nối (Junctional epidermolysis bullosa-JEB) là một bệnh di truyền hiếm gặp khiến làn da dễ hình thành các mụn nước hoặc phỏng rộp khi có ma sát nhẹ trên da. Dạng nghiêm trọng có thể khởi phát ngay từ khi mới sinh ra, các vết phỏng rộp xuất hiện diện rộng trên cơ thể, thậm chí xuất hiện trong lớp niêm mạc như trong khoang miệng hoặc đường tiêu hoá. Khi cả bố và mẹ đều là người lành mang đột biến gen sẽ có 25% khả năng sinh con mắc hội chứng JEB. Sàng lọc di truyền phôi tiền làm tổ (Preimplantation Genetic testing-PGT) là phương pháp được lựa chọn để các gia đình mang gen tránh mang thai và sinh bé mắc bệnh. Một cặp vợ chồng đã có con mắc bệnh ly thượng bì bóng nước được xét nghiệm di truyền bằng kỹ thuật NGS. Kết quả di truyền cho thấy người con mắc bệnh mang đột biến dị hợp tử kép trên gen *LAMA3*, đột biến dị hợp trên gen *LAMC2* và cặp vợ chồng đều là người lành mang đột biến gen *LAMA3*, *LAMC2*. Chỉ định thực hiện PGT bằng kỹ thuật giải trình tự gen thể hệ mới trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm nhằm sàng lọc phôi mang đột biến dị hợp kép gen *LAMA3*, đột biến dị hợp gen *LAMC2* di truyền từ bố và mẹ. Chỉ có một trong bốn phôi được thực hiện PGT cho kết quả không mang đột biến *LAMA3* di truyền từ mẹ và không mang bất thường nhiễm sắc thể, được chuyển vào tử cung người mẹ. Bệnh nhân mang thai và sinh một bé gái khoẻ mạnh, không có triệu chứng của bệnh JEB bẩm sinh. Sàng lọc di truyền phôi tiền làm tổ là phương pháp hiệu quả cho các cặp vợ chồng đều là người lành mang gen gây bệnh ly thượng bì bóng nước vùng kết nối mà không phải chấm dứt thai kỳ hay sinh bé mắc bệnh.

Từ khóa: Giải trình tự gen thể hệ mới, JEB, *LAMA3*, *LAMC2*, ly thượng bì bóng nước, PGT, thụ tinh trong ống nghiệm.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ly thượng bì bóng nước vùng kết nối (Junctional epidermolysis bullosa-JEB) là một bệnh di truyền hiếm gặp khiến làn da cực kỳ mỏng manh, dễ bị rách, hình thành các vết loét, mụn nước hoặc phỏng rộp khi có ma sát nhẹ như gãi hoặc cọ sát khi chuyển động, hoặc chấn thương nhẹ. Dạng nghiêm trọng (Herlitz-Junctional Epidermolysis Bullosa-H-JEB) mất hoàn toàn vùng kết nối giữa các lớp da, khởi phát ngay từ khi mới sinh ra, các vết phỏng rộp xuất hiện diện rộng trên cơ thể, thậm chí xuất hiện trong lớp niêm mạc như trong khoang miệng, thực quản, trực tràng, dạ dày, ruột... gây khó ăn uống và khó tiêu hoá khiến trẻ suy dinh dưỡng, chậm phát triển. Sự phỏng rộp lan rộng dẫn đến hình thành sẹo và các mảng mô hạt. Mô hạt dễ chảy máu khiến trẻ sơ sinh dễ bị nhiễm trùng nghiêm trọng. Ngoài ra, sự tích tụ mô hạt trong khí quản có thể dẫn đến tiếng kêu yếu, khàn và khó thở. Trẻ mắc bệnh H-JEB còn gặp các biến chứng khác bao gồm sự dính khớp của ngón tay và ngón chân, các bất thường ở móng tay và móng chân, biến dạng khớp, hạn chế cử động, rụng tóc men răng mỏng. Trẻ sơ sinh mắc bệnh này thường không thể sống sót sau năm đầu đời do các biến chứng nặng hoặc nhiễm trùng nặng (Kiritsi *et al.*, 2013). Dạng nhẹ hơn (Non-Herlitz Junctional Epidermolysis Bullosa-NH-JEB) có thể có thời điểm khởi phát bệnh muộn hơn, các vết phỏng rộp ban đầu chỉ xuất hiện giới hạn ở bàn tay, bàn chân, đầu gối, khuỷu tay và thường cải thiện sau thời kỳ sơ sinh. Các đặc điểm đặc trưng khác của dạng NH-JEB lại không đồng nhất về mức độ nghiêm trọng và ảnh hưởng khác nhau ở các mô khác nhau, tuy hầu hết những người bị ảnh hưởng không có sẹo hoặc không hình thành mô hạt rộng, do đó khó thở và các biến chứng nghiêm trọng khác hiếm gặp hơn. Người mắc bệnh NH-JEB có thể sống sót đến thời kỳ trưởng thành (Has *et al.*, 2020). Ngoài ra còn có một phân nhóm của bệnh JEB là hội chứng Laryngo-onycho-cutaneous (LOC) gây ra các bất thường ở thanh quản (Laryngo), móng tay hoặc móng chân (Onycho), da (cutaneous). Hội chứng này chỉ do đột biến trên gen *LAMA3*, được phát hiện trong cộng đồng người Hồi giáo Punjabi và được đặc trưng bởi sự hình thành và phát triển quá mức của mô hạt trên niêm mạc thanh quản, kết mạc, vùng da bị chấn thương do cơ chế tự làm lành vết thương lặp đi lặp lại. Khi mô hạt hình thành quá nhiều có thể gây mù loà hoặc tắt đường thở dẫn đến tử vong (Kiritsi *et al.*, 2013).

Nguyên nhân gây bệnh JEB do protein Laminin 332 bị giảm hoặc mất chức năng. Laminin là một nhóm protein tham gia điều hoà phát triển, vận động và gắn kết của tế bào, đồng thời tham gia vào việc hình thành và tổ chức

các màng đáy, là những cấu trúc mỏng dạng tấm giúp ngăn cách và hỗ trợ các tế bào trong nhiều mô. Laminin 332 có vai trò đặc biệt quan trọng trong cấu trúc màng đáy của lớp biểu bì của da (lớp ngoài cùng), lớp màng này mang lại sức mạnh và khả năng phục hồi cho da, đồng thời tạo ra một rào cản giữa cơ thể và môi trường xung quanh. Laminin 332 là thành phần chính của các sợi gọi là sợi neo, có chức năng kết nối hai lớp màng đáy và giúp gắn kết cấu trúc da lại với nhau. Các nghiên cứu cho thấy laminin 332 có vai trò rất quan trọng trong chữa lành vết thương. Laminin 332 được cấu thành từ 3 tiểu đơn vị $\alpha 3$, $\beta 3$ và $\gamma 2$. Gen *LAMA3* (OMIM#600805) mã hoá tổng hợp tiểu đơn vị $\alpha 3$, gen *LAMB2* (OMIM#150325) mã hóa tổng hợp tiểu đơn vị $\beta 3$ và gen *LAMC2* (OMIM#150292) mã hoá tổng hợp tiểu đơn vị $\gamma 2$. Khi có đột biến xảy ra trên gen *LAMA3*, *LAMB2* hoặc *LAMC2* dẫn đến không tổng hợp các tiểu đơn vị hoặc tiểu đơn vị giảm chức năng sẽ khiến laminin 332 khiếm khuyết hoặc mất chức năng sẽ gây nên bệnh JEB (Schneider *et al.*, 2007). Trong một số trường hợp, đột biến gen *COL17A1* (OMIM#113811), mã hóa collagen loại XVII một cấu trúc trong các mô liên kết, cũng gây ra bệnh JEB (Has *et al.*, 2020).

Bệnh JEB di truyền theo cơ chế lặn trên nhiễm sắc thể thường nghĩa là người mắc hội chứng này có cả hai bản sao của một trong các gen *LAMA3*, hoặc *LAMB2*, hoặc *LAMC2* hoặc *COL17A1* trong mỗi tế bào đều có mang đột biến. Tần suất mắc bệnh là 3/1.000.000 trẻ sinh ra, thuộc nhóm bệnh di truyền đơn gen hiếm gặp (Kelly-Mancuso *et al.*, 2014). Bố mẹ của một trẻ mắc bệnh JEB thường mang một bản sao của gen đột biến, nhưng họ thường không biểu hiện các dấu hiệu và triệu chứng của hội chứng này, họ được gọi là người lành mang gen bệnh. Theo lý thuyết, mỗi cặp vợ chồng là người lành mang đột biến gen *LAMA3*, hoặc *LAMB2*, hoặc *LAMC2* hoặc *COL17A1* có 25% khả năng sinh con mắc bệnh JEB.

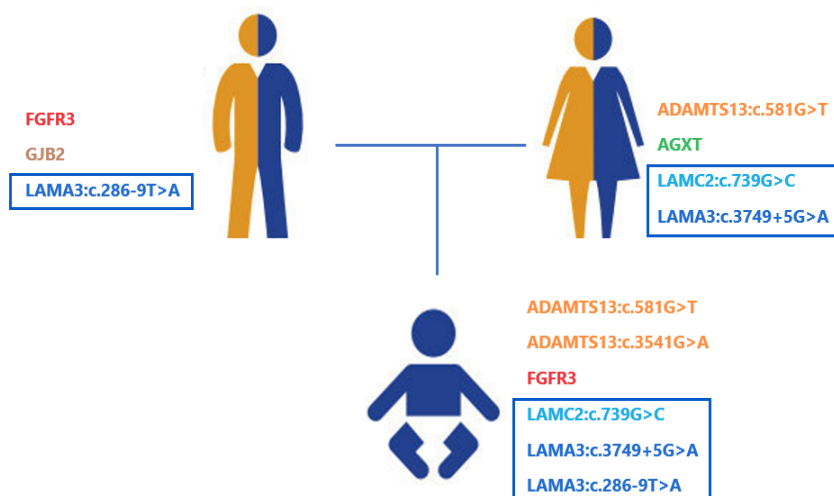
Ứng dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới (NGS Next-Generation Sequencing) kết hợp với kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) đã đưa ra một phương pháp lựa chọn phôi không mang gen bệnh đã xác định, giúp hạn chế tình trạng trẻ sinh mắc bệnh cũng như hạn chế tình trạng sảy thai hoặc chấm dứt thai kỳ giữa chừng do bệnh lý di truyền. Phương pháp này được gọi là PGT-M (preimplantation genetic testing for monogenic) sàng lọc di truyền tiền làm tổ cho bệnh đơn gen. Trong thực hành lâm sàng, xét nghiệm PGT-M thường được chỉ định cùng với xét nghiệm PGT-A (Preimplantation genetic testing for aneuploidy) sàng lọc di truyền tiền làm tổ cho bất thường nhiễm sắc thể để đánh giá toàn diện bộ nhiễm sắc thể của phôi, tăng tỷ lệ thành công cho một chu kỳ hỗ trợ sinh sản, tránh chuyển những phôi mang lệch bội số lượng hoặc cấu trúc nhiễm sắc thể.

Báo cáo này về trường hợp ứng dụng thành công kỹ thuật PGT-A kết hợp PGT-M cho gia đình có tiền sử sinh con mắc bệnh JEB.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng

Một cặp vợ chồng (sinh năm 1988 và 1983) có một con trai (sinh năm 2019) với những triệu chứng lâm sàng xuất hiện từ khi sinh bao gồm: bóng nước rải khắp toàn thân, trong móng tay, nhiều giả mạc, niêm mạc má. Chẩn đoán: Ly thượng bì bóng nước. Tiến hành xét nghiệm di truyền để tìm nguyên nhân với gói xét nghiệm G4500 của Viện Di truyền Y học. Kết quả xét nghiệm gen lần đầu phát hiện người con mang một số biến thể gồm biến thể dị hợp NM_005562.2(*LAMC2*):c.739G>C (p.Asp247His), biến thể dị hợp kép NM_139025.4 (*ADAMTS13*):c.581G>T(p.Gly194Val) và NM_139025.4(*ADAMTS13*):c.3541G>A (p.Gly1181Arg), biến thể dị hợp NM_000142.4 (*FGFR3*):c.1537G>A (p.Asp513Asn). Trong số đó chỉ có đột biến gen *LAMC2* liên quan đến bệnh JEB phù hợp triệu chứng lâm sàng nhưng biến thể c.739G>C thuộc nhóm biến thể chưa rõ chức năng và là biến thể dị hợp, chưa đủ thông tin để kết luận là nguyên nhân gây bệnh ở người con. 6 tháng sau khi sinh, người con mắc bệnh JEB mất do bội nhiễm. 1 năm sau vợ chồng khám chuyên khoa và được chỉ định thực hiện xét nghiệm G4500, kết quả người vợ phát hiện biến thể dị hợp dị hợp NM_005562.2(*LAMC2*):c.739G>C (p.Asp247His), biến thể dị hợp NM_139025.4(*ADAMTS13*):c.581G>T (p.Gly194Val), và biến thể dị hợp NM_000030.3(*AGXT*):c.32C>G (p.Pro11Arg); người chồng phát hiện các biến thể dị hợp NM_000142.5(*FGFR3*):c.1537G>A (p.Asp513Asn) và biến thể dị hợp NM_004004.6(*GJB2*):c.109G>A (p.Val37Ile); vẫn chưa xác định được gen di truyền gây bệnh JEB. Đến năm 2022, sau khi cơ sở dữ liệu gen quốc tế được cập nhật, các kết quả được tiến hành phân tích lần 2 đã phát hiện biến thể mới bao gồm: người vợ phát hiện biến thể dị hợp NM_000227.5(*LAMA3*):c.3749+5G>A (chr18: 23931206); người chồng phát hiện biến thể dị hợp NM_000227.5(*LAMA3*):c.286-9T>A (chr18: 23881927); người con mắc bệnh phát hiện biến thể dị hợp kép NM_000227.5(*LAMA3*):c.3749+5G>A và NM_000227.5 (*LAMA3*):c.286-9T>A. Tổng hợp các kết quả cho thấy biến thể gen *LAMA3* và *LAMC2* liên quan đến bệnh JEB, phù hợp triệu chứng lâm sàng, ở người con di truyền cả hai biến thể *LAMA3* của bố và mẹ tạo thành dạng dị hợp kép gây bệnh JEB, có khả năng bao gồm tương tác gen với biến thể trên gen *LAMC2* (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ di truyền gia đình có con mắc hội chứng ly thượng bì bóng nước

Phương pháp

Quy trình tư vấn di truyền và chỉ định điều trị

Cặp vợ chồng đều là người lành mang đột biến gen *LAMA3*, *LAMC2* sẽ có nguy cơ tiếp tục sinh con mắc bệnh JEB ở lần mang thai tiếp theo nên được tư vấn di truyền và chỉ định thực hiện TTTON kết hợp PGT-M để sàng lọc phôi mang tổ hợp đột biến gen *LAMA3* và đột biến gen *LAMC2* có liên quan đến JEB. Bệnh nhân được tư vấn về các bước thực hiện quy trình TTTON, hiểu và ký xác nhận đồng thuận thực hiện TTTON. Bệnh nhân được tư vấn di truyền về lợi ích, nguy cơ cũng như hạn chế khi sinh thiết phôi và giải trình tự tế bào sinh thiết để tiến hành sàng lọc phôi PGT-M kết hợp PGT-A gồm khả năng làm giảm chất lượng phôi vì sinh thiết là một kỹ thuật xâm lấn; mẫu sinh thiết phôi chỉ 5-10 tế bào lá nuôi phôi (trophectoderm) nên kết quả PGT không thể đại diện cho toàn bộ phôi vì tế bào lá nuôi phôi lớp tế bào phát triển thành nhau thai trong khi khối tế bào bên trong (inner cell mass) phát triển thành thai nhi; xét nghiệm PGT-A chỉ đánh giá được mất và thêm đoạn nhiễm sắc thể >5Mb, không phát hiện chuyển đoạn cân bằng hay đảo đoạn nhiễm sắc thể; xét nghiệm PGT-M chỉ được chỉ định khi xác định đột biến đơn gen di truyền từ bố và mẹ, trong trường hợp này là đột biến gen *LAMA3* và đột biến gen *LAMC2* không xác định được đột biến gen khác; hiện tượng Allelic Drop-out khi không khuếch đại ngẫu nhiên của một trong hai allele trong bộ gen của tế bào phôi sinh thiết có thể gây âm tính giả trong kết quả PGT-M; nguy cơ không có phôi chuyển khi các phôi đều có bất thường và bệnh nhân phải thực hiện một chu kỳ tiếp theo, nguy cơ sinh thiết lại khi mẫu sinh thiết lần đầu không đủ chất lượng để đánh giá PGT-M kết hợp PGT-A. Bệnh nhân hiểu và ký đồng thuận thực hiện sàng lọc phôi PGT-M kết hợp PGT-A.

Quy trình thực hiện TTTON kết hợp PGT-M và PGT-A

Vợ chồng được khám sức khỏe sinh sản tổng quát cho kết quả nằm trong giới hạn bình thường, được thực hiện quy trình TTTON thường quy tại IVFMD – bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức (Hồ Chí Minh) với phát đồ kích thích buồng trứng GnRH antagonist, chọc hút noãn, tiến hành tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, theo dõi thụ tinh và nuôi phôi đến ngày 5. Phôi nang ngày 5 sẽ được sinh thiết 5-10 tế bào lá nuôi phôi (trophectoderm) để thực hiện giải trình tự gen PGT-M kết hợp PGT-A. Phôi sau sinh thiết được đông lạnh phôi toàn bộ trong nitơ lỏng chờ kết quả di truyền. Tế bào phôi sinh thiết được đông lạnh -80°C và chuyển đến phòng xét nghiệm Di truyền-Công ty Hopegene. Mẫu sinh thiết được khuếch đại toàn bộ bộ gen, giải trình tự NGS (Illumina, Hoa Kỳ) để đánh giá bất thường nhiễm sắc thể và chạy các đoạn DNA mỗi đặc hiệu cho đột biến NM_000227.5(*LAMA3*):c.3749+5G>A, NM_000227.5(*LAMA3*):c.286-9T>A và NM_005562.2(*LAMC2*):c.739G>C trên NGS để tầm soát đột biến gen.

Quy trình chọn lựa phôi chuyển, theo dõi thai kỳ và xét nghiệm gen bé sinh

Bệnh nhân được tư vấn thứ tự phôi chuyển dựa vào kết quả sàng lọc phôi PGT-M kết hợp PGT-A, hiểu rõ và ra quyết định lựa chọn phôi chuyển, ký xác nhận đồng thuận chuyển phôi. Bệnh nhân được chuẩn bị nội mạc tử cung, chuyển phôi trữ, thử thai và theo dõi thai kỳ được thực hiện thường quy.

KẾT QUẢ

Kết quả TTTON và kết quả di truyền phôi

Bệnh nhân chọc hút được 19 noãn, trong đó 16 noãn trưởng thành tiến hành tiêm tinh trùng vào bào tương noãn, có 13 noãn thụ tinh và nuôi phôi đến ngày 5 được 6 phôi nang trong đó có 4 phôi đủ chất lượng để tiến hành sinh

thiết sàng lọc phôi PGT-M kết hợp PGT-A cho đột biến gen *LAMA3*, *LAMC2* và đánh giá bất thường nhiễm sắc thể, mã hóa từ E1 đến E4.

Bảng 1. Kết quả di truyền sinh thiết phôi nang

Mã phôi	Kết quả di truyền		Hình thái phôi	Thứ tự ưu tiên chuyển phôi
	Bất thường ghi nhận (PGT-A)	Bất thường ghi nhận (PGT-M)		
E1	Phát hiện bất thường nhiễm sắc thể: -8 (30%), -14 (30%), -17 (40%), +19 (30%)	Phát hiện đột biến dị hợp tử <i>LAMC2</i> (c.739G>C)	Loại 1	2
E2	Chưa phát hiện bất thường	Phát hiện đột biến dị hợp tử <i>LAMC2</i> (c.739G>C); dị hợp tử kép <i>LAMA3</i> (c.3749+5G>A và c.286-9T>A)	Loại 2	Khuyến cáo hủy phôi
E3	Chưa phát hiện bất thường	Phát hiện đột biến dị hợp tử kép <i>LAMA3</i> (c.3749+5G>A và c.286-9T>A)	Loại 2	Khuyến cáo hủy phôi
E4	Chưa phát hiện bất thường	Phát hiện đột biến dị hợp tử <i>LAMC2</i> (c.739G>C); dị hợp <i>LAMA3</i> (c.3749+5G>A)	Loại 2	1

Mục tiêu thực hiện PGT-M để loại phôi mang các tổ hợp đột biến có thể biểu hiện kiểu hình JEB nặng. Như vậy xét trên kết quả PGT-M, phôi E2 và E3 bị loại vì mang các tổ hợp đột biến được di truyền từ cả bố và mẹ, tương tự con bệnh. Phôi E1, E4 không mang tổ hợp 3 đột biến này nên có thể cân nhắc sử dụng. Về phôi E1, tuy chỉ mang đột biến c.739G>C trên gen *LAMC2* nhưng lại mang bất thường số lượng nhiễm sắc thể dạng đa khảm, gây giảm khả năng làm tổ của phôi E1. Hơn nữa, nếu khối tế bào phát triển thành thai của phôi E1 thực sự mang monosomy 14 dạng khảm, thai không sảy thì lại có nguy cơ sinh ra em bé bị dị tật và xuất hiện thể UPD. Vì vậy, phôi E1 là phôi hạn chế sử dụng. Phôi E4 là phôi chưa phát hiện bất thường về cả số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể. Xét về đột biến gen, phôi E4 mang tổ hợp đột biến đã được ghi nhận trên mẹ, mà người mẹ không biểu hiện bất cứ triệu chứng nào của JEB. Nên phôi E4 được ưu tiên chuyển.

Kết quả chuyển phôi và thai kỳ

Phôi E4 được rã đông phôi và chuyển vào tử cung bệnh nhân ngày 30/05/2022. Kết quả beta hCG ngày 12/06/2022 là 543.7 mIU/mL. Các xét nghiệm tiền sản trong suốt thai kỳ không ghi nhận bất thường. Ngày 27/02/2023, bệnh nhân mổ lấy thai lúc 39 tuần tại bệnh viện Phương Châu, bé gái cân nặng 4040 gr, chỉ số Apgar 8/9. Sức khỏe ổn định, bệnh nhân từ chối xét nghiệm gen lại cho bé do bé sinh không có triệu chứng bệnh JEB giống bé sinh trước đó.

Thời điểm khởi phát bệnh JEB thể nặng rất sớm, thường ngay khi sinh ra hoặc sau 2-3 tháng tuổi (Kiritsi *et al.*, 2013), bé bệnh trước cũng phát bệnh ngay từ khi mới sinh. Quan sát tại các mốc thời gian 3 tháng tuổi, 6 tháng tuổi, 9 tháng tuổi và 1 năm tuổi bé đều không xuất hiện triệu chứng liên quan JEB. Tính đến hiện tại, bé sanh được 15 tháng tuổi, hoàn toàn không quan sát thấy phỏng rộp, bóng nước trên da/nhiêm mạc, các chỉ số phát triển được đánh giá ổn định, bé phát triển khỏe mạnh. Như vậy, có thể khẳng định em bé sinh ra từ phôi E4 không biểu hiện bệnh JEB.

Mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh JEB phức tạp bởi sự tương tác giữa các đột biến trên các gen khác nhau. Việc xác định một đột biến trong một gen là không đủ để xác định cơ sở di truyền của JEB (Hammersen *et al.*, 2016). Đã ghi nhận trường hợp ca bệnh JEB có tương tác gen khi mang 2 đột biến dị hợp kép trên gen *COL17A1* và 1 đột biến dị hợp trên gen *LAMA3* (Floeth and Bruckner-Tuderman, 1999). Một trường hợp khác về tương tác gen trong bệnh JEB cũng được ghi nhận mang 2 đột biến gồm 1 đột biến dị hợp trên gen *LAMA3* và 1 đột biến dị hợp trên gen *LAMB3* (Riahi *et al.*, 2021). Tổ hợp các đột biến trên 2 gen làm giảm đáng kể lượng lamini 332 gây nên triệu chứng bệnh JEB. Trong trường hợp này, người con mắc bệnh JEB mang đột biến dị hợp kép trên gen *LAMA3* và đột biến dị hợp trên gen *LAMC2*. Y văn chưa ghi nhận trường hợp tương tự nhưng *LAMA3* và *LAMC2* là 2 tiểu đơn vị cấu thành nên lamini 332, đột biến trên cả 2 gen này làm thay đổi chuỗi polypeptide, thay đổi cấu trúc, độ tích điện của tiểu đơn vị cấu thành nên lamini 332, dẫn đến giảm lượng lamini 332. Tuy ở người mẹ có mang đột biến gen *LAMA3* và *LAMC2* không biểu hiện kiểu hình bệnh nhưng không loại bỏ khả năng gây bệnh khi có sự kết hợp giữa đột biến gen *LAMC2* từ mẹ và đột biến gen *LAMA3* từ bố. Do đó chỉ định PGT-M trong trường hợp này được thực hiện trên tổ hợp 3 đột biến gen *LAMA3* và gen *LAMC2*. Các trường hợp phôi không được sử dụng gồm:

- Phôi mang tổ hợp cả 3 đột biến gen *LAMA3* và gen *LAMC2* di truyền từ cả bố và mẹ, tương tự bé bệnh trước đó.
- Phôi mang tổ hợp đột biến gen *LAMA3* di truyền từ mẹ và đột biến gen *LAMA3* di truyền từ bố tạo thành dị hợp kép trên gen *LAMA3*.
- Phôi mang tổ hợp đột biến gen *LAMA3* di truyền từ bố và đột biến gen *LAMC2* di truyền từ mẹ.

Đối với riêng bệnh JEB, tính đến hiện nay chưa có báo cáo về sàng lọc phôi tiền làm tổ cho các đột biến gây bệnh liên quan, chỉ có báo cáo về sàng lọc trước sinh cho các đột biến gen *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* (Christiano *et al.*,1997; Takizawa *et al.*,1998). Có trường hợp đặc biệt khi thai phụ mang song thai lại sàng lọc trước sinh đột biến gen *LAMB3* cho thấy một trong hai thai nhi mắc bệnh JEB, tiến hành chấm dứt có chọn lọc đối với thai nhi mắc bệnh, thai nhi không mắc bệnh tiếp tục phát triển và thành công sinh một bé gái khỏe mạnh (Fassihi *et al.*,2005). Trong các trường hợp này, sàng lọc trước sinh có thể ngăn được việc sinh trẻ mắc bệnh nhưng thai phụ phải đối diện với lựa chọn chấm dứt thai kỳ khi phát hiện thai nhi mắc bệnh.

Việc ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen trong sàng lọc phôi tiền làm tổ đã giúp hạn chế sử dụng những phôi có khả năng mang đột biến gen gây bệnh di truyền từ cả bố và mẹ khi bố và mẹ là người lành mang gen bệnh, mang lại nhiều lợi ích cho bệnh nhân, giảm bớt gánh nặng về tâm lý cho bệnh nhân khi phải đối diện với lựa chọn khó khăn chấm dứt thai kỳ hay sinh con mắc bệnh. Tuy nhiên, xét nghiệm sàng lọc phôi tiền làm tổ vẫn còn khá nhiều hạn chế. Để thực hiện giải trình tự gen PGT-M, cặp vợ chồng mang gen bắt buộc phải thực hiện TTTON, kinh phí để thực hiện TTTON là khoảng chi phí đáng kể. Tuy nhiên, khi đã thực hiện TTTON phải có phôi nang ngày 5 hoặc ngày 6 đủ chất lượng vì phôi chất lượng kém không thể sinh thiết hoặc ảnh hưởng chất lượng tế bào sinh thiết gây sai lệch kết quả di truyền. PGT-M cũng chỉ phát hiện được đột biến gen di truyền từ bố và mẹ đã xác định trước, không phát hiện được các đột biến gen khác, do đó để thực hiện sàng lọc gen bệnh hiệu quả cần xác định đúng và đủ các đột biến là nguyên nhân gây bệnh, tránh tình trạng đã sàng lọc gen trên phôi tiền làm tổ vẫn sinh bé mắc bệnh do bỏ sót nguyên nhân. Do đó, việc tư vấn di truyền là thực sự quan trọng và cần thiết để giúp bệnh nhân hiểu rõ được căn bệnh của mình, tìm được nguyên nhân gây bệnh, hiểu rõ các phương án sàng lọc tiền làm tổ hoặc tiền sản về lợi ích và hạn chế để có thể có lựa chọn phù hợp.

KẾT LUẬN

Ứng dụng thụ tinh trong ống nghiệm kết hợp công nghệ giải trình tự gen để sàng lọc phôi là một công cụ hữu ích để giúp các gia đình mang bệnh di truyền đơn gen có cơ hội sinh con khỏe mạnh thông qua việc phát hiện và loại bỏ những phôi mang gen bệnh được di truyền từ bố và mẹ. Đồng thời, xuyên suốt quá trình điều trị, việc tư vấn di truyền thực sự cần cho bệnh nhân có đủ hiểu biết và có kết quả điều trị thành công.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Christiano AM, Pulkkinen L, McGrath JA, Uitto J (1997). Mutation-based prenatal diagnosis of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Prenat Diagn* 17(4):343-354
- Fassihi H, Ashton GH, Denyer J, Mellerio JE, Mason G, McGrath JA (2005). Prenatal diagnosis of Herlitz junctional epidermolysis bullosa in nonidentical twins. *Clin Exp Dermatol* 30(2):180-182.
- Floeth M, and Bruckner-Tuderman L (1999). Digenic Junctional Epidermolysis Bullosa: Mutations in *COL17A1* and *LAMB3* Genes. *American Journal of Human Genetics* 65 (6): 1530–37.
- Hammersen J, Has C, Naumann-Bartsch N, Stachel D, Kiritsi D, Söder S, Tardieu M, Metzler M, Bruckner-Tuderman L, Schneider H (2016). Genotype, Clinical Course, and Therapeutic Decision Making in 76 Infants with Severe Generalized Junctional Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 136(11):2150-2157.
- Kelly-Mancuso G, Kopelan B, Azizkhan RG, Lucky AW (2014). Junctional epidermolysis bullosa incidence and survival: 5-year experience of the Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association of America (DebRA) nurse educator, 2007 to 2011. *Pediatr Dermatol* 31(2):159-162.
- Kiritsi D, Has C, Bruckner-Tuderman L (2013). Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adh Migr* 7(1):135-41.
- Riahi K, Ghanbari Mardasi F, Talebi F, Jasemi F, Mohammadi Asl J. P (2021). Digenic Mutations in Junctional Epidermolysis Bullosa in An Iranian Family. *Cell J* 23(5):598-602.
- Schneider H, Mühle C, Pachó F (2007). Biological function of laminin-5 and pathogenic impact of its deficiency. *Eur J Cell Biol* 86(11-12):701-717.
- Takizawa Y, Shimizu H, Pulkkinen L, Hiraoka Y, McGrath JA, Suzumori K, Aiso S, Uitto J, Nishikawa T (1998). Novel mutations in the *LAMB3* gene shared by two Japanese unrelated families with Herlitz junctional epidermolysis bullosa, and their application for prenatal testing. *J Invest Dermatol* 110(2):174-8.

PREIMPLANTATION GENETIC TESTING BY NEXT GENERATION SEQUENCING FOR RARE GENETIC DISEASE-JUNCTIONAL EPIDERMOLYSIS BULLOSA

Ha TT Nguyen^{1*}, Tram B Nguyen², Anh N Ha¹

¹IVFMD, My Duc Hospital

²IVFMD Phu Nhuan, My Duc Phu Nhuan Hospital

SUMMARY

Junctional epidermolysis bullosa (JEB) is a group of rare hereditary diseases that make the skin and mucous membranes very fragile and blister easily although with minor injury or friction, such as rubbing or scratching. In JEB generalized severe, blisters are present at birth. Infants with this condition usually do not survive beyond the first year of life. JEB is inherited in an autosomal recessive manner. A couple who were both carriers of genes related to JEB have 25% affected children. Application in-vitro fertilization (IVF) combines preimplantation genetic testing for monogenic (PGT-M), the only available option for families at risk for the recurrence of the disorder without having to terminate an ongoing pregnancy. The couple had a child with JEB generalized severe: blisters spread all over the body, in the nails, in the buccal mucosa, and the child died at six months old by superinfection. The genetic results showed that the index child has double-heterozygous intron and splice-junction mutations in the *LAMA3* gene, and heterozygous missense mutation in the *LAMC2*. Both parents are healthy carriers of the variants of the *LAMA3* and *LAMC2* genes. IVF combines PGT-M and preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) was indicated to be performed on the blastocysts to eliminate embryos carrying recessive all *LAMA3* and *LAMC2* mutations. Four embryos would go through NGS-based preimplantation screening for chromosomal abnormalities. Two novel *LAMA3* mutations and one *LAMC2* mutation were used to design primers for the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the segment spanning the mutation in the family and their four embryos. Then, the PCR products were sequenced with NGS to detect the alteration in the allele. Based on the results of PGT-M, 1 in 4 embryos detected all mutant alleles, 1 in 4 embryos appeared to have double-heterozygous mutations in the *LAMA3* gene, and 2 in 4 embryos inherited at least one pathogenic allele from the father. The embryo showed no chromosomal abnormalities and did not carry variants on the *LAMA3* gene preferentially to the mother, was recommended to be transferred into the mother's uterus. As a result, the patient became pregnant and gave birth to a healthy baby. The combination of IVF and PGT-M is helpful to couples who are both carriers of JEB recessive genetic disease to have healthy children.

Keywords: Next generation sequencing, JEB, *LAMA3*, *LAMC2*, Junctional epidermolysis bullosa, PGT, *in vitro* fertility.

* Author for correspondence: Tel: 0933091130; Email: thaiha.nt@myduchospital.vn

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ BẢO VỆ PHÂN TỬ CỦA DỊCH CHIẾT TỔNG SỐ TÁCH TỪ RONG BIỂN *Ulva reticulata* THU TẠI NHA TRANG, KHÁNH HÒA, VIỆT NAM TRONG MÔ HÌNH BỆNH ALZHEIMER TRÊN DÒNG TẾ BÀO THẦN KINH C6

Nguyễn Mạnh Đạt^{1,3}, Lê Thị Thơm¹, Ngô Thị Hoài Thu^{1*}, Nguyễn Cẩm Hà¹,
Nguyễn Văn Trữ¹, Trần Mai Đức⁴, Đặng Diễm Hồng^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

⁴Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Nha Trang, Khánh Hòa

TÓM TẮT

Bệnh Alzheimer là dạng phổ biến nhất của bệnh sa sút trí tuệ gây nhiều ca tử vong và gánh nặng kinh tế cho xã hội. Cho đến nay, cơ chế cụ thể về con đường sinh bệnh của bệnh này vẫn chưa được làm sáng tỏ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng bảo vệ thần kinh của dịch chiết cồn 75% tách từ loài rong *Ulva reticulata* (UE75S) có hỗ trợ của sóng siêu âm ở mô hình bệnh Alzheimer trên dòng tế bào thần kinh C6 và các kết quả bước đầu nghiên cứu về cơ chế bảo vệ phân tử của dịch chiết này thông qua điều chỉnh biểu hiện của một số các gen tham gia vào một số con đường trao đổi chất của tế bào. Kết quả cho thấy, dịch chiết UE75S không gây độc cho tế bào ở các nồng độ thử nghiệm từ 10 đến 400 $\mu\text{g/mL}$. Trong đó, các nồng độ 100, 200, 300 và 400 $\mu\text{g/mL}$ có tác dụng bảo vệ khỏi độc tính tế bào cảm ứng bởi amyloid β -Protein Fragment25-35 ($\text{A}\beta_{25-35}$) và H_2O_2 , tỷ lệ tế bào sống sót dao động khoảng 62,5% đến 84,7% so với nhóm mô hình 62,4% (cảm ứng bằng $\text{A}\beta_{25-35}$) và 65,5% (cảm ứng bằng H_2O_2). Hơn nữa, phân tích realtime PCR cho thấy tác dụng bảo vệ thần kinh của dịch chiết UE75S là do sự điều hòa mức độ biểu hiện của các gen liên quan tới tích lũy $\text{A}\beta$ (*APP*, *BACE1* và *BACE2*), cũng như tăng cường mức độ biểu hiện của các gen sinh tổng hợp acetylcholine (*VACHT* và *CHAT*) và các gen liên quan đến các enzyme chống oxy hóa (*GPx*, *CAT* và *SOD*). Vì vậy, dịch chiết cồn 75% tách từ rong *U. reticulata* là nguồn nguyên liệu tiềm năng để nghiên cứu sâu cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ thần kinh cho con người.

Từ khóa: Alzheimer, amyloid β -Protein Fragment 25-35 ($\text{A}\beta_{25-35}$), bảo vệ thần kinh, rong biển, *Ulva reticulata*.

MỞ ĐẦU

Từ lâu, rong biển đã được sử dụng làm nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe và được phẩm tiềm năng cho con người. Việt Nam hiện có khoảng hơn 800 loài rong biển, trong đó nhiều loài có giá trị kinh tế cao thuộc các ngành rong đỏ (Rhodophyta), rong lục (Chlorophyta) và rong nâu (Ochrophyta-Phaeophyceae) (Đang *et al.*, 2019). Rong lục *Ulva reticulata* là một trong những loài rong biển kinh tế tiềm năng đã được ứng dụng rộng rãi và khai thác với sản lượng lớn. Sinh khối loài rong này rất giàu các hợp chất thứ cấp có giá trị cao như ulvan, carotenoid, polyphenols, polysaccharide, chlorophyll và melatonin. Do đó, việc nghiên cứu tách chiết và sàng lọc các chất/hợp chất có hoạt tính sinh học cao từ loài rong này đang được tập trung nghiên cứu.

Bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease-AD) là một bệnh thoái hóa thần kinh đặc trưng bởi trạng thái mất trí nhớ phát triển xảy ra ở giai đoạn giữa và cuối đời gây ra sự suy giảm và vô hiệu hóa chức năng nhận thức (Kumar *et al.*, 2024). Bệnh liên quan chặt chẽ đến một số yếu tố như tuổi tác, di truyền, chấn thương đầu, bệnh mạch máu, nhiễm trùng và các yếu tố môi trường khác. Theo World Alzheimer Report 2019, có 50 triệu người mắc bệnh sa sút trí tuệ trên toàn thế giới và đến năm 2050 ước tính con số này sẽ lên tới 115 triệu người. Tại Việt Nam, theo số liệu từ Viện Sức khỏe tâm thần Quốc gia thông báo số người mắc bệnh sa sút trí tuệ năm 2015 là 660.000 người, chiếm 52% các ca bệnh lý liên quan tới thần kinh ở người cao tuổi. Hiện nay, các loại thuốc đã được thương mại hóa trên thị trường chỉ có tác dụng làm chậm tiến triển của bệnh chứ không thể chữa khỏi bệnh, đồng thời, chúng còn đi kèm nhiều tác dụng phụ không mong muốn cho người bệnh. Do vậy, tập trung nghiên cứu các hợp chất tự nhiên có giá trị, giàu dinh dưỡng, có tác dụng bảo vệ thần kinh nhưng không hoặc ít gây ra tác dụng phụ là một hướng đi phù hợp, đặc biệt với một quốc gia biển như Việt Nam. Hiện nay, cơ chế cụ thể trong con đường sinh bệnh của AD vẫn chưa được tìm hiểu rõ. Một số giả thuyết chính mô tả cơ chế sinh bệnh gồm giả thuyết cholinergic, giả thuyết tăng cường kích thích gây ra bởi glutamate, giả thuyết β -amyloid, giả thuyết TAU, giả thuyết viêm và giả thuyết stress oxy hóa (Kumar *et al.*, 2018). Sự tích tụ $\text{A}\beta$ là một trong những nguyên

nhân chính gây AD. Chúng được sản xuất thông qua sự phân cắt của amyloid precursor protein (APP) bởi beta-site APP-cleaving enzyme 1 và 2 (BACE1 và BACE2) (Chen *et al.*, 2021b). Tế bào thường có cơ chế trung hòa gốc tự do bằng các enzyme glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) và superoxide dismutase (SOD) nhưng khi mức ROS (reaction oxygen species) mạnh hơn so với hoạt động của hệ thống enzyme chống oxy hóa thì quá trình stress oxy hóa sẽ xảy ra (Martins *et al.*, 2022). Choline acetyltransferase (ChAT) và vesicle acetylcholine transporter (VACHT) là các protein chuyên biệt chịu trách nhiệm tổng hợp, lưu trữ và giải phóng acetylcholine - một chất dẫn truyền thần kinh liên quan đến nhận thức. Thúc đẩy sự biểu hiện của các gen *ChAT* và *VACHT* là một chiến lược để bảo vệ tế bào thần kinh hiệu quả (Chen *et al.*, 2021b). Một số gen có thay đổi mức độ biểu hiện ở trong AD cũng đã được công bố (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2023; Lin *et al.*, 2008). Lưu Thị Tâm và đồng tác giả (2022) đã sàng lọc được dịch chiết cồn 75% từ loài rong biển *U. reticulata* có hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh C6 khi bị cảm ứng bằng tác nhân A β ₂₅₋₂₅ trên mô hình AD cũng như hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE), có tác dụng bảo vệ thần kinh. Vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi xin trình bày kết quả bước đầu nghiên cứu cơ chế bảo vệ phân tử của dịch chiết này trên dòng tế bào thần kinh C6.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu: Sinh khối khô rong biển *Ulva reticulata* (Forssk), 1775 được thu thập tại vùng biển Khánh Hoà, Việt Nam từ tháng 2 đến tháng 4 năm 2022 (Hình 1) do ThS. Trần Mai Đức (Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang) cung cấp và định danh tên khoa học dựa trên đặc điểm hình thái. Dịch chiết từ sinh khối *U. reticulata* bằng ethanol 75% (E75) có sử dụng siêu âm (S) theo công bố của Lưu Thị Tâm và đồng tác giả (2022) ký hiệu là UE75S được sử dụng trong nghiên cứu này.

Dòng tế bào: Dòng tế bào u thần kinh đệm chuột C6 (C6 rat glioma cell line, American Type Culture Collection – ATCC, cat. No. CCL-107). Tế bào được nuôi cấy trong tủ nuôi cấy vô trùng 37°C, 5% CO₂, trong môi trường DMEM/high glucose bổ sung thêm 10% FBS, 100 U/mL penicillin và 0,1 mg/mL streptomycin.



Hình 1. Hình thái rong *U. reticulata* (A), sinh khối rong tươi (B) và sinh khối khô (C) thu tại Hòn Chồng, Nha Trang, Khánh Hoà năm 2022

Hoá chất: Hóa chất dùng để nuôi cấy tế bào: môi trường nuôi cấy Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/high glucose, Fetal bovine serum (FBS), penicillin và streptomycin (Invitrogen, Mỹ), Trypsin-EDTA 0,25% (Gibco, Mỹ). Nghiên cứu còn sử dụng: 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Invitrogen, Mỹ), galantamine hydrobromid (Sopharma AD, Bulgaria); A β ₂₅₋₃₅ (độ tinh sạch $\geq$ 97%, No. A.4559; Sigma, Mỹ), TRIZOL™ Reagent (Invitrogen, Singapore), H₂O₂ (Sigma, Mỹ) và các hóa chất thông dụng khác.

Phương pháp

Xác định hoạt tính bảo vệ thần kinh chống lại độc tính trên dòng tế bào C6 cảm ứng bởi A β ₂₅₋₃₅: Hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại độc tính gây ra bởi A β ₂₅₋₃₅ trên dòng tế bào thần kinh C6 của các dịch chiết được tiến hành như mô tả của Lưu Thị Tâm và đồng tác giả (2022). Dịch chiết được sử dụng ở các nồng độ 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300 và 400 μ g/mL. Công thức đối chứng sử dụng là ethanol 75% (EtOH). Chất chuẩn galantamine 100 μ g/mL được sử dụng làm đối chứng dương.

Xác định hoạt tính bảo vệ thần kinh chống lại tổn thương do stress oxy hoá gây ra bởi H₂O₂ trên dòng tế bào thần kinh C6: Để đánh giá khả năng bảo vệ chống lại stress oxy hóa gây bởi H₂O₂ của mẫu thử, tế bào C6 được nuôi cấy 24 giờ trong đĩa nuôi cấy 96 giếng có chứa môi trường DMEM/high glucose ở mật độ 1×10^5 tế bào/giếng. Sau 24 giờ, tiến hành loại bỏ môi trường cũ và bổ sung 100 μ L môi trường DMEM/high glucose mới và bổ sung 1 μ L Ethanol (EtOH) hoặc 1 μ L dịch chiết của UE75S (với các nồng độ thử nghiệm từ 10 - 400 μ g/mL)/ascorbic acid (nồng độ 20 μ g/mL) và tiếp tục nuôi cấy trong 24 giờ. Sau đó, tế bào được bổ sung dung dịch H₂O₂ để đạt nồng độ cuối cùng trong môi trường là 30 μ M và tiếp tục nuôi cấy trong 1 giờ. Thí nghiệm có 3 nhóm gồm nhóm đối chứng: EtOH- H₂O₂; nhóm mô hình EtOH + H₂O₂ và nhóm thí nghiệm gồm có dịch chiết UE75S/ ascorbic acid + H₂O₂. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu quả bảo vệ tế bào thần kinh C6 được gây tổn thương bằng H₂O₂ (stress oxy hóa) được đánh giá dựa trên tỷ lệ sống sót của tế bào theo phương pháp 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) với mật độ quang (OD) được đo ở bước

sóng 570 nm. Phần trăm sống sót của tế bào C6 được tính toán theo công thức: % tế bào sống sót = $[\text{OD}_{570\text{nm}} \text{ thí nghiệm} / \text{OD}_{570\text{nm}} \text{ đối chứng}] \times 100\%$ (Lưu Thị Tâm và cộng sự, 2022).

Phương pháp xác định tăng sinh tế bào dựa trên chiều dài neurite: Xác định tăng sinh tế bào thần kinh dựa theo công bố của Agapouda và đồng tác giả (2022). Tế bào C6 ban đầu được gieo vào các đĩa nuôi tế bào 24 giếng, nuôi ở tủ nuôi cấy trong 24 giờ. Sau đó, loại bỏ môi trường cũ và bổ sung 0,5 mL môi trường DMEM +/- có bổ sung dịch chiết UE75S ở các nồng độ 50, 100, 200 và 300 $\mu\text{g/mL}$. Sau 24 giờ, tiến hành chụp ảnh các sợi neurite của tế bào thần kinh C6 bằng kính hiển vi quang học (Nikon eclipse Ti, Nhật Bản). Phân tích chiều dài sợi neurite bằng phần mềm ImageJ (Neurophology plugin).

Phương pháp Real-time polymerase chain reaction (qPCR): RNA tổng số đã được tách chiết từ các tế bào C6 sử dụng TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Singapore) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các trình tự mỗi nhân gen liên quan tới tích lũy A β (*APP*, *BACE1* và *BACE2*), các gen sinh tổng hợp acetylcholine (*VACHT* và *CHAT*) và các gen liên quan đến các enzyme chống oxy hóa (*GPx*, *CAT* và *SOD*) do công ty Cổ phần Phù Sa Genomics, Việt Nam cung cấp và được sử dụng cho phản ứng real-time PCR theo công bố của Đặng Diễm Hồng và đồng tác giả (2023). Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 20 μL bao gồm 1 μL cDNA; 2 μL Green buffer (10X); 1,5 μL dNTP (2,5mM); 0,5 μL MgCl_2 (1,5 mM); 1 μL mỗi F (10 pmol); 1 μL mỗi R (10 pmol); 0,5 μL e μL ; 12,5 μL H_2O . Chu trình nhiệt: 95°C trong 3 phút, 35 chu kỳ: 94°C - 1 phút, 45-60°C (phụ thuộc vào mỗi) - 1 phút, 72°C - 1 phút. 72°C - 10 phút, giữ sản phẩm ở 15°C cho tới khi sử dụng. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2%. Phương pháp Livak ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) (Livak and Schmittgen, 2001) được sử dụng để so sánh tương đối mức độ biểu hiện gen ở các nồng độ khác nhau. β -actin được sử dụng như là gen nội chuẩn để chuẩn hóa số liệu.

Xử lý số liệu: Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phần mềm Microsoft Excel 2016. Số liệu được biểu diễn dưới giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($X \pm \text{SD}$). Sự sai khác giữa các mẫu được đánh giá bằng phân tích ANOVA hai yếu tố ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

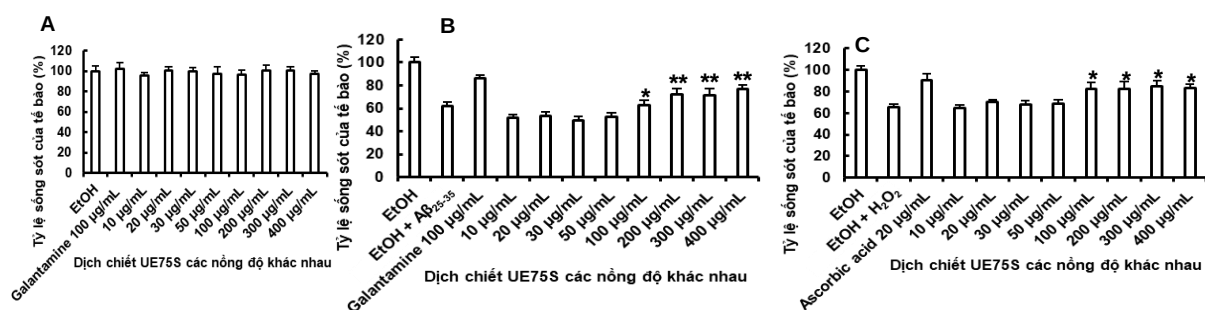
KẾT QUẢ

Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh C6 chống lại độc tính gây ra bởi A β_{25-35} và stress oxy hóa gây ra bởi H_2O_2 ở mô hình bệnh AD của dịch chiết UE75S

Kế thừa kết quả nghiên cứu của Lưu Thị Tâm và đồng tác giả (2022) đã cho thấy, dịch chiết bằng ethanol 75% kết hợp với siêu âm-UE75S tách từ rong *U. reticulata* có các đặc tính được học tốt bao gồm hoạt tính chống oxy hóa, ức chế AChE và có hoạt tính bảo vệ tế bào chống lại độc tính gây ra bởi A β_{25-35} ở nồng độ từ 50-200 $\mu\text{g/mL}$. Trong nghiên cứu này, hoạt tính bảo vệ thần kinh khỏi độc tính gây ra bởi A β_{25-35} và H_2O_2 của UE75S ở các nồng độ từ 10 đến 400 $\mu\text{g/mL}$ trên dòng tế bào C6 tiếp tục được đánh giá (Hình 2).

Sự tích tụ protein β -amyloid là một trong những dấu hiệu bệnh lý của bệnh AD. Chúng tạo thành mảng bám làm gây độc trực tiếp lên tế bào thần kinh, chúng làm tăng độ nhạy cảm của tế bào thần kinh đối với những yếu tố có hại như các gốc tự do và stress oxy hoá, cuối cùng tế bào đi vào chết theo chương trình (apoptosis) một cách nhanh chóng.

Kết quả chỉ ra ở Hình 2A cho thấy, sau 24 giờ xử lý với dịch chiết UE75S tại các nồng độ thử nghiệm từ 10 đến 400 $\mu\text{g/mL}$ đều không gây độc cho tế bào C6. Tỷ lệ sống sót của tế bào C6 được xử lý bằng UE75S ở các nồng độ thử nghiệm dao động từ 95,41 đến 100,81%. Không có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm về tỷ lệ sống của tế bào C6 ($p > 0,05$). Kết quả chỉ ra ở Hình 2B cho thấy, khi các tế bào C6 sau 2 giờ cảm ứng bởi A β_{25-35} đã làm giảm tỷ lệ sống sót của tế bào xuống 62,40% so với công thức đối chứng (các tế bào không được xử lý A β_{25-35} xem như có tỷ lệ sống sót 100%). Khi có mặt dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau đã có ảnh hưởng tích cực tới tỷ lệ sống sót của tế bào C6. Trong đó, các nồng độ 100, 200, 300 và 400 $\mu\text{g/mL}$ có khả năng bảo vệ tế bào C6 khi cảm ứng bằng A β_{25-35} với phần trăm tế bào sống sót lần lượt là 62,50; 71,94; 71,70; 76,65% (cao hơn 62,40% ở nhóm mô hình). Galantamine 100 $\mu\text{g/mL}$ được sử dụng như chất đối chứng dương trong mô hình gây bệnh Alzheimer có khả năng bảo vệ tế bào khỏi độc tính do A β_{25-35} gây ra với tỷ lệ sống sót của tế bào là 86,22%. Kết quả chỉ ra ở Hình 2C cho thấy, tế bào C6 sau 1 giờ xử lý bằng 30 μM H_2O_2 đã làm giảm đáng kể tỷ lệ sống sót của tế bào xuống còn 65,50% (so với 100% của công thức đối chứng - không có H_2O_2). Các nồng độ 100, 200, 300 và 400 $\mu\text{g/mL}$ có tác dụng bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa gây ra bởi H_2O_2 với tỷ lệ sống sót của tế bào lần lượt là 82,12%; 82,45%; 84,70% và 83,07% (sai số có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$). Ascorbic acid - 20 $\mu\text{g/mL}$ được sử dụng như chất đối chứng dương trong mô hình gây bệnh Alzheimer có khả năng bảo vệ tế bào khỏi độc tính do H_2O_2 gây ra với tỷ lệ sống sót của tế bào là 90,87%. Có thể thấy, hoạt tính bảo vệ thần kinh của dịch chiết UE75S phụ thuộc vào nồng độ. Tiếp theo, chúng tôi sẽ sử dụng các nồng độ 100, 200 và 300 $\mu\text{g/mL}$ để tiếp tục thử nghiệm hoạt tính tăng sinh tế bào thần kinh C6 thông qua chiều dài sợi neurite.

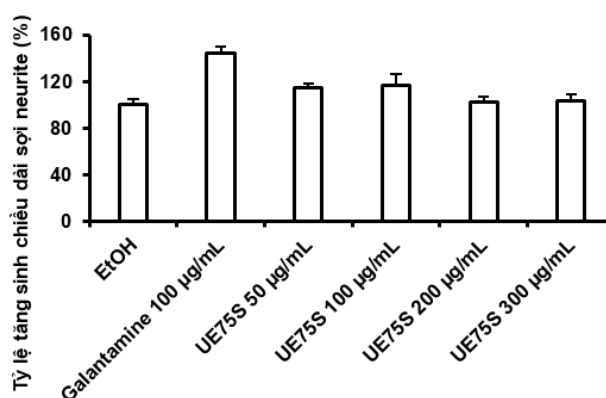


Hình 2. Độc tính tế bào (A), hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh C6 ở mô hình AD cảm ứng bằng Aβ₂₅₋₃₅ (B) và H₂O₂ (C) của dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau

Ghi chú: Ethanol (EtOH) được sử dụng làm nhóm đối chứng. Đối chứng dương là galantamine 100 µg/mL và ascorbic acid 20 µg/mL; Nhóm mô hình: Ethanol + Aβ₂₅₋₃₅ (đối với thí nghiệm độc tính gây ra bởi Aβ₂₅₋₃₅) và Ethanol + H₂O₂ (đối với thí nghiệm stress oxy hóa gây ra bởi H₂O₂). Dấu “*” chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học giữa các công thức thí nghiệm và nhóm mô hình ($p < 0,05$). Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình ± SD ($n = 3$).

Kết quả tăng sinh tế bào thần kinh C6 của dịch chiết UE75S thông qua chiều dài sợi neurite

Sự tăng sinh của các sợi neurite rất quan trọng đối với sự thiết lập cấu trúc chức năng của tế bào thần kinh. Các tế bào thần kinh liên kết với nhau bằng sợi neurite giúp tăng cường trao đổi tín hiệu dẫn truyền thần kinh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định sự tăng sinh sợi neurite của tế bào thần kinh C6 với việc có và không có mặt của dịch chiết UE75S ở nồng độ khác nhau (Hình 3) đã cho thấy, sau 24 giờ xử lý bằng dịch chiết UE75S, tế bào C6 có dấu hiệu tăng sinh sợi neurite tốt. So với công thức đối chứng (tỷ lệ tăng sinh là 100%) thì tế bào được xử lý bằng dịch chiết UE75S ở các nồng độ 50, 100, 200 và 300 µg/mL có tỷ lệ tăng sinh chiều dài sợi neurite tăng đến 114,75; 117,00, 102,19 và 103,37%, tương ứng. Chất chuẩn galantamine giúp tế bào tăng sinh sợi neurite mạnh lên tới 144,8% so với đối chứng. Theo Agapouda và đồng tác giả (2022) công bố, dịch chiết cò từ *Rhodiola rosea* có khả năng tăng sinh tế bào thần kinh tốt ở nồng độ 5 và 10 ng/mL, làm tăng số lượng tế bào thần kinh lần lượt là 90,1% và 64,3%; tăng lần lượt 104% và 61,8% về tổng chiều dài sợi neurite. Do vậy, dịch chiết UE75S các nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL đã được lựa chọn cho các nghiên cứu về mức độ biểu hiện của một số gen tham gia ở các con đường trao đổi chất ở các tế bào thần kinh C6. Hình ảnh minh họa sự tăng sinh của sợi neurite trên dòng tế bào C6 được xử lý bằng ethanol, galantamine và dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau được trình bày ở Hình 4.

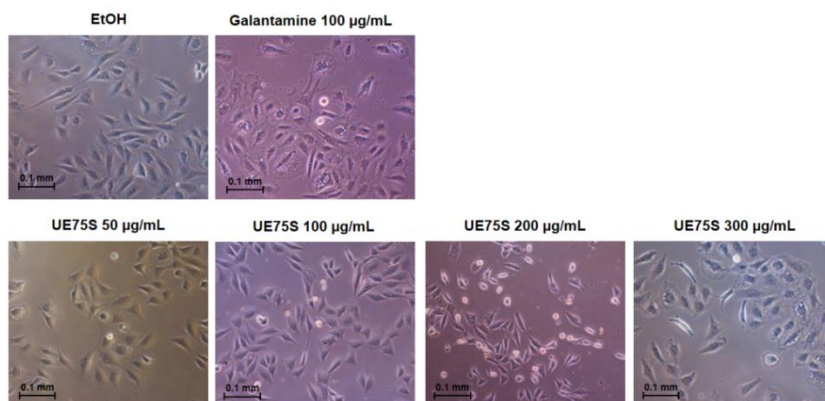


Hình 3. Tỷ lệ tăng sinh chiều dài sợi neurite trên dòng tế bào C6 được xử lý bằng dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau

Ghi chú: EtOH được sử dụng làm nhóm đối chứng. Đối chứng dương là galantamine 100 µg/mL. Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình ± SD ($n = 3$).

Kết quả tác dụng bảo vệ thần kinh của dịch chiết UE75S thông qua điều chỉnh biểu hiện của một số các gen tham gia vào một số con đường trao đổi chất ở dòng tế bào thần kinh C6

Mức độ biểu hiện mRNA của các enzyme ở dòng tế bào thần kinh C6 có sự thay đổi ở mô hình AD được cảm ứng bằng Aβ₂₅₋₃₅ khi có mặt và không có mặt dịch chiết UE75S ở các nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL (Hình 5). Kết quả Hình 5 cho thấy, việc xử lý bằng Aβ₂₅₋₃₅ đã ức chế mức độ biểu hiện mRNA của các enzyme tham gia và con đường trao đổi chất so với mẫu đối chứng và mức độ ức chế nêu trên đã phần nào được cải thiện khi tế bào C6 được xử lý bằng UE75S và galantamine.

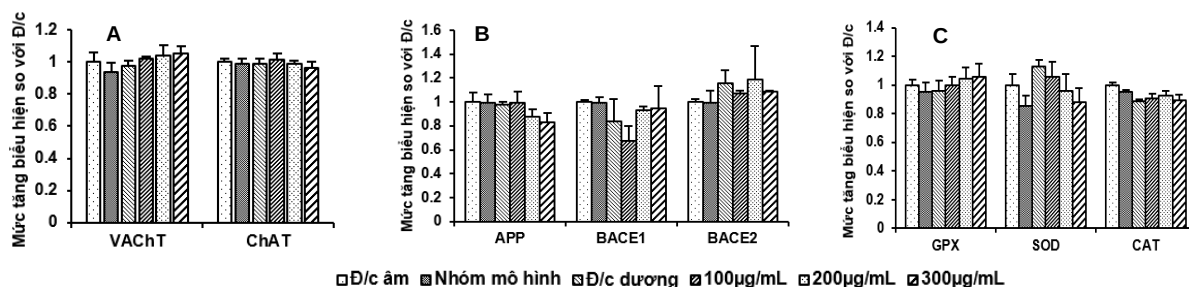


Hình 4. Hình ảnh minh họa sự tăng sinh sợi neurite trên dòng tế bào C6 được xử lý bằng dịch chiết UE75S ở các nồng độ khác nhau

Ghi chú: EtOH được sử dụng làm nhóm đối chứng. Đối chứng dương là galantamine 100 µg/mL.

Đối với các gen liên quan tới sinh tổng hợp acetylcholine, *ChAT* chịu trách nhiệm trong quá trình sinh tổng hợp Ach từ acetyl CoA và choline trong tế bào chất, còn *VAcHT* liên quan đến sự hấp thụ chất dẫn truyền thần kinh vào túi tiếp hợp (Ferreira-Vieira *et al.*, 2016). Kết quả Hình 5A cho thấy, khi cảm ứng bằng của A β ₂₅₋₃₅ mức độ biểu hiện của gen *VAcHT* và *ChAT* đã bị giảm xuống lần lượt là 6,21 và 0,92 % so với nhóm đối chứng âm. Khi có mặt dịch chiết UE75S các nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL đã giúp tăng mức độ biểu hiện mRNA của *VAcHT* lên lần lượt 8,67; 10,99 và 12,18% so với nhóm mô hình và tốt hơn so với chất chuẩn galatamine nồng độ 100 µg/mL (tăng 4,16% so với nhóm mô hình). Đối với gen *ChAT*, chỉ có nồng độ 100 µg/mL có tác dụng tăng mức độ biểu hiện mRNA hơn 2,32% so với nhóm mô hình. Dịch chiết UE75S các nồng độ 200 và 300 µg/mL và galatamine không làm thay đổi mức độ biểu hiện gen *ChAT*. Việc thúc đẩy biểu hiện của *VAcHT* và *ChAT* có thể cải thiện lượng acetylcholine giúp bảo vệ hoạt tính thần kinh liên quan đến AD. Kết quả này phù hợp với công bố của Chen và đồng tác giả (2021a) về bảo vệ thần kinh qua con đường sinh tổng hợp acetylcholine.

Việc biểu hiện quá mức của các gen *APP*, *BACE1* và *BACE2* có thể dẫn đến việc tích tụ A β - được tạo ra bởi quá trình phân cắt protein của APP (Chen *et al.*, 2021b). Lin và đồng tác giả (2008) đã công bố rằng chất curcumin đã làm giảm mức độ biểu hiện mRNA của các gen *APP*, *BACE1* trên dòng tế bào PC-12. Trong nghiên cứu này, dịch chiết UE75S đã giảm mức độ biểu hiện mRNA của *APP*, *BACE1* so với nhóm mô hình xử lý bằng A β ₂₅₋₃₅ (Hình 5B). Cụ thể, dịch chiết UE75S ở các nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL đã làm giảm mức độ biểu hiện mRNA của gen *APP* (lần lượt là 0,3; 11,43 và 16,74% so với nhóm mô hình) và gen *BACE1* (lần lượt là 31,65; 5,8 và 4,14% so với nhóm mô hình). Như vậy, các kết quả thu được của chúng tôi cũng tương tự với công bố nêu trên.



Hình 5. Ảnh hưởng của dịch chiết UE75S lên biểu hiện của một số gen liên quan đến sinh tổng hợp AChE (A) cơ chế sinh bệnh AD (B) và các enzyme chống oxy hóa (C)

Ghi chú: Đối chứng âm (Ethanol), nhóm mô hình (Ethanol + A β ₂₅₋₃₅); đối chứng dương (Galantamine 100 µg/mL + A β ₂₅₋₃₅).

Số liệu được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n = 3). VAcHT: Vesicle acetylcholine transporter; ChAT: Choline acetyltransferase; APP: Amyloid precursor protein; BACE1: Beta-site APP-cleaving enzyme 1; BACE2: Beta-site APP-cleaving enzyme 2; GPx: Glutathione peroxidase; SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase.

Các tế bào sản xuất ROS quá mức gây ra rối loạn chức năng ty thể và dẫn đến stress oxy hóa. SOD, CAT và GPx là các enzyme chống oxy hóa quan trọng của tế bào, chúng hoạt động như chất chống oxy hóa nội sinh chống lại các gốc tự do dư thừa đã được tạo ra trong tế bào và loại bỏ chúng bằng cách xúc tác trực tiếp quá trình phân hủy H₂O₂ thành O₂ (García-Pérez *et al.*, 2021). Việc giảm mức độ biểu hiện của các enzyme này có thể dẫn đến stress oxy hóa. Kết quả chỉ ra ở Hình 5C đã cho thấy, sự biểu hiện của các gen GPx và SOD đã được tăng lên đáng kể ở tế bào được xử lý bằng UE75S sau khi cảm ứng bằng A β ₂₅₋₃₅ và giảm biểu hiện đối với gen CAT. Ở cả 3 nồng độ 100, 200 và 300 µg/mL, mức độ biểu hiện mRNA đã tăng lần lượt là 4,88; 10,04 và

11,16% (đối với gen *GPx*); 23,73; 112,01 và 3,01% (đối với gen *SOD*), tương ứng. Việc tăng mức độ biểu hiện mRNA của các gen mã hóa các enzyme chống oxy hóa này giúp tế bào cân bằng ROS từ đó có tác dụng bảo vệ được tế bào. Đặng Diễm Hồng và đồng tác giả (2023) đã công bố, fucoxanthin tách chiết từ rong mơ *Sargassum oligocystum* giúp làm tăng đáng kể hoạt động của enzyme CAT và GPx trên dòng tế bào thần kinh C6. Như vậy, có thể thấy dịch chiết UE75S giúp điều hòa biểu hiện gen của các gen bệnh sinh AD (*APP*, *BACE1* và *BACE2*), cũng như thúc đẩy gen sinh tổng hợp ACh (*VACHT*, *CHAT*), các gen liên quan đến các enzyme chống oxy hóa (*GPx*, *CAT* và *SOD*).

Các nghiên cứu trước đây đã cũng đã chứng minh khả năng bảo vệ thần kinh theo các con đường khác nhau trên mô hình bệnh Alzheimer của các loài rong biển như *Ecklonia cave*, *Sargassum oligocystum* (Đặng Diễm Hồng *et al.*, 2023; Nho *et al.*, 2020). Như vậy, dịch chiết UE75S có tác dụng bảo vệ thần kinh thông qua các con đường khác nhau bằng cách điều chỉnh tăng hoặc giảm biểu hiện mRNA của các gen tham gia để giúp điều hòa được tế bào khỏi những tác động bất thường trong AD. Tiếp theo việc đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của dịch chiết UES75S trên mô hình động vật thực nghiệm *in vivo* cho định hướng sử dụng dịch chiết này làm nguyên liệu thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho con người có tác dụng bảo vệ thần kinh sẽ được tiến hành.

KẾT LUẬN

Dịch chiết cồn 75% được tách từ rong *Ulva reticulatum* (UE75S) có hỗ trợ của siêu âm, có tác dụng bảo vệ thần kinh khỏi các tác nhân gây độc tế bào như $A\beta_{25-35}$ và H_2O_2 . Nghiên cứu cơ chế phân tử bước đầu cho thấy dịch chiết UE75S giúp điều hòa biểu hiện quá mức ở một số gen liên quan tới tích lũy $A\beta$ (*APP*, *BACE1* và *BACE2*), cũng như tăng cường biểu hiện của các gen sinh tổng hợp acetylcholine (*VACHT* và *CHAT*) và các gen liên quan đến các enzyme chống oxy hóa (*GPx*, *CAT* và *SOD*). Dịch chiết cồn 75% từ rong *U. reticulata* có hỗ trợ của siêu âm là nguyên liệu tiềm năng cho sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng bảo vệ thần kinh cho con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2019. Attitudes to dementia. (2019): Alzheimer's Disease International, London. p. 9-160.
- Agapouda A, Grimm A, Lejri I, Eckert A (2022). Rhodiola Rosea Extract Counteracts Stress in an Adaptogenic Response Curve Manner via Elimination of ROS and Induction of Neurite Outgrowth. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (1):5647599.
- Martins B, Vieira M, Delerue-Matos C, Grosso C, Soares C (2022). Biological potential, gastrointestinal digestion, absorption, and bioavailability of algae-derived compounds with neuroprotective activity: A comprehensive review. *Mar Drugs*, 20(6):362.
- Nho JA, Shin YS, Jeong HR, Cho S, Heo HJ, Kim GH, Kim DO (2020). Neuroprotective effects of phlorotannin-rich extract from brown seaweed *Ecklonia cava* on neuronal PC-12 and SH-SY5Y cells with oxidative stress. *J Microbiol Biotechnol* 30(3):359-367.
- Chen MH, Wang TJ, Chen LJ, Jiang MY, Wang YJ, Tseng GF, Chen JR (2021a). The effects of astaxanthin treatment on a rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, 172:151-63.
- Chen X, Drew J, Berney W, Lei W (2021b). Neuroprotective natural products for Alzheimer's disease. *Cells*, 10(6):1309.
- Dang DH, Anh HTL, Thom LT, Ha NC, Tien DD, Duy DA (2019). The Genus Gracilaria in Vietnam. *Institute of Ocean & Earth Sciences Series*.17: 29–46.
- Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropsychopharmacol*, 14, 101–115.
- García-Pérez E, Ryu D, Lee C, Lee HJ (2021). Ochratoxin A induces oxidative stress in HepG2 Cells by impairing the gene expression of antioxidant enzymes. *Toxins*, 13(4):271.
- Hong DD, Thom LT, Ha NC, Thu NTH, Hien HTM, Tam LT, Dat NM, Duc TM, Tru NV, Hang NT, Ambati RR (2023). Isolation of Fucoxanthin from *Sargassum oligocystum* Montagne, 1845 Seaweed in Vietnam and Its Neuroprotective Activity. *Biomedicines*, 11(8):2310.
- Kumar A, Sidhu J, Lui F, Tsao JW, Doerr C. Alzheimer Disease (Nursing). (2024). *Treasure Island (FL): StatPearls*.
- Kumar K, Kumar A, Keegan RM, Deshmukh RR (2018). Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, 9: 297-307.
- Lin R, Chen X, Li W, Han Y, Liu P, Pi R (2008). Exposure to metal ions regulates mRNA levels of APP and BACE1 in PC12 cells: Blockage by curcumin. *Neurosci Lett*, 440(3): 344–347.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25 (4): 402-408
- Lưu Thị Tâm, Hoàng Thị Minh Hiền, Ngô Thị Hoài Thu, Nguyễn Cẩm Hà, Trần Mai Đức, Nguyễn Mạnh Đạt, Nguyễn Thành Vinh, Trịnh Thị Hiền, Trịnh Đình Khả, Nguyễn Văn Trữ, Đặng Diễm Hồng (2022). Tác dụng bảo vệ thần kinh chống lại bệnh alzheimer của dịch chiết tổng số tách từ hai loài rong biển *Kappaphycus alvarezii* và *Ulva reticulata* thu tại Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam trên mô hình *in vitro*. *Tuyển tập báo cáo toàn văn tại Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2022* : 331-337.

INITIAL RESEARCH THE MOLECULAR MECHANISM OF TOTAL EXTRACT FROM *Ulva reticulata* COLLECTED IN NHA TRANG, KHANH HOA, VIETNAM IN THE ALZHEIMER'S DISEASE MODEL ON THE C6 NEURONAL CELL LINE

Nguyen Manh Dat^{1,3}, Le Thi Thom¹, Ngo Thi Hoai Thu^{1*}, Nguyen Cam Ha¹,
Nguyen Van Tru¹, Tran Mai Đức⁴, Dang Diem Hong^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

³*University of Science and Technology of Hanoi*

⁴*Nha Trang Institute of Technology Research and Application, Nha Trang, Khanh Hoa*

SUMMARY

Alzheimer's disease is the most common form of dementia, leading to many deaths and a significant economic burden on society. The specific mechanisms in the pathogenesis of this disease have yet to be well understood. This study evaluated the neuroprotective effects of a 75% ethanol total extract (assisted by ultrasound waves) from the seaweed *Ulva reticulata* (UE75S) in an Alzheimer's disease model using the C6 neuronal cell line. The initially investigated molecular protection mechanisms of this extract's neuroprotective effects through gene expression in cellular metabolism were carried out. The results showed that the UE75S extract was nontoxic to cells at tested concentrations ranging from 10 to 400 µg/mL. At concentrations of 100, 200, 300, and 400 µg/mL, the extract exhibited neuroprotective effects against toxicity induced by Aβ₂₅₋₃₅ and H₂O₂, with the percentage of viable cell ranging from approximately 62.5% to 84.7% compared to the model groups at 62.4% (induced by Aβ₂₅₋₃₅) and 65.5% (induced by H₂O₂). Furthermore, real-time PCR analysis indicated that the neuroprotective effects of the UE75S extract were due to the regulation of gene expression involved in AD pathogenesis (*APP*, *BACE1*, and *BACE2*), ACh synthesis (*VACHT*), and antioxidant enzymes (*GPx*, *CAT* and *SOD*). Thus, the 75% ethanol extract (assisted by ultrasound waves) from *U. reticulata* is a potential resource for human protective health food with neuroprotection bioactivity.

Keywords: Alzheimer, amyloid β-Protein Fragment 25-35 (Aβ₂₅₋₃₅), neuroprotection, seaweed, *Ulva reticulata*.

*Corresponding author: Tel: 02437911059; ddhong60vn@yahoo.com; nhthu@ibt.ac.vn

NGHIÊN CỨU ĐỊNH DANH *Staphylococcus epidermidis* VÀ *Staphylococcus saprophyticus* TRÊN DA NGƯỜI KHỎE MẠNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH VẬT HỌC VÀ KỸ THUẬT PCR

Võ Đại Học², Dương Thị Ngọc Mai², Trần Đình Bình¹

¹Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

²Học viên lớp Cao học Y sinh học 2022-2024, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả cắt ngang qua nuôi cấy phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* trên da người khỏe mạnh bằng phương pháp truyền thống và kỹ thuật PCR đa môi tại Khoa Vi sinh, Bệnh viện Đại học Y-Dược Huế, so sánh giá trị của 2 kỹ thuật. Đã định danh 128 chủng *S. epidermidis* và 74 chủng *S. saprophyticus* dựa vào các đặc điểm sinh vật học. Kết quả định danh bằng PCR thì xác định được *S. epidermidis* 52/128 chủng chiếm 40,6% và *S. saprophyticus* là 18/74 chủng chiếm tỷ lệ 24,3%. Phương pháp PCR cho kết quả nhanh chóng, đáng tin cậy để phát hiện *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*. Tuy nhiên, định danh hiện *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng các tính chất sinh vật hoá học không đòi hỏi yêu cầu cao về trang thiết bị, không yêu cầu khắt khe về mặt kỹ thuật, có thể cho kết quả khá nhanh (có thể từ 36-48 giờ), cũng có thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán vi sinh vật ở ngay tuyến huyện. Định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng các tính chất sinh vật hoá học cho kết quả đại thể nhóm vi khuẩn, còn phương pháp PCR định danh đặc hiệu chủng vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*.

Từ khóa: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, PCR, phân lập và định danh.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Các tác nhân của tụ cầu coagulase âm tính (CoNS) là mầm bệnh của nhiều bệnh nhiễm trùng khác nhau hiện nay có thể là kết quả của việc sử dụng ngày càng nhiều các thủ tục xâm lấn như ống thông nội mạch trong can thiệp mạch, ghép cơ quan... đặc biệt là trên nhóm những bệnh nhân đang điều trị tích cực, bệnh nhân suy giảm miễn dịch, trẻ sinh non, bệnh nhân mắc bệnh ung bướu và bệnh nhân cấy ghép (Cunha *et al.*, 2004). Một ví dụ về những tác nhân này trong nghiên cứu 98 bệnh nhân được điều trị thở máy trên 48 giờ tại khu hậu phẫu A - Bệnh viện Trung ương Huế từ tháng 3/2010 đến tháng 3/2011 trong đó CoNS có 2 bệnh nhân chiếm 2,04% (Nguyễn Viết Quang, 2013).

Trên thế giới, các nghiên cứu về tụ cầu coagulase âm tính cũng tìm cách chẩn đoán vi sinh vật chính xác, nhanh để đánh giá sự phân bố và khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn này trong các mẫu máu và mẫu nước tiểu từ các bệnh nhân đang điều trị tại các bệnh viện. Tụ cầu coagulase âm tính được xếp thành 5 nhóm, trong đó có 2 nhóm lớn là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bao gồm nhiều vi khuẩn khác nhau về một số tính chất sinh vật học. Tụ cầu khuẩn coagulase âm tính là những vi khuẩn phổ biến được phân lập từ mũi và nách, đầu, chân và tay. *Staphylococcus aureus* và *S. epidermidis* là những loài staphylococci phổ biến (Becker *et al.*, 2014).

Tuy nhiên, việc xác định chính xác các loài CoNS là một thách thức, do chúng có tính đa dạng và giống nhau về hình thái và cấu trúc (Lê Văn Phụng, 2009). Cho đến nay, việc định danh các CoNS có thể được thực hiện với nhiều kỹ thuật như: định danh bằng các thử nghiệm sinh vật hóa học; định danh bằng hệ thống tự động Vitek2, định danh với thang API (De Paulis Adriana *et al.*, 2003); định danh bằng hệ thống định danh khối phổ MALDI-TOF MS (Rupp, Fey, 2015); định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử gồm PCR, realtime PCR và giải trình tự gen 16S rRNA... (Shintaro *et al.*, 2011). Tuy nhiên, các nghiên cứu về định danh sinh vật học và sinh học phân tử một số loài vi khuẩn tụ cầu coagulase âm tính gây nhiễm khuẩn bệnh viện trên da người khỏe mạnh tại Việt Nam chưa có nhiều (Lê Văn Phụng, 2009). Việc định danh các loài tụ cầu dựa vào tính chất sinh vật học thường có các tính chất trùng lặp giữa các loài tụ cầu, định danh bằng phương pháp sinh vật học mất nhiều thời gian, sai số lớn. Chúng tôi tiến hành đề tài: "Nghiên cứu định danh *Staphylococcus epidermidis* và *Staphylococcus saprophyticus* trên da người khỏe mạnh bằng phương pháp sinh vật học và kỹ thuật PCR" với mục tiêu phân lập và định danh *Staphylococcus epidermidis* và *Staphylococcus saprophyticus* dựa vào các đặc điểm sinh vật học và kỹ thuật PCR để so sánh giá trị của 2 kỹ thuật trong việc chẩn đoán 2 loài vi khuẩn này.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng

Các chủng vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* được phân lập trên da người khỏe mạnh tại Bộ môn Vi Sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế trong thời gian từ tháng 4/2023 đến tháng 4/2024.

Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả cắt ngang qua các xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn thường quy bằng phương pháp truyền thống và kỹ thuật PCR đa mồi tại bộ môn Vi Sinh, trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế.

Các nội dung nghiên cứu

- Thu thập các chủng vi khuẩn CoNS đã được phân lập trên da người bằng phương pháp thường quy tại Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế.

- Định danh bằng các tính chất sinh vật học bằng phương pháp truyền thống là nhuộm Gram, thử nghiệm lên men mannitol, thử nghiệm catalase dương tính, thử nghiệm coagulase trên phiến kính và trong ống nghiệm đều âm tính và kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch với đĩa kháng sinh novobiocin được thực hiện tại phòng thí nghiệm ở Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế.

- Định danh bằng kỹ thuật PCR đa mồi trên các chủng vi khuẩn đã được định danh là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng phương pháp truyền thống.

- Thu thập, thống kê và phân tích các số liệu đã phân lập, xác định tỷ lệ dương tính *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* cả hai kỹ thuật và so sánh giữa hai phương pháp định danh sinh vật hóa học và PCR đa mồi.

Định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng kỹ thuật PCR đa mồi.

Các cặp mồi dùng trong nghiên cứu: Sử dụng các cặp mồi theo nghiên cứu của Shintaro và đồng tác giả (2011).

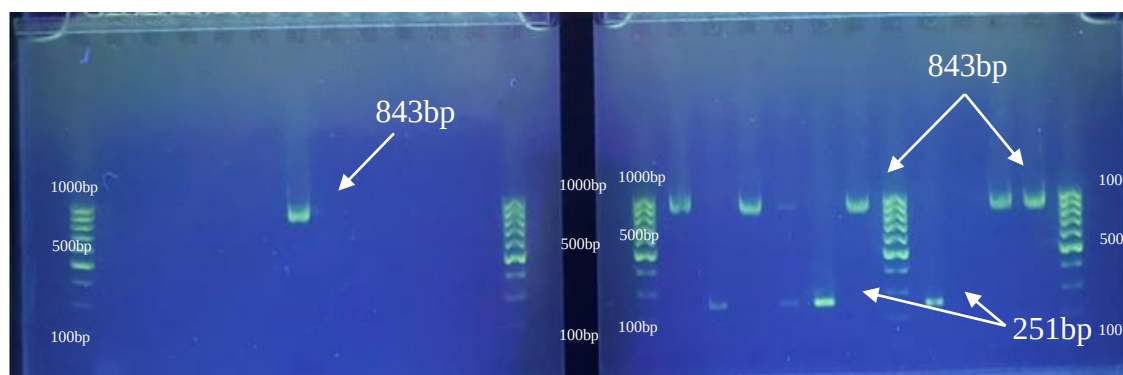
Bảng 1. Mồi PCR được sử dụng trong nghiên cứu này

TT	Vi khuẩn	Gen đích	Mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)	T°C
1.	<i>S. epidermidis</i>	epi	F	TTGTAAACCATTCTGGACCG	251	58
			R	ATGCGTGAGATACTTCTTCG		
2.	<i>S. saprophyticus</i>	sap	F	TTTTGGATGCGATAGATTGG	843	58
			R	TCTTCAGACTTTTCAAAGGC		

Thực hiện phản ứng PCR multiplex

Mastermix 12,5 μ L (10 mmol Tris-HCL (pH 8,3), 200 μ M cho mỗi loại dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,625 unit Taq DNA polymerase. Mồi (epi F 10pmol: 0,25 μ L, epi R 10 pmol: 0,25 μ L, sap F 10 pmol: 0,25 μ L, sap R 10 pmol: 0,25 μ L). Mẫu DNA: 5 μ L; Nước cất vô trùng PCR vừa đủ thể tích 25 μ L (Gribaldo *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2018).

Chu trình luân nhiệt như sau: 1 chu kỳ biến tính (95°C/5 phút); 30 chu kỳ tổng hợp DNA (95°C/30 giây; 56°C/30 giây; 72°C/40 giây) và bước tổng hợp cuối cùng 72°C/2 phút (Martineau *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2018).



Hình 1. Hình ảnh kết quả điện di phát hiện sản phẩm PCR

Lane 1: *S. epidermidis* 251 bp, Lane 2: *S. saprophyticus* 843 bp.

Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý các số liệu thu thập được bằng phương pháp thống kê y học. Các thông số thống kê, tính toán trong nghiên cứu các thông số được trình bày dưới dạng số lượng và tỷ lệ phần trăm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các chủng vi khuẩn phân lập được trên da người khỏe mạnh

Theo bảng 2 cho thấy các cầu khuẩn gram dương phân lập được đều là các Staphylococci, trong đó chiếm tỷ lệ cao nhất là *S. epidermidis* (51,4%), tiếp đó là *S. saprophyticus* (28,7%), các CoNS khác (14,5%) và *S. aureus* (4,4%). Như vậy, *S. epidermidis* chiếm tỷ lệ lớn trong các loại vi khuẩn phân lập được.

Bảng 2. Các loại cầu khuẩn Gram dương phân lập được

TT	Vi khuẩn	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Coagulase (+)	11	4,4
2	<i>S. epidermidis</i>	128	51,4
3	<i>S. saprophyticus</i>	74	29,7
4	CoNS khác	36	14,5
Tổng cộng		249	100,0

Theo bảng 3 cho thấy các staphylococci được định danh bằng phương pháp truyền thống dựa vào nhuộm Gram, tính chất catalase dương tính, làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin. Các tính chất về nhuộm Gram, catalase, coagulase đều phù hợp ở tỷ lệ 100,0% số chủng Staphylococci định danh, còn các tính chất khác dùng để phân loại *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* và các CoNS khác nên tỷ lệ khá khác biệt. CoNS khác có tính chất lên men mannitol như *S. saprophyticus* nhưng lại nhạy cảm novobiocin. Như vậy dựa vào loạt tính chất làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin chúng ta cơ thể phân loại 4 nhóm Staphylococci là *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* và các CoNS khác. Trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ tập trung phân tích riêng các tính chất này cho các *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*.

Bảng 3. Tổng hợp tính chất sinh vật hóa học của các Staphylococci

Vi khuẩn		<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Coagulase (+)	Các CoNS khác
Cầu khuẩn Gram (+)	n	128	74	11	36
	%	100	100	100	100
Catalase	n	128	74	11	36
	%	100	100	100	100
Lên men mannitol	n	128	74	11	36
	(+)	0	60	5	35
	%	0	81,1	45	97
	(-)	128	14	6	1
	%	100	18,9	55	3
	n	128	74	11	36
Tan máu	(+)	24	18	8	12
	%	18,7	24	72,7	33
	(-)	104	56	3	24
	%	81,3	76	27,3	67
	n	128	74	11	36
Coagulase	(+)	0	0	11	0
	%	0	0	100	0
	(-)	128	74	0	36
	%	100	100	0	100
	n	128	74	11	36

	n	128	74	11	36
	(+)	0	74	2	0
Novobiocin	%	0	100	18,2	0
	(-)	128	0	9	36
	%	100	0	81,8	100

Trong nghiên cứu của chúng tôi theo kết quả trên bảng 2, giống vi khuẩn *S. epidermidis* chiếm tỷ lệ cao nhất trong các loại vi khuẩn được phân lập trên da người khỏe mạnh (128/262 chủng vi khuẩn) với tỷ lệ 48,9% và giống vi khuẩn *S. saprophyticus* (74/262 chủng vi khuẩn) chiếm tỷ lệ 28,2%. Trong khi đó, vi khuẩn *S. coagulase* dương tính (*S. aureus*) chỉ chiếm 4,2% (11/262 chủng vi khuẩn). Kết quả này phù hợp với rất nhiều nghiên cứu ở Việt Nam cũng như trên thế giới khi ghi nhận vị trí quan trọng của *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* (Jarlov *et al.*, 1994). Các vi khuẩn thường trú ở da thì *S. epidermidis* là loài thường gặp nhất 90% trong các loại vi khuẩn hiếu khí, ước tính có khoảng 10^3 đến 10^4 vi khuẩn/ cm^2 da (Nguyễn Thanh Bảo, 2014)).

Theo nghiên cứu của Trần Thanh Loan và đồng tác giả (2016), khi nghiên cứu 80 chủng của các staphylococci được định danh và xác định độc lực bằng phương pháp truyền thống dựa vào tiêu bản nhuộm Gram, tính chất Catalase dương tính, làm đông huyết tương, lên men đường mannitol, tính chất tan máu trên môi trường thạch máu và khuẩn lạc có sắc tố màu vàng. Dựa vào các tính chất này, chúng ta đã có thể định danh khá chính xác *S. aureus* và các staphylococci coagulase âm tính. Thời gian để định danh hết 40-48 giờ. Nghiên cứu này có kết quả và định hướng khá tương đồng về phân lập tính chất vi sinh vật cũng như thời gian phân lập của chúng tôi.

Theo nghiên cứu của Kloos, Schleifer (1975), tụ cầu khuẩn thường chiếm hơn 50% trong số vi khuẩn được phân lập từ đầu, mũi và nách và từ 10 đến 70% trong số vi khuẩn được phân lập từ chân và tay. Chúng ta cũng đã biết vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *S. epidermidis* là những loài staphylococci phổ biến và cư trú khá bền vững nên thường được phân lập từ mũi, trong khi *S. epidermidis* và *S. hominis* là những loài staphylococci phổ biến được phân lập từ da vùng nách, da đầu, da chân và da tay. Vi khuẩn *S. capitis* thường được phân lập từ da đầu và da tay, còn *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* và một loài không xác định thường được phân lập từ cả da đầu, da chân và da tay. Như vậy các nghiên cứu phân lập staphylococci trên da người khỏe mạnh có sự xuất hiện các chủng tương đồng với các chủng trong nghiên cứu của chúng tôi.

Theo nghiên cứu Phan Thị Lua và đồng tác giả (2023) khi khảo sát vi khuẩn trên bàn tay nhân viên y tế đã phân lập được *S. aureus* trên 17/39 bàn tay nhân viên y tế, chiếm 43,6%, các loài CoNS cũng chiếm tỷ lệ cao (83 chủng/37 bàn tay), tỷ lệ bàn tay xuất hiện vi khuẩn *S. epidermidis* là 53,8%. Nghiên cứu này có kết quả với nghiên cứu chúng tôi là loài *S. epidermidis* chiếm tỷ lệ cao nhất. Kết quả nghiên cứu của Sadiya và đồng tác giả (2019) tại bệnh viện Kano, Nigeria, 54 mẫu ở tai có 46 mẫu *S. aureus* (85%) và 08 mẫu CoNS (15%).

Các tác giả Kloos, Musselwhite (1975) khi nghiên cứu xác định, định danh bằng sinh vật học với 939 chủng tụ cầu trong nghiên cứu được phân lập từ da khỏe mạnh của hai nhóm người. Chúng bao gồm 778 chủng được phân lập từ 20 người sống ở Raleigh, NC, và 161 chủng được phân lập từ 20 người sống ở Somerville và New Brunswick, NJ. Tất cả bảy chủng trên được xác định là thuộc loài *S. aureus*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. wareri*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, hoặc *S. capitis*. Nghiên cứu này và nghiên cứu chúng tôi cho thấy các loài trên da người khỏe mạnh có các loài *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, còn các loài khác thì chúng tôi không đưa vào phân lập và định danh.

Theo trình bày ở bảng 4, các chủng staphylococci được định danh bằng phương pháp truyền thống dựa vào nhuộm Gram, tính chất catalase dương tính, làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin. Các tính chất về nhuộm Gram, catalase, coagulase đều phù hợp ở tỷ lệ 100,0% số chủng staphylococci định danh, còn các tính chất khác dùng để phân loại *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* và các CoNS khác nên tỷ lệ khá khác biệt. CoNS khác có tính chất lên men mannitol như *S. saprophyticus* nhưng lại nhạy cảm novobiocin. Như vậy dựa vào loạt tính chất làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin chúng ta có thể phân loại 4 nhóm Staphylococci là *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* và các CoNS khác.

Đối chiếu với nghiên cứu của các tác giả khác như ghi nhận ở bảng dưới đây, chúng tôi nhận thấy có thể dựa vào các tính chất sinh vật học để định danh *S. aureus*, *S. epidermidis* species group và *S. saprophyticus* species group gồm nhuộm Gram, tính chất catalase dương tính, làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin.

Bảng 4. Tính sinh vật hóa học của một số staphylococci (Sadiya *et al.*, 2019)

Giống vi khuẩn	Nhuộm gram	Catalase	Coagulase	Tan máu	Lên men mannitol	Novobiocin
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	-	-	-	+
<i>S. saprophyticus</i>	+	+	-	-	-	-

Theo nghiên cứu De Paulis và cộng sự (2003) năm thử nghiệm để xác định loài *Staphylococci* âm tính với Coagulase trong lâm sàng, 201 chủng trong đó 101 chủng *S. epidermidis* (50,5%) chiếm tỷ lệ cao nhất, xếp thứ 3 là 32 chủng *S. saprophyticus* (16,0%). Theo Leven và đồng tác giả (1995), phương pháp nhanh chóng và tiết kiệm để xác định loài *Staphylococci* âm tính với Coagulase có ý nghĩa lâm sàng, định danh bằng phương pháp truyền thống 444 mẫu trong đó 304 chủng *S. epidermidis* (69,1%) với tỷ lệ cao nhất và 1 chủng *S. saprophyticus* (0,2%). Việc dựa vào một số tính chất sinh vật hoá học như trên để định danh sinh vật học các CoNS thật sự có ý nghĩa lâm sàng vì việc định loài chỉ cần ở mức độ như vậy là đã có giá trị. Vì vậy ở mức độ không đòi hỏi yêu cầu cao về trang thiết bị, không yêu cầu khắt khe về mặt kỹ thuật, có thể cho kết quả khá nhanh (có thể từ 36-48 giờ), như vậy có thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán vi sinh vật ở ngay tuyến huyện.

Định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng phương pháp PCR

Theo bảng 5 thì tỷ lệ phân lập bằng kỹ thuật PCR vi khuẩn *S. epidermidis* 52 chủng trong 128 chủng chiếm tỷ lệ 40,6% và vi khuẩn *S. saprophyticus* là 18 chủng trong 74 chủng chiếm tỷ lệ 24,3% các chủng vi khuẩn này được phân lập và định danh bằng phương pháp sinh vật hóa học.

Bảng 5. Kết quả phân lập bằng phương pháp PCR

TT	Vi khuẩn	Dương tính		Âm tính		Tổng
		n	%	n	%	
1	<i>S. epidermidis</i>	52	40,6	76	59,4	128
2	<i>S. saprophyticus</i>	18	24,3	56	75,7	74
Tổng cộng		70	34,7	132	65,3	202

Trong nghiên cứu của chúng tôi, theo kết quả trình bày trên bảng 4 thì tỷ lệ định danh bằng kỹ thuật PCR với các vi khuẩn *S. epidermidis* là 52 chủng chiếm 40,6% (52/128) các chủng phân lập được định danh bằng phương pháp sinh vật hóa học và với vi khuẩn *S. saprophyticus* là 18 chủng chiếm tỷ lệ 24,3% (18/74) các chủng phân lập được định danh bằng phương pháp sinh vật hóa học. Kết quả này cũng giống như kết quả nghiên cứu John và đồng tác giả (1978), phân lập sinh vật học (coagulase và Dnase) trên 2426 chủng tụ cầu phân lập được 1142 chủng CoNS và được xác định bằng phương pháp PCR đa môi kết quả 68,4% là *S. epidermidis*, 1,3% là *S. saprophyticus* trong khi 30,3% là không thể phân loại. Tuy nhiên cũng có sự khác biệt so với nghiên cứu của chúng tôi khi chỉ có 40,6% số chủng *S. epidermidis*, còn *S. saprophyticus* trong nghiên cứu chỉ là 24,3% trong khi nghiên cứu John Jr và cộng sự có tỷ lệ là 1,3% các chủng *S. saprophyticus*, điều này được họ lý giải là nếu chỉ dựa vào coagulase và Dnase chưa đầy đủ tính chất để xác định loài *S. saprophyticus* (John *et al.*, 1978). Rõ ràng ở đây có sự khác biệt khá lớn giữa định danh bằng sinh vật hóa học và định danh bằng kỹ thuật PCR. Liên quan đến vấn đề này, chúng ta có thể giải thích như sau:

Trong phân loại các nhóm CoNS, các tụ cầu coagulase âm tính được xếp thành 5 nhóm, trong đó có 2 nhóm lớn là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bao gồm nhiều vi khuẩn giống nhau và khác nhau về một số tính chất sinh vật học. Trong nhóm *S. epidermidis species* có 10 thành viên, trong đó có những thành viên thường gặp như *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*; những thành viên không phổ biến như *S. haemolyticus* hay *S. hominis*; một số thành viên hiếm/không xác định như *S. capitis*, *S. caprae*... Trong nhóm *S. saprophyticus species* có 11 thành viên, trong đó có những thành viên thường gặp như *S. saprophyticus*; còn lại là những thành viên hiếm gặp như *S. succinus* (Becker *et al.*, 2014)... Các thành viên trong các nhóm lớn này có thể giống nhau về tính chất sinh vật hoá học như không có coagulase, lên men hay không lên men mannit, đề kháng hay nhạy cảm với novobiocin, tan máu hay không tan máu trên môi trường thạch máu... Tuy nhiên, từng thành viên chắc chắn sẽ có một số khác biệt, vì vậy chúng ta mới có một số chủng không hoặc có tan máu, lên men hay không lên men mannitol... Do đó, khi lựa chọn môi để khuếch đại xác định *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* thì các cặp môi này chỉ đặc hiệu cho chủng vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* cho nên sẽ có một tỷ lệ nhất định các chủng là thành viên khác trong nhóm chứ không phải là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*. Trong nghiên cứu này, trong số 128 chủng cầu khuẩn *S. epidermidis* định danh bằng sinh vật hoá học, tỷ lệ xác định bằng kỹ thuật PCR cầu khuẩn *S. epidermidis* là 52 chủng chiếm 40,6% và cầu khuẩn *S. saprophyticus* là 18 chủng chiếm tỷ lệ 24,3%; còn lại các chủng khác có thể nằm trong nhóm lớn *S. epidermidis species* và *S. saprophyticus species* nhưng là các thành viên khác nên không thể xác định bằng PCR đặc hiệu cho *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*.

Việc lựa chọn cặp môi để định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* là rất đặc hiệu. Ví dụ, nhóm tác giả Shintaro và đồng tác giả (2011) đã sử dụng loạt cặp môi cho từng giống CoNS cụ thể, nên có lẽ mức độ xác định sẽ đầy đủ và chính xác hơn. Đó là các cặp môi hom-F TACAGGGCCATTTAAAGACG; hom-R GTTCTGGTGTATCAACACC 177bp cho *S. hominis*; epi-F TTGTAAACCATTCTGGACCG, epi-R ATGCGTGAGATACTTCTTCG 251bp cho *S. epidermidis*; aur-F TCGCTTGCTATGATTGTGG, aur-R GCCAATGTTCTACCATAGC 359bp cho *S. aureus*; hae-F TAGTGGTAGGCGTATTAGCC, hae-R ACGATATTTGCCATTCGGTG 434bp cho *S. haemolyticus*; cap-F ACTACGCCTATGATTATTGC, cap-R

GAYGCTTCTTTACCATAGGG 525bp cho *S. capitis*; lug-F TCCAATGATGGTAACGAGGC lug-R TTTTGCGCCTCGTTTGTGC 695bp cho *S. lugdunensis*; sap-F TTTTGGATGCGATAGATTGG, sap-R TTTTCAGACTTTTCAAAGGC 843bp cho *S. saprophyticus*; war-F CGTTTGTAGCAAAACAGGGC, war-R GCAACGAGTAGAACCTTGCCAC 999bp cho *S. warneri*; rae-F TTGTTCTWGCACYATTGCG, rae-R TTTTATAGAACAGGGTCGAC 1,227bp cho *S. caprae*. Chúng tôi chỉ định danh sinh vật học cho 2 nhóm lớn *S. epidermidis* species và *S. saprophyticus* species và định danh PCR cho 2 giống là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* nên nhiều thành viên trong nhóm lớn sẽ không xác định được bằng kết quả PCR.

Như vậy, việc chúng tôi lựa chọn cặp mồi như trên chỉ định danh được *S. epidermidis* trong khi nhóm *S. epidermidis* species có 10 thành viên, thì những thành viên như *S. lugdunensis*; *S. haemolyticus* hay *S. hominis*; *S. capitis*, *S. caprae*... sẽ không định danh được với cặp mồi của chúng tôi lựa chọn. Tương tự trong nhóm *S. saprophyticus* species có 11 thành viên, trong đó có những thành viên thường gặp như *S. saprophyticus*; còn lại là những thành viên hiếm gặp như *S. succinus* thì cũng không định danh được với cặp mồi ở trên.

Xét về ý nghĩa lâm sàng và định danh bằng kỹ thuật PCR thì việc định danh bằng các tính chất sinh vật hoá học có ý nghĩa khi không yêu cầu cao về trang thiết bị, không yêu cầu khắc khe về mặt kỹ thuật, có thể cho kết quả khá nhanh (có thể từ 36-48 giờ), như vậy có thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán vi sinh vật ở ngay tuyến huyện. Tuy nhiên, về mặt nghiên cứu và đánh giá dịch tễ học phân tử thì việc định danh bằng PCR cũng rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng ta tính đến mức độ tương đồng của 2 kỹ thuật chẩn đoán vi khuẩn và cần nhắc đến ý nghĩa lâm sàng và mục đích của nghiên cứu sâu về vi khuẩn học. Thật sự kỹ thuật Multiplex-PCR mà chúng tôi thực hiện với việc lựa chọn 2 cặp mồi để định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* là một phương pháp nhanh chóng và chính xác để xác định loài tụ cầu khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* khi phòng xét nghiệm có trang bị các phương tiện chẩn đoán phân tử.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* trên da người khỏe mạnh bằng phương pháp sinh vật học và kỹ thuật PCR tại Bệnh viện Trường Đại học Y-Dược Huế đã phân lập và định danh 128 chủng *S. epidermidis* và 74 chủng *S. saprophyticus* dựa vào các đặc điểm sinh vật học. Kết quả định danh bằng PCR thì xác định được *S. epidermidis* 52/128 chủng chiếm 40,6% và *S. saprophyticus* là 18/74 chủng chiếm tỷ lệ 24,3%. Phương pháp PCR cho kết quả nhanh chóng, đáng tin cậy để phát hiện *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*. Tuy nhiên, định danh hiện *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng các tính chất sinh vật hoá học không đòi hỏi yêu cầu cao về trang thiết bị, không yêu cầu khắc khe về mặt kỹ thuật, có thể cho kết quả khá nhanh (có thể từ 36-48 giờ), cũng có thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán vi sinh vật ở ngay tuyến huyện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Becker K, Heilmann C, Peters G (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27(4): 870-926.
- Cunha MdLR, Sinzato YK, Silveira LV (2004) Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-negative *Staphylococci*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 99(8): 855-860.
- De Paulis Adriana N, Predari Silvia C, Chazarreta Carlos D, Santoianni Jorge E (2003) Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol* 41(3): 1219-1224.
- Gribaldo S, Cookson B, Saunders N, Marples R, Stanley J (1997) Rapid identification by specific PCR of coagulase-negative *Staphylococcal* species important in hospital infection. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland* 46: 45-53.
- Jarlov JO, Nissen B, Rosdahl VT, Espersen F (1994) Identification of coagulase-negative staphylococci and typing of *Staphylococcus epidermidis* by a 4 h micromethod. *APMIS* 102(1-6): 272-278.
- John JF, Gramling PK, O'Dell NM (1978) Species identification of coagulase-negative staphylococci from urinary tract isolates. *J Clin Microbiol* 8(4): 435-437.
- Kim J, Hong J, Lim JA, Heu S, Roh E (2018) Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative *staphylococci*. *Arch Microbiol* 200(1): 73-83.
- Kloos WE, Schleifer KH (1975) Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1(1): 82-88.
- Kloos WE, Musselwhite MS (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied Microbiology* 30(3): 381-395.
- Lê Văn Phụng (2009) Tụ cầu, Vi sinh Y học. Nhà xuất bản Y học: 45-62.
- Leven M, Verhoeven J, Pattyn SR, Goossens H (1995) Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 33: (5) 1060-1063.
- Martineau F, Picard FJ, Ménard C, Roy PH, MarcOuellette, Bergeron aG (2000) Development of a rapid PCR assay specific for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *J Clin Microbiol* 38(9): 3280-3284.
- Nguyễn Thanh Bảo (2014) Tụ cầu, Vi khuẩn Y học. Nhà xuất bản Y học.
- Nguyễn Viết Quang (2013) Tỷ lệ vi khuẩn kháng thuốc ở bệnh nhân viêm phổi do thở máy tại phòng hồi sức sau mổ ở bệnh viện trung ương Huế. *Y học thực hành* 12: 36-39.
- Phan Thị Lua, Hoàng Thị An Hà, Cao Trường Sinh (2023) Khảo sát hệ vi khuẩn bàn tay của nhân viên y tế bệnh viện trường Đại học Y Khoa Vinh năm 2021. *Tạp chí Y học Việt Nam* 524(1A): 261-264.

Rupp ME, Fey PD (2015) 197 - *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococci*. Mandell, Douglas, and Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, Bennett JE, Dolin R & Blaser MJ, editors.: 2272-2282.e2275. W.B. Saunders, Philadelphia.

Sadiya M, Ibrahim, Ismail A, Sani M, Yahaya, Muhammad A (2019) *Isolation and characterization of staphylococcus species from clinical samples obtained from some hospitals in Kano Metropolis, Nigeria*. *ARC Journal of Urology* 4(3): 1-6.

Shintaro H, Takashi S, Kyoko K-A, Keiichi H (2011) Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 49(10): 3627-3631.

Trần Thanh Loan, Trương Đình An Sơn, Trần Đình Bình (2016) Nghiên cứu chẩn đoán nhanh *Staphylococci* và tính đề kháng Methicillin của chúng bằng kỹ thuật PCR đa mồi. *Kỷ yếu hội nghị KHCN tuổi trẻ các trường đại học, cao đẳng Y-Dược Việt Nam lần thứ XVIII-2016*: 512-551.

STUDY ON IDENTIFICATION OF STAPHYLOCCOCUS EPIDERMIDIS AND STAPHYLOCCOCUS SAPROPHYTICUS ON HEALTHY HUMAN SKIN USING BIOLOGICAL METHODS AND PCR TECHNIQUE

Vo Dai Hoc², Duong Thi Ngoc Mai², Tran Dinh Binh^{1*}

¹Department of Microbiology, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

²Students of Master's Degree in Biomedicine, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

SUMMARY

The study was conducted according to a cross-sectional descriptive method through culturing, isolating and identifying bacterial strains *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* on healthy human skin using traditional methods and multiplex PCR techniques at the Department of Microbiology, student at Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital, comparing the value of two techniques. Identified 128 strains of *S. epidermidis* and 74 strains of *S. saprophyticus* based on biological characteristics. The results of identification by PCR identified 52/128 strains of *S. epidermidis*, accounting for 40.6%, and 18/74 strains of *S. saprophyticus*, accounting for 24.3%. The PCR method provides quick, reliable results for detecting *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*. However, the current identification of *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* by biological and chemical properties does not require high equipment requirements, does not require strict techniques, and can give results quite quickly. (can be from 36-48 hours), can also meet the need for microbiological diagnosis at the district level. Identification of *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* by biological and chemical properties gives results for the general group of bacteria, while the PCR method specifically identifies the bacterial strains *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*.

Keywords: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, PCR, isolation and identification.

* Author for correspondence: Tel: 0913363930; Email: tdbinh@huemed-univ.edu.vn

PHÂN TÍCH PHẢ HỆ VÀ KHOẢNG CÁCH DI TRUYỀN SÁN LÁ PHỔI *PARAGONIMUS* CỦA VIỆT NAM SỬ DỤNG DỮ LIỆU TOÀN BỘ HỆ GEN TY THỂ

Nguyễn Thị Khuê^{1,2}, Đỗ Thị Roan^{1,2}, Phạm Thị Khánh Linh¹,
Đoàn Thị Thanh Hương^{1,2}, Phạm Ngọc Doanh³, Lê Thanh Hòa^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

TÓM TẮT

Bằng công nghệ Sanger và thế hệ mới (NGS), hệ gen ty thể (mtDNA) của loài sán lá phổi *Paragonimus heterotremus* của Việt Nam (chủng D2YB) và *P. westermani* (chủng QT2) đã được thu nhận, có độ dài là 16.268 bp/D2YB và 14.779 bp/QT2. Có 12 gen mã hóa protein (protein-coding genes, PCGs); 2 gen RNA ribosome ty thể (mitoribosomal genes, MRGs); 22 gen RNA vận chuyển (transfer RNA, tRNAs); và một vùng không mã hóa (non-coding region, NCR), chứa nhiều cấu trúc lặp dài (LRU) và lặp ngắn (SRU). Phân tích phả hệ dựa trên chuỗi amino acid cộng hợp của toàn bộ 12 gen mã hóa protein của 32 chủng/loài bao gồm họ Paragonimidae (15 chuỗi), họ Heterophyidae (4 chuỗi), họ Opisthorchiidae (12 chuỗi) và một chuỗi họ Schistomatidae (làm nhóm ngoại hợp) cho thấy có hai phân nhóm trong nhóm họ Paragonimidae: nhóm chỉ có các chủng của loài *P. westermani* và nhóm của tất cả các chủng của các loài *Paragonimus* khác của thế giới. Tính toán khoảng cách di truyền (KCDT) cho thấy giá trị KCDT ngoại loài cao nhất là giữa loài đồng danh *P. ohirai*/*P. iloktsuenensis* với *P. westermani* nhóm Ấn Độ (19,93-21,23%) và thấp nhất là giữa *P. heterotremus* với *P. skrjabini miyazakii*, chỉ là 12,20-12,47%. Đặc biệt, KCDT nội loài của phân nhóm *P. westermani* Nam Á của các chủng Ấn Độ với các chủng của phân nhóm *P. westermani* Đông Á (Việt Nam, Trung Quốc và Hàn Quốc) rất cao (12,1-12,7%), tương đương với giá trị KCDT ngoại loài giữa *P. heterotremus* với *P. skrjabini miyazakii*. Đặc điểm di truyền, cấu trúc của mtDNA và KCDT của sán lá phổi *Paragonimus*, cho phép sử dụng làm đích khai thác cho nghiên cứu di truyền quần thể, phả hệ, nguồn gốc, tiến hóa, đồng thời dữ liệu gen học sử dụng cho phát triển chẩn đoán, định hướng nghiên cứu thâm định loài/giống/họ ký sinh trùng động vật lây sang người.

Từ khóa: Hệ gen ty thể (mtDNA), họ Paragonimidae, khoảng cách di truyền, phả hệ, sán lá phổi *Paragonimus*.

MỞ ĐẦU

Bệnh sán lá phổi (paragonimiasis) do các loài thuộc chi *Paragonimus*, họ Paragonimidae, phân bộ Troglostremata (Platyhelminthes: Trematoda) gây ra là một trong những bệnh nguy hiểm ở nhiều quốc gia tại châu Á, châu Phi và châu Mỹ, trong đó có Việt Nam (Yoshida *et al.*, 2019; Blair *et al.*, 2022). Hai loài sán lá phổi phổ biến nhất có thể kể đến là *P. heterotremus* và *P. westermani* chủ yếu ở châu Á cùng với *P. ohirai*, *P. skrjabini miyazaki*, *P. skrjabini*, *P. iloktsuenensis*, ngoài ra còn có *P. africanus*, *P. kellicotti* và *P. mexicanus* ở châu Phi và châu Mỹ. Trên 50 loài sán lá phổi được phân chia vào các phức hệ theo nhóm *P. westermani*, nhóm *P. heterotremus*, nhóm *P. s. miyazaki*, nhóm *P. ohirai* ... Nhóm *P. heterotremus*, phân bố ở Nam Trung Quốc, Ấn Độ, Bangladesh, Sri Lanka, Thái Lan, Lào và Tây-Bắc Việt Nam và *P. westermani* có nhiều biến chủng khác nhau ở Đông-Nam Siberi (Nga), Ấn Độ, Sri Lanka, Nepal, Pakistan, Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc, Đài Loan, Philippines, Cambodia, Lào và Việt Nam (Le *et al.*, 2006; Doanh *et al.*, 2013; Blair, 2022). Bệnh sán lá phổi thường xảy ra chủ yếu ở cộng đồng dân tộc thiểu số vùng cao, vùng núi xa xôi, trẻ em tiểu học và trung học do có thói quen ăn cua/giáp xác nhiễm ấu trùng sán lá phổi gây bệnh chưa được nấu/nướng chín (Doanh *et al.*, 2013; Blair, 2022). Ở Việt Nam, loài *P. heterotremus* được phát hiện đầu tiên năm 1993 ở Sìn Hồ, Lai Châu và tiếp theo nhiều địa danh khác ở Yên Bái, Sơn La, Tuyên Quang, Hòa Bình và được nghiên cứu khá chi tiết về dịch tễ học và sinh học phân tử (Kino *et al.*, 1995; Le *et al.*, 2006; Doanh *et al.*, 2013). Loài *P. westermani* mới được ghi nhận gần đây trên vật chủ trung gian là cua suối ở Quảng Trị, chưa phát hiện trên người (Doanh *et al.*, 2009; 2013).

Phân loại và nghiên cứu phả hệ, tiến hóa và di truyền quần thể, ngoài phân tích đặc điểm hình thái học, đòi hỏi cần có những chỉ thị phân tử và đặc điểm gen/hệ gen của loài sinh vật, trong đó có ký sinh trùng. Hệ gen ty thể (mtDNA) là nguồn cung cấp chỉ thị phân tử tối ưu nhất và được sử dụng trong hơn 40 năm qua (Chan *et al.*, 2021). Ở sán lá, đó là vòng DNA khép kín, khoảng 13,5-23 kb, chứa 12 gen mã hóa protein gồm *cox1-3*, *nad1-6*,

nad4L, *atp6* và *cob*; 2 gen RNA ribosome ty thể gồm *rrnL* (large ribosomal rRNA hay 16S) và *rrnS* (small rRNA hay 12S); 22 gen RNA vận chuyển; và một vùng không mã hóa dài ngắn khác nhau tùy loài và thường có cấu trúc lặp khá phức tạp. Đối với loài/chủng mới phát hiện hay mới ghi nhận, chỉ thị mtDNA càng được ứng dụng rộng rãi. Chính vì vậy, đã có hàng chục ngàn mtDNA của các loài sinh vật, trong đó có hàng chục mtDNA của sán lá đã được giải trình tự thành công và được ứng dụng hiệu quả trong nghiên cứu bệnh động vật lây sang người (Wey-Fabrizius *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2021).

Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu ứng dụng chỉ thị phân tử từ hệ gen ty thể hoàn chỉnh của một số loài sán lá phổi của Việt Nam, trong đó có *Paragonimus heterotremus*, mẫu Việt Nam (chủng LC ở Lai Châu và D2YB ở Yên Bái) và *P. westermani* (chủng QT2, Quảng Trị) trong nghiên cứu phả hệ và vị trí phân loại của các chủng/loài này trong họ Paragonimidae (phân bộ Trogloremata) và các họ Heterophyidae và Opisthorchiidae (phân bộ Opisthorchiata), cũng như khoảng cách di truyền của 15 chủng/loài *Paragonimus* trong họ Paragonimidae.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu mẫu sán và tách chiết DNA tổng số

Mẫu *Paragonimus heterotremus* là sán lá phổi trưởng thành (thu ở Yên Bái, Việt Nam), ký hiệu Phet-D2YB-VN và mẫu *P. westermani* (thu ở Quảng Trị), ký hiệu Pwes-QT2-VN. Tất cả các thao tác đều sử dụng các bộ kit của hãng Thermo Fisher Scientific Inc. (MA, USA) và DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được bảo quản ở -20°C. Khuôn DNA tổng số được sử dụng 2 µL ở nồng độ 50 ng/µL cho mỗi phản ứng PCR và LPCR. Các chuỗi nucleotide được thu nhận từ sản phẩm LPCR bằng công nghệ giải trình tự thế hệ mới NGS (hệ thống PACBIO SEQUEL system)

Thiết kế môi và thực hiện PCR

Một số cặp môi cơ bản (môi chung) được thiết kế dựa vào so sánh trình tự của các gen chọn lọc lấy từ các mtDNA có trong Ngân hàng gen (Le *et al.*, 2022). LPCR được thực hiện sử dụng bộ sinh phẩm Phusion High-Fidelity PCR Kit với chu trình nhiệt gồm các bước 94°C/5 phút trong 1 chu kỳ; tiếp theo là 35 chu kỳ ở 94°C/1 phút, 52°C/30 giây và 72°C/1-4 phút; chu kỳ cuối kéo dài 10 phút ở 72°C và đối với LPCR, thực hiện chu kỳ cuối ở 72°C/6-12 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit và giải trình tự trực tiếp (hoặc tách dòng) hoặc NGS.

Giải trình tự bằng phương pháp Sanger và thế hệ mới (NGS)

Chủng Pwes-QT2-VN được giải trình tự bằng phương pháp Sanger; sản phẩm PCR hoặc DNA plasmid tái tổ hợp được gửi giải trình tự tại cơ sở dịch vụ nước ngoài (Macrogen, Hàn Quốc). Trình tự nucleotide từ giải trình tự được xử lý bằng chương trình Chromas 2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) để thu nhận chuỗi cuối cùng.

Chủng Phet-D2YB-VN bằng NGS sử dụng hệ thống PACBIO SEQUEL có tại Viện Công nghệ sinh học như đã thực hiện với loài *P. skrjabini miyazaki* (Le *et al.*, 2022). Các sản phẩm LPCR (khoảng 4-8 kb/mỗi sản phẩm) bao phủ hết toàn bộ vòng mtDNA được kiểm tra, tinh sạch bằng bộ sinh phẩm GeneJET PCR Purification Kit. Các sản phẩm tinh sạch được gom vào cùng một ống và tiếp tục được tinh sạch lại bằng AMPure XP beads. Thư viện giải trình tự thế hệ mới được chuẩn bị bằng Express Template Prep Kit 2.0 và được đưa vào hệ thống giải trình tự đoạn dài (long-read sequencing). Tín hiệu giải trình tự được xử lý, đánh giá và chuyển đổi thành chuỗi thô, sau đó sắp xếp căn chỉnh thành các lớp chuỗi nucleotide (contig) bằng chương trình PacBio's circular consensus sequencing (CCS), hợp nhất *de novo* bằng phần mềm Canu software v2.0, và kiểm tra chất lượng bằng phần mềm Quast software v5.0.2.

Phân tích chuỗi gen và hệ gen

Sắp xếp căn chỉnh, xác định cấu trúc gen và toàn bộ hệ gen ty thể được thực hiện trực tuyến (online) qua chương trình Gene Infinity (<http://www.geneinfinity.org/>) hoặc các chương trình so sánh có tại Expasy (<https://www.expasy.org/>). Thành phần amino acid của mã hóa protein được suy diễn bằng bộ mã của mtDNA của sán dẹt (echinoderm mitochondrial genetic code, translation table 9 trong GenBank) sử dụng GENEDOC2.7 (<http://w.w.w.psc.edu/biomed/genedoc>). Độ dài và cấu trúc tRNA dựa vào tRNAscan-SE 1.21 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) và ARWEN (<http://130.235.244.92/bcgit/arwen.cgi>); các cấu trúc lặp (repeat unit, RU) bằng phần mềm Tandem Repeats Finder v3.01 có tại (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>).

Phân tích xây dựng cây phả hệ và tính toán khoảng cách di truyền

Trình tự amino acid cộng hợp của 12 gen mã hóa protein (khoảng 3354 aa đến 3406 aa) từ 32 chủng/loài của 3 họ sán lá (Paragonimidae, Heterophyidae và Opisthorchiidae) liệt kê trong Bảng 1 được sử dụng làm thành phần nội hợp (ingroup) trong phân tích phả hệ. *Schistosoma haematobium* (họ Schistosomatidae) được sử dụng làm nhóm ngoại hợp (outgroup). Họ Paragonimidae gồm 15 chủng thuộc các loài *P. heterotremus*, *P. westermani*, *P. ohirai*, *P. iloktsuenensis*, *P. s. miyazakii* và *P. kellicotti* ngoài tham gia thành phần phân tích phả hệ còn được sử dụng tính toán khoảng cách di truyền. Sắp xếp căn chỉnh của 32 chuỗi amino acid được thực hiện bằng

GENEDOC2.7 và MAFFT 7.122. Phân tích phả hệ thực hiện trực tuyến bằng PhyML tại <https://ngphylogeny.fr/>, cây phả hệ được xây dựng bằng chương trình MEGA 11 sử dụng phương pháp “*tiếp cận cực đại*” (ML, maximum-likelihood), thuật toán Jones-Taylor-Thornton (JTT) và Nearest-Neighbor-Interchange (NNI), với hệ số tin tưởng bootstrap 1000 lần lặp lại. Khoảng cách di truyền song chuỗi (pairwise genetic distance) được tính toán giữa 14 chủng/loài *Paragonimus* sử dụng chương trình MEGA 11, thông số Kimura-2, phương pháp p-distance và hệ số tin tưởng bootstrap 1000 lần lặp lại (Tamura *et al.*, 2021).

Bảng 1. Danh sách và thông tin loài/chủng cung cấp toàn bộ chuỗi nucleotide hệ gen và 12 gen mã hóa protein (nucleotide và amino acid) sử dụng phân tích phả hệ của các loài *Paragonimus* của Việt Nam với các chủng/loài trong các họ Paragonimidae, Heterophyidae, Opisthorchiidae và Schistosomatidae trong nghiên cứu này

	Họ/Loài/Chủng và nước phân lập	Số ngân hàng gen	Ký hiệu chủng	mtDNA (bp)	PCGs (bp)	PCGs (aa)	Nước thu thập	Tài liệu (nếu có)
Paragonimidae								
1	<i>Paragonimus heterotremus</i> -(D2YB)-Vietnam	==	Phet-(D2YB)-VN	16.268	10,101	3355	Vietnam	Nghiên cứu này
2	<i>Paragonimus heterotremus</i> -(LC)-Vietnam	KY952166	Phet-(LC)-VN	15.898	10,101	3355	Vietnam	GenBank
3	<i>Paragonimus heterotremus</i> -(GX)-China	MH059809	Phet-(GX)-CN	13.927	10,101	3355	China	Qian <i>et al.</i> (2018)
4	<i>Paragonimus westermani</i> -(QT2)-Vietnam	==	Pwes-(QT2)-VN	14.779	10,104	3356	Vietnam	Nghiên cứu này
5	<i>Paragonimus westermani</i> -(dog1)-China	MN412705	Pwes-(dog1)-CN	14,790	10,104	3356	China	GenBank
6	<i>Paragonimus westermani</i> -(dog2)-China	MN412706	Pwes-(dog2)-CN	14.774	10,104	3356	China	GenBank
7	<i>Paragonimus westermani</i> (3n)-(Bogil)-Korea	AF219379	Pwes3n-(Bogil)-KR	14,965	10,101	3355	South Korea	GenBank
8	<i>Paragonimus westermani</i> (2n)-(Haenam)-Korea	AF540958	Pwes2n-(Haenam)-KR	14,244	10,101	3355	South Korea	GenBank
9	<i>Paragonimus westermani</i> -(Type I)-India	KM280646	Pwes-(Type 1)-IN	14,015	10,104	3356	India	GenBank
10	<i>Paragonimus westermani</i> -(AP)-India	KX943544	Pwes-(AP)-IN	14,975	10,104	3356	India	Biswal <i>et al.</i> (2014)
11	<i>Paragonimus westermani</i> -(IND2009)-India	CM017921	Pwes-(IN2009)-IN	20,273	10,104	3356	India	Oye <i>et al.</i> (2019b)
12	<i>Paragonimus ohirai</i> (Kino)-Japan	KX765277	Pohi-(Kino)-JP	14,818	10,104	3356	Japan	Le <i>et al.</i> (2019)
13	<i>Paragonimus iloktsuenensis</i> -(Amami)-Japan	ON961029	Pilo-(Amami)-JP	14,827	10,104	3356	Japan	Le <i>et al.</i> (2023)
14	<i>Paragonimus skrjabini miyazakii</i> -(OkuST1)-Japan	ON782295	Psmiy-(OkuST1)-JP	17,591	10,098	3354	Japan	Le <i>et al.</i> (2022)
15	<i>Paragonimus kellicotti</i> -(Ozark)-United States	MH322000	Pkel-(Ozark)-US	13,786	10,098	3354	United States	Wang <i>et al.</i> (2018)
Heterophyidae								
16	<i>Cryptocotyle lingua</i> -(66766)-Norway	OL853496	Clin-(66766)-NO	13,983	10173	3379	Norway	
17	<i>Haplorchis taichui</i> -(QT3)-Vietnam	MG972809	Htai-(QT3)-VN	15,120	10,164	3379	Vietnam	GenBank
18	<i>Haplorchis taichui</i> -(Laos)-Laos	KF214770	Htai-(Laos)-LA	15,131	10,164	3392	Laos	Lee <i>et al.</i> (2013)
19	<i>Metagonimus yokogawai</i> -Korea	KC330755	Myok--KR	15,258	10,245	3405	South Korea	GenBank
Opisthorchiidae								
20	<i>Clonorchis sinensis</i> -(Amur)-Russia	FJ381664	Csin-(Amur)-RU	13,875	10,209	3403	Russia	Shekhovtsov <i>et al.</i> (2010)
21	<i>Clonorchis sinensis</i> -(ND)-Vietnam	==	Csin-(ND)-VN	14,461	10,209	3394	Vietnam	Nghiên cứu này
22	<i>Clonorchis sinensis</i> -(GD)-China	JF729303	Csin-(GD)-CN	13,879	10,209	3394	China	Cai <i>et al.</i> (2012)
23	<i>Clonorchis sinensis</i> -Korea	JF729304	Csin-KR	13,877	10,209	3394	South Korea	Cai <i>et al.</i> (2012)
24	<i>Clonorchis sinensis</i> -(Jinju)-Korea	MT607652	Csin-(Jinju)-KR	18,304	10,209	3391	South Korea	Kinkar <i>et al.</i> (2020)
25	<i>Opisthorchis viverrini</i> -Laos	JF739555	Oviv-LA	13,510	10,206	3391	Laos	Cai <i>et al.</i> (2012)
26	<i>Opisthorchis viverrini</i> -(KK)-Thailand	==	Oviv-(KK)-TH	14,046	10,200	3400	Thailand	Nghiên cứu này
27	<i>Opisthorchis felineus</i> -(UstTula)-Russia	EU921260	Ofel-(UstTula)-RU	14,277	10,218	3406	Russia	Shekhovtsov <i>et al.</i> (2010)
28	<i>Opisthorchis sudarikovi</i> -(Swabi)-Pakistan	MK033132	Osud-(Swabi)-PK	13,641	10,197	3397	Pakistan	Suleman <i>et al.</i> (2019)
29	<i>Opisthorchis parageminus</i> -(PC6)-Vietnam	==	Opar-(PC6)-VN	13,540	10,224	3396	Vietnam	Nghiên cứu này
30	<i>Amphimerus</i> sp.-(JM2019)-Ecuador	MK238506	AmpSP-(JM2019)-EC	15,151	10,179	3381	Ecuador	Ma <i>et al.</i> (2019)
31	<i>Metorchis orientalis</i> -(HLJ)-China	KT239342	Mori-(HLJ)-CN	13,834	10,176	3392	China	Na <i>et al.</i> (2016)
Schistosomatidae outgroup								
32	<i>Schistosoma haematobium</i> -(N10)-Mali	DQ157222	Shae-(N10)-ML	15,003	10,116	3365	Mali	Littlewood <i>et al.</i> (2006)

mtDNA: Mitochondrial genome; PCGs: Gen mã hóa protein (protein-coding genes); (=): Đang đăng ký.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hệ gen ty thể của sán lá phổi *Paragonimus heterotremus* (D2YB) và *P. westermani* (QT2) của Việt Nam

Hệ gen ty thể hoàn chỉnh của sán lá phổi *P. heterotremus* chủng D2YB (Phet-D2YB-VN) là vòng DNA khép kín có độ dài 16.268 bp và của *P. westermani* chủng QT2 (Pwes-QT2-VN) là 14.779 bp. Cả hai hệ gen đều có 12 gen mã hóa protein gồm *cox1-3*, *nad1-6*, *nad4L*, *atp6* và *cob*; 2 gen RNA ribosome ty thể (MRG) là *rrnL* (16S) và *rrnS* (12S); 22 gen RNA vận chuyển (tRNA); và một vùng không mã hóa (NCR), chứa nhiều cấu trúc lặp dài (LRU, long repeat unit) và lặp ngắn (SRU, short repeat unit). Bản đồ hệ gen mtDNA mạch thẳng mở vòng tại 5' gen *cox3*, của Phet-D2YB-VN và Pwes-QT2-VN đều có trật tự sắp xếp: 5'-*cox3*-H-*cob*-*nad4L*-*nad4*-QFM-*atp6*-*nad2*-VAD-*nad1*-NPIK-*nad3*-S₁W-*cox1*-T-*rrnL*-C-*rrnS*-*cox2*-*nad6*-YL₁S₂L₂R-*nad5*-GE-NCR[LRU-SRU]-3'. Độ dài và sắp xếp gen trong vùng mã hóa của mtDNA ở hai loài Phet-D2YB-VN và Pwes-QT2-VN cơ bản giống nhau. Tuy nhiên, vùng NCR của 2 chủng/loài này có khác nhau và thể hiện tính đa hình (polymorphism) của sán lá phổi bởi số lượng và kích thước khác nhau của các cấu trúc lặp dài (*P. heterotremus* D2YB có 6 LRU/370 bp mỗi đơn vị và 5 SRU/114 bp mỗi đơn vị và *P. westermani* QT2 có 8 LRU/119 bp mỗi đơn vị; 2 SRU/118 bp mỗi đơn vị). Đặc biệt, cấu trúc lặp dài LRU của *P. heterotremus* (D2YB) đều chứa toàn bộ chuỗi nucleotide của gen RNA vận chuyển amino acid glutamine (tRNA^{Glu}) định vị ở giữa của mỗi một LRU, và đó cũng là một đặc điểm cấu trúc mới phát hiện gần đây ở vùng NCR của loài sán lá phổi *P. s. miyazakii* (Le et al., 2022).

Phân tích phả hệ của sán lá phổi *Paragonimus*

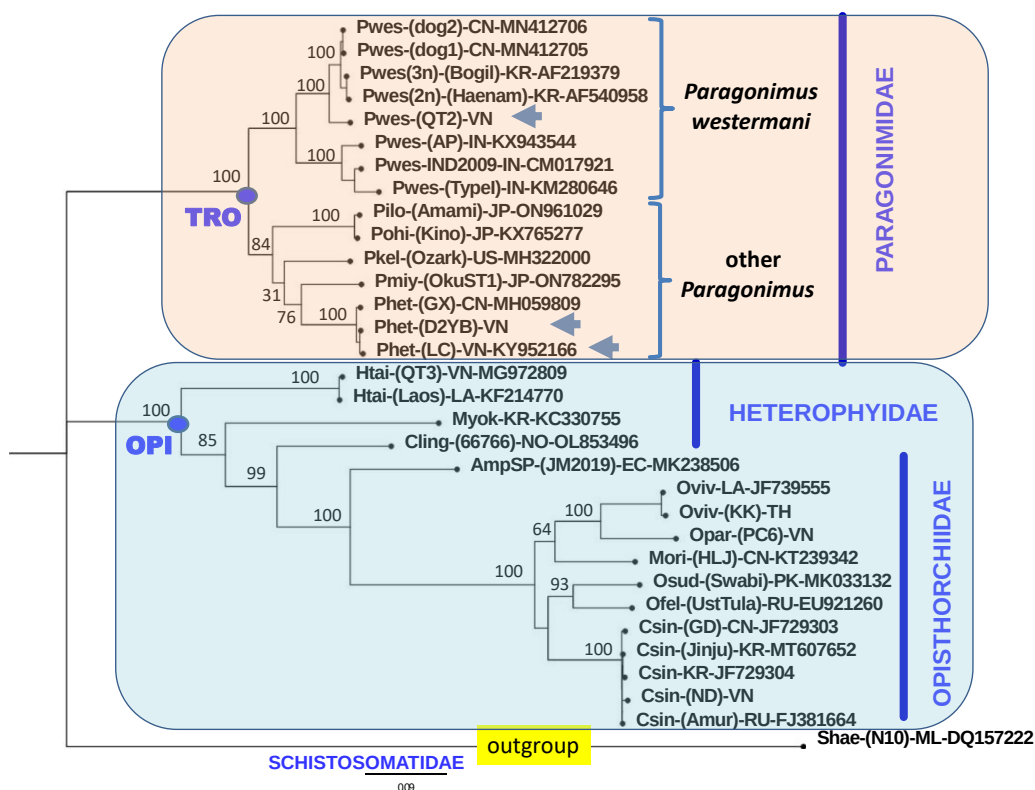
Cây phả hệ của 32 chủng/loài (liệt kê ở **Bảng 1**) dựa trên phân tích chuỗi aa cộng hợp của 12 gen mã hóa protein bằng MEGA X được trình bày ở **Hình 1**. Trên cây phả hệ có nhóm phân định tách biệt nhau: i) nhóm thứ nhất là Troglotremata (ký hiệu là TRO), gồm 15 chủng *Paragonimus* (họ Paragonimidae, phân bộ Troglotremata) và nhóm thứ hai là Opisthorchiata (ký hiệu là OPI) gồm 16 chủng, trong đó có 4 chủng của *Cryptocotyle*, *Haplorchis*, *Metagonimus* (họ Heterophyidae) và 12 chủng của *Clonorchis*, *Opisthorchis*, *Amphimerus* và *Metorchis* (họ Opisthorchiidae) thuộc phân bộ Opisthorchiata; và iii) nhóm thứ ba là chuỗi ngoại hợp của loài *S. haematobium* (họ Schistosomatidae). Kết quả cũng cho thấy các chủng sán lá phổi của Việt Nam và thế giới được phân thành hai phân nhóm trong họ Paragonimidae với hệ số tin tưởng 100%, gồm toàn bộ các chủng của loài *P. westermani* (kể cả *P. westermani* chủng QT2 của Việt Nam) ở một phân nhóm và phân nhóm kia là tất cả các chủng của tất cả các loài *Paragonimus* còn lại của thế giới, kể cả *P. heterotremus* chủng D2YB của Việt Nam. Hai phân nhóm của *Paragonimus* trong nhánh phân loại họ Paragonimidae được sắp xếp ở vị trí “chị em” (sister) rất rõ ràng.

Khoảng cách di truyền giữa các chủng/loài sán lá phổi *Paragonimus*

Trong nghiên cứu này, khoảng cách di truyền (pairwise genetic distance) (KCDT) được tính toán dựa trên phân tích chuỗi amino acid cộng hợp của 12 gen mã hóa protein (3354-3406 aa) của 15 chủng/6 loài sán lá phổi trong họ Paragonimidae (liệt kê ở **Bảng 1**). Sáu loài bao gồm: *P. heterotremus* các chủng của Việt Nam và Trung Quốc; *P. westermani* các chủng của Việt Nam, Trung Quốc, Hàn Quốc và Ấn Độ; *P. ohirai* chủng của Nhật Bản; *P. iloktsuenensis* chủng của Nhật Bản; *P. skrjabini miyazakii* chủng của Nhật Bản; và *P. kellicotti* Bắc Mỹ chủng của Mỹ.

Dựa vào giá trị KCDT, nhóm của loài *P. westermani* (8 chủng) chia thành 3 phân loài chính: nhóm phân loài *P. westermani* Việt Nam (1 chủng Việt Nam), nhóm phân loài *P. westermani* Đông Á (2 chủng Trung Quốc và 2 chủng Hàn Quốc), nhóm *P. westermani* Nam Á/Ấn Độ (3 chủng Ấn Độ). Kết quả phân tích cho thấy, KCDT nội loài của loài *P. heterotremus* giữa 2 chủng Việt Nam (D2YB và LC) và Trung Quốc (GX) là rất thấp (0,48-1,09%) cũng giống như KCDT nội loài *P. westermani* của nhóm Đông Á giữa 4 chủng của Trung Quốc và Hàn Quốc (dog1, dog2, Bogil và Haenam) là (0,15-1,09%), trong khi đó, KCDT nội loài *P. westermani* của nhóm Nam Á giữa 3 chủng của Ấn Độ (Type I, AP và IND2009) là rất cao (3,25-6,23%). Chủng QT2 (Việt Nam) tuy cùng loài *P. westermani*, nhưng giá trị KCDT nội loài của chủng này so với nhóm Đông Á là 3,94-4,51% và so với nhóm Nam Á (Ấn Độ) là rất cao (12,1-12,7%) (**Bảng 2**). Giá trị KCDT nội loài của *P. westermani* trong nhóm 3 chủng của Ấn Độ có biến thiên mạnh, đạt 6,23% giữa chủng Type I và AP và 4,16% giữa chủng AP và IND2009. Tuy được coi là hai loài, nhưng giá trị KCDT giữa loài *P. ohirai* và *P. iloktsuenensis* chỉ là 0.79%, mức tương đương nội loài vốn có của các chủng trong một loài *P. heterotremus*. Hai loài *P. ohirai* và *P. iloktsuenensis* được xác định lại là đồng danh (synonymy) trên cơ sở phân tích mtDNA và đơn vị mã hóa ribosome (Le et al., 2023).

Giá trị KCDT ngoại loài cao nhất là giữa loài đồng danh *P. ohirai/P. iloktsuenensis* với *P. westermani* nhóm Ấn Độ (19,93-21,23%) và thấp nhất là giữa *P. heterotremus* với *P. skrjabini miyazakii*, chỉ là 12,20-12,47%. Điều đặc biệt chú ý là, KCDT nội loài của *P. westermani* giữa nhóm 3 chủng của Ấn Độ (nhóm Nam Á) với nhóm 5 chủng Đông Á (Trung Quốc và Hàn Quốc) và cả Việt Nam là xấp xỉ 11,5% đến 12%, một giá trị tương đương với KCDT ngoại loài giữa *P. heterotremus* với *P. skrjabini miyazakii* (**Bảng 2**).



Hình 1. Cây phả hệ ML của 32 chủng/loài của các họ Paragonimidae, Heterophyidae, Opisthorchiidae và ngoại hợp Schistosomatidae. Phân tích phả hệ dựa trên sắp xếp cộng hợp amino acid của 12 gen mã hóa protein bằng phương pháp ML ("tiếp cận cực đại", maximum-likelihood) với 1000 lần lặp lại. *Schistosoma haematobium* (họ Schistosomatidae) là nhóm ngoại hợp (outgroup). Hiển thị trên mỗi nhánh/nhóm là giá trị hệ số tin tưởng (bootstrap). Nút cơ bản của phân bộ Troglotremata (TRO) và Opisthorchiata (OPI) được đánh dấu bằng vòng tròn nhỏ tại nút phân nhánh. Mũi lên chỉ các chủng/loài *Paragonimus* của Việt Nam, đối tượng chính của nghiên cứu này. Ở mỗi chuỗi, viết tắt 4 chữ đầu tiên là ký hiệu loài, tiếp đến là chủng (nếu có, trong ngoặc), tiếp theo là ký hiệu hai chữ cái của quốc gia, nơi mẫu được phân lập và công bố, cuối chuỗi là số đăng ký Ngân hàng gen (Bảng 1). Thanh tỷ lệ đại diện cho số lượng thay thế trên mỗi nhánh (0.09 = 9/100).

Bảng 2. Khoảng cách di truyền giữa các chủng của Việt Nam với các chủng/loài của *Paragonimus* trong họ Paragonimidae

Chủng/Loài	1	2	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 Phet-(D2YB)-VN														
2 Phet-(LC)-VN	0,48													
3 Phet-GX-CN	0,85	1,09												
4 Pwes-QT2-VN	17,13	17,42	17,06											
5 Pwes-(dog1)-CN	17,16	17,41	17,01	4,00										
6 Pwes-(dog2)-CN	17,16	17,42	17,02	3,94	0,15									
7 Pwes(3n)-Bogil-KR	17,35	17,60	17,21	4,30	0,88	0,88								
8 Pwes(2n)-Haenam-KR	17,73	17,98	17,59	4,51	1,09	1,09	0,21							
9 Pwes-(TypeI)-IN	18,76	19,01	18,65	12,10	11,21	11,12	11,20	11,44						
10 Pwes-(AP)-IN	19,19	19,44	19,19	12,70	11,53	11,51	11,49	11,69	6,23					
11 Pwes-(IND 2009)-IN	17,74	17,99	17,70	12,13	11,91	11,90	12,09	12,32	3,25	4,16				
12 Pphi-(Kino)-JP	14,72	14,93	14,51	19,01	18,90	18,90	19,10	19,45	21,05	21,04	19,93			
13 Pilo-(Amami)-JP	14,89	15,10	14,68	19,16	19,05	19,05	19,25	19,56	21,16	21,23	20,08	0,79		
14 Pmiy-(Oku ST1)-JP	12,24	12,47	12,20	17,42	17,45	17,49	17,57	17,95	19,17	19,26	18,07	14,79	14,90	
15 Pkel-(Ozark)-US	13,22	13,40	13,09	17,63	17,01	16,95	17,21	17,55	18,94	19,26	18,10	15,03	15,17	13,33

Khoảng cách di truyền nội loài/phân loài của *P. heterotremus* và *P. westermani* (phân nhóm Đông Á và phân nhóm Nam Á/Ấn Độ) được đóng khung; KCDT nội loài của *P. westermani* của chủng Qt2 Việt Nam với phân nhóm Đông Á và phân nhóm Nam Á/Ấn Độ được bôi đậm con số; và KCDT nội loài của *P. westermani* của phân nhóm Nam Á/Ấn Độ với phân nhóm Đông Á và Việt Nam được bôi nền. Một số giá trị khác được bôi màu để theo dõi.

Nghiên cứu giải trình tự toàn bộ mtDNA và trật tự gen, cấu trúc gen của sán lá phổi *Paragonimus* rất quan trọng nhằm cung cấp hiểu biết gen/hệ gen, tiến hóa, chỉ thị phân tử cho nghiên cứu phân biệt loài, di truyền quần thể và phả hệ tiến hóa. Với dữ liệu mtDNA của *P. heterotremus* chủng D2YB (Việt Nam) và *P. westermani* chủng QT2 (Việt Nam), hiện nay, họ Paragonimidae đã có 15 mtDNA hoàn chỉnh được công bố và sử dụng dữ liệu (Bảng 1). Cũng giống như một số loài sán dẹt trước đây, mtDNA của *P. heterotremus* chủng D2YB và *P. westermani* chủng QT2 có trật tự sắp xếp gen, sử dụng gen, bộ mã ATG/GTG để khởi đầu và TAA/TAG để kết thúc gen mã hóa protein được biết cho đến nay. Tuy nhiên vùng NCR của mtDNA có một số khác biệt đặc trưng. Do khai thác công nghệ NGS nên NCR của cả hai loài được thu nhận và đó là độ dài và cấu trúc đích thực của chúng. Các cấu trúc lặp dài và ngắn được phát hiện trong vùng NCR của cả *P. heterotremus* (D2YB) và *P. westermani* (QT2) trong nghiên cứu này, cũng được thấy ở *P. s. miyazakii* (Le et al., 2022) và *P. ohirai*/*P. iloktsuenensis* (Le et al., 2023) và nhiều loài sán dẹt khác, tạo nên đa hình (polymorphism) cấu trúc và kích thước mtDNA dài ngắn khác nhau. Nghiên cứu phá hệ các loài họ Paragonimidae và các họ liên quan (Heterophyidae và Opisthorchiidae) theo công bố của Le et al. (2022; 2023) và ở nghiên cứu này đều đã chỉ ra là có hai nhóm loài có quan hệ “đồng vị” (monophyly) đó là phân nhóm *P. westermani* riêng biệt sắp xếp ở vị trí “chị em” với phân nhóm các loài *Paragonimus* khác tạo nên của thế giới. Cây phả hệ cũng cho thấy sự sắp xếp “lệch vị” (paraphyly) và “đa vị” (polyphyly) của các loài và các chi có trong họ Heterophyidae và Opisthorchiidae của phân bộ Opisthorchiata.

Khoảng cách di truyền của các chủng/loài sán lá phổi *Paragonimus* trong họ Paragonimidae phản ánh một số nét đặc trưng của riêng họ này. Đó là KCDT nội loài của phân nhóm *P. westermani* Nam Á của các chủng Ấn Độ với các chủng của phân nhóm *P. westermani* Đông Á (Việt Nam, Trung Quốc và Hàn Quốc) rất cao, tương đương với giá trị KCDT ngoại loài giữa *P. heterotremus* và *P. heterotremus* với *P. skrjabini miyazakii*. Sự biến động đặc biệt trong di truyền của các chủng ở Ấn Độ của loài *P. westermani* đã được một số nghiên cứu đề cập (Devi et al., 2013; Blair et al., 2022) và có thể cho phép tính đến các phân dòng tiến hóa của quần thể *P. westermani* ở Ấn Độ sâu sắc hơn so với quần thể *P. westermani* ở Đông và Đông-Nam Á. Những nét đặc trưng về di truyền và cấu trúc của mtDNA của sán lá phổi *Paragonimus* và của họ Paragonimidae, KCDT và biến đổi di truyền nội loài và ngoại loài của chúng, cho phép làm đích khai thác cho nghiên cứu di truyền quần thể, phá hệ, nguồn gốc, tiến hóa của sán lá phổi *Paragonimus*, đồng thời dữ liệu gen học ty thể của chúng được sử dụng cho phát triển chẩn đoán, định hướng nghiên cứu thẩm định loài/giống/họ kí sinh trùng động vật lây sang người.

KẾT LUẬN

Toàn bộ mtDNA của sán lá phổi *P. heterotremus* (D2YB, Việt Nam) và *P. westermani* (Qt2, Việt Nam) được thu nhận bằng phương pháp giải trình tự thông thường và thế hệ mới (NGS). Phả hệ của 32 chủng loài, trong đó có 15 chủng/loài *Paragonimus* được xây dựng và xác định có hai phân nhóm riêng biệt trong chi *Paragonimus*. Khoảng cách di truyền của các chủng/ loài có những nét riêng biệt tạo nên sự đặc trưng di truyền của nhóm sán lá phổi trong lớp Sán lá (Trematoda).

Lời cảm ơn: Nguyễn Thị Khuê được tài trợ bởi Chương trình học bổng sau tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.STS.85.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Blair D (2022). Lung flukes of the genus *Paragonimus*: ancient and re-emerging pathogens. *Parasitol* 149: 1286-1295.
- Chan AHE, Chaisiri K, Saralamba S, Morand S, Thaenkham U (2021) Assessing the suitability of mitochondrial and nuclear DNA genetic markers for molecular systematics and species identification of helminths. *Parasit Vectors* 14: 233.
- Devi KR, Narain K, Mahanta J, Nirmolia T, Blair D, Saikia SP, Agatsuma T (2013). Presence of three distinct genotypes within the *Paragonimus westermani* complex in northeastern India. *Parasitol* 140(1): 76-86.
- Doanh PN, Horii Y, Nawa Y (2013). *Paragonimus* and paragonimiasis in Vietnam: an update. *Korean J Parasitol* 51(6): 621-627.
- Doanh PN, Shinohara A, Horii Y, Habe S, Nawa Y (2009). Discovery of *Paragonimus westermani* in Vietnam and its molecular phylogenetic status in *P. westermani* complex. *Parasitol Res* 104(5): 1149-1155.
- Kino H, De NV, Vien HV, Chuyen LT, Sano M (1995). *Paragonimus heterotremus* Chen et Hsia, 1964 found from a dog in Vietnam. *Jpn J Parasitol* 44: 470-472.
- Le TH, De NV, Blair D, McManus DP, Kino H, Agatsuma T (2006). *Paragonimus heterotremus* Chen and Hsia, 1964, in Vietnam: a molecular identification and relationships of isolates from different hosts and geographical origins. *Acta Trop* 98(1): 25-33.
- Le TH, Nguyen KT, Pham LTK, Doan HTT, Agatsuma T, Blair D (2022). The complete mitogenome of the Asian lung fluke *Paragonimus skrjabini miyazakii* and its implications for the family Paragonimidae (Trematoda: Platyhelminthes). *Parasitology* 149:1709-1719.
- Le TH, Nguyen KT, Pham LTK, Doan HTT, Do RT, Le XTK, Agatsuma T, Blair D (2023). Mitogenomic and nuclear ribosomal transcription unit datasets support the synonymy of *Paragonimus iloktsuenensis* and *P. ohirai* (Paragonimidae: Platyhelminthes). *Parasitol Res* 122(7): 1531-1544.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38: 3022-3027.
- Wey-Fabrizius AR, Podsiadlowski L, Herlyn H, Hankeln T (2013). Platyzoan mitochondrial genomes. *Mol Phylogenet Evol* 69: 365-375.
- Yoshida A, Doanh PN, Maruyama H (2019). *Paragonimus* and paragonimiasis in Asia: An update. *Acta Trop* 199: 105074.

PHYLOGENETIC ANALYSIS AND GENETIC DISTANCE ESTIMATION OF *PARAGONIMUS* LUNG FLUKES OF VIETNAM USING DATA FROM THE COMPLETE MITOGENOMES

Nguyễn Thị Khuê^{1,2}, Đỗ Thị Roan^{1,2}, Phạm Thị Khánh Linh¹,
Đoàn Thị Thanh Hương^{1,2}, Phạm Ngọc Doanh³, Lê Thanh Hòa^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduated University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Institute of Ecology and Biological Resources*

SUMMARY

Using Sanger and next-generation sequencing (NGS), the mitochondrial genome (mtDNA) of the Vietnamese lung flukes *Paragonimus heterotremus* (strain D2YB) and *P. westermani* (strain QT2) was determined and are 16,268 bp/D2YB and 14,779 bp/QT2 in length, respectively. There are 12 protein-coding genes (PCG); 2 mitoribosomal genes (MRG); 22 transfer RNA genes (tRNAs); and a non-coding region (NCR) with multiple long (LRU) and short repeats (SRU) structures. Phylogenetic analysis was performed using the concatenated amino acid sequences of all 12 protein-coding genes from 32 strains/species, including families Paragonimidae (15 sequences), Heterophyidae (4 sequences), Opisthorchiidae (12 sequences) and a sequence of Schistomatidae (as an outgroup). The phylogenetic tree clearly identified two subgroups among the Paragonimidae: one having only *P. westermani* species and another comprising all other worldwide *Paragonimus* species. Pairwise genetic distance (GD) estimation reveals that the highest GD value is between the synonymous *P. ohirai*/*P. iloktsuenensis* and *P. westermani* of the Indian group (19.93-21.23%), while the lowest between *P. heterotremus* and *P. skrjabini miyazakii*, only 12.20-12.47%. The intraspecific GD value, between the South Asian *P. westermani* subgroup (Indian strains) and the East Asian *P. westermani* subgroup (Vietnam, China, and Korea strains) is particularly high (12.1-12.7%), matching the interspecific GD value between *P. heterotremus* and *P. heterotremus* and *P. skrjabini miyazakii*. *Paragonimus*' genetic characteristics, mtDNA structure, and genetic distance make it an exploitable target for population genetics, phylogenetic and evolutionary studies, as well as the development of diagnostics and research orientation to evaluate species/genus/families of zoonotic parasites.

Keywords: Mitogenome (mtDNA), Paragonimidae, genetic distance, phylogeny, lung fluke *Paragonimus*.

* Author for correspondence: Tel: +0912336855; Email: imibtn@gmail.com

HIỆU QUẢ SỬ DỤNG OXY NỒNG ĐỘ THẤP TRONG NUÔI TRƯỞNG THÀNH NOÃN NON TRONG ống NGHIỆM CÓ BƯỚC TIỀN TRƯỞNG THÀNH (CAPA-IVM) Ở BỆNH NHÂN PCOS: NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM CHIA NOÃN

Trần Quốc Việt^{1,3*}, Phạm Hoàng Huy^{1,3}, Lê Hoàng Anh^{1,3}, Phạm Dương Toàn³, Nguyễn Lê Duy³, Vũ Thị Lan Anh³, Lê Long Hồ^{1,3}, Lê Khắc Tiến^{1,3}, Hồ Mạnh Tường^{2,3}, Vương Thị Ngọc Lan⁴

¹IVFMD Phú Nhuận, Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận, Thành phố Hồ Chí Minh

²IVFMD, Bệnh viện Mỹ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh

³Trung tâm nghiên cứu HOPE, Bệnh viện Mỹ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Khoa Phụ Sản, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trưởng thành noãn non trong ống nghiệm (IVM) là phương pháp hỗ trợ sinh sản chủ yếu được áp dụng trên nhóm bệnh nhân mắc hội chứng buồng trứng đa nang (PCOS) nhằm giảm tác dụng phụ và rủi ro liên quan đến quá kích buồng trứng. Hệ thống IVM mới có bước tiền nuôi cấy trưởng thành (CAPA-IVM) đã được chứng minh là có hiệu quả cải thiện tiềm năng của noãn. Hiện tại, CAPA-IVM không kiểm soát nồng độ oxy, tương ứng với nồng độ oxy khí quyển (20%). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả nuôi cấy noãn non với nồng độ oxy thấp (5%) so với nồng độ oxy khí quyển (20%) trong cả hai bước của quy trình CAPA-IVM ở nhóm bệnh nhân PCOS. Các phức hợp noãn và tế bào hạt (COCs) từ 20 bệnh nhân được chia ngẫu nhiên thành hai nhóm: nồng độ oxy thấp (5%) và nồng độ oxy khí quyển (20%). Các COCs này được nuôi CAPA-IVM trong tủ cấy benchtop BT37 (Origio, Đan Mạch) và sử dụng hỗn hợp khí trộn thương mại tương ứng. Kết cục chính là số lượng noãn trưởng thành. Các kết cục phụ bao gồm số lượng noãn thụ tinh 2 tiền nhân (2PN), số lượng phôi nang và phôi nang loại tốt, số lượng phôi trữ và động học phát triển phôi. Kết quả cho thấy, số lượng noãn trưởng thành và số lượng noãn thụ tinh thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm sử dụng nồng độ oxy thấp so với nhóm sử dụng nồng độ oxy khí quyển (đạt tỷ lệ 53,6% và 33% so với 65,8% và 47,8% với $P < 0,05$). Nhóm nồng độ oxy thấp có số phôi nang, số phôi nang loại tốt và số phôi trữ thấp hơn so với nhóm nồng độ oxy khí quyển, nhưng không có ý nghĩa thống kê. Động học phát triển phôi là tương tự nhau giữa 2 nhóm. Đây là nghiên cứu đầu tiên khảo sát tác động của nồng độ oxy thấp đến sự trưởng thành trong ống nghiệm của noãn người trong hệ thống CAPA-IVM. Nồng độ oxy khí quyển nên là lựa chọn tối ưu để nuôi cấy CAPA-IVM trên nhóm bệnh nhân PCOS.

Từ khoá: CAPA-IVM, hội chứng buồng trứng đa nang (PCOS), IVM, nồng độ oxy, phức hợp noãn - tế bào hạt (COCs).

MỞ ĐẦU

Thụ tinh trong ống nghiệm (*In vitro* fertilization-IVF) được phát triển bởi Edwards và Steptoe vào năm 1978 bằng cách thu nhận noãn trưởng thành từ nang vượt trội trong chu kỳ kinh nguyệt tự nhiên. Mục tiêu chính của IVF là có trẻ sinh sống khỏe mạnh nên tập trung vào việc tối ưu hóa hiệu quả và giảm thiểu thời gian điều trị. Do đó, hiện nay IVF sử dụng kích thích buồng trứng với nhiều liều gonadotropin để tăng số lượng noãn thu nhận nhằm làm tăng số lượng phôi khả dụng. Các phôi này có thể được sử dụng cho chu kỳ chuyển phôi tươi hoặc được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hoá cho chu kỳ chuyển phôi trữ. Tuy nhiên, việc sử dụng nhiều liều gonadotropin gây tổn kém và dễ dẫn đến nguy cơ mắc hội chứng quá kích buồng trứng (Ovarian Hyperstimulation Syndrome-OHSS), đặc biệt ở bệnh nhân mắc hội chứng buồng trứng đa nang (Polycystic Ovary Syndrome-PCOS) (Brinsden *et al.*, 1995).

Một phương pháp tiếp cận khác, được gọi là nuôi trưởng thành noãn non trong ống nghiệm (*In vitro* maturation-IVM), đã được Robert Edwards trình bày vào năm 1965. Trong IVM, phức hợp nang noãn chưa trưởng thành (Cumulus-oocyte-complexes-COCs) từ các nang có hốc nhỏ được thu nhận mà không hoặc sử dụng tối thiểu liều gonadotropin. Những COCs này sau đó được nuôi cấy *in vitro* cho đến khi chúng đạt đến giai đoạn metaphase II (noãn MII) để tạo phôi (Edwards, 1965; Paulson *et al.*, 2016; Vuong *et al.*, 2019). IVM có một số ưu điểm so với IVF thông thường, bao gồm thời gian điều trị ngắn hơn, giảm chi phí thuốc, thuận tiện hơn cho bệnh nhân và quan trọng nhất là không gây ra OHSS đặc biệt đối với những bệnh nhân PCOS có nguy cơ cao mắc OHSS sau kích thích buồng trứng trong IVF (Das *et al.*, 2014; Vuong *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020; Teede *et al.*, 2023).

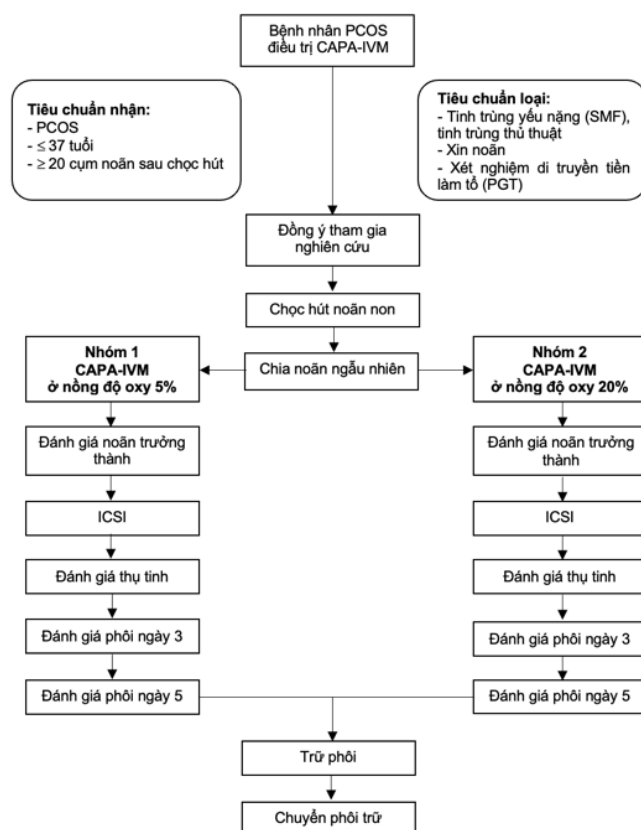
Hệ thống IVM mới có bước tiền nuôi cấy trưởng thành (CAPA-IVM) được giới thiệu bởi Sanchez và cộng sự vào năm 2017, đã được chứng minh giúp cải thiện tiềm năng của noãn sau nuôi trưởng thành thông qua sự đồng bộ trưởng thành nhân và trưởng thành tế bào chất (Sanchez *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020). Trong đó, C-type natriuretic peptide (CNP) là yếu tố sinh lý chính trong nang noãn ở người, được thêm vào bước nuôi cấy tiền trưởng thành noãn (CAPA) và hoạt động như một chất ức chế phân bào, ngăn ngừa sự trưởng thành tự phát của noãn. Sau đó, amphiregulin (AREG) (phối tử giống với yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) trong giai đoạn rụng trứng), được thêm vào bước nuôi cấy trưởng thành noãn (IVM), đã được chứng minh là có tác động tích cực đến sự trưởng thành của noãn (Akin *et al.*, 2022). Tỷ lệ noãn trưởng thành khi sử dụng CAPA-IVM ở bệnh nhân PCOS hoặc bệnh nhân có số lượng nang noãn thứ cấp (Antral Follicle Count-AFC) cao đã được báo cáo là 62-64,3% (Sanchez *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020).

Nồng độ oxy trong hệ thống nuôi cấy noãn và phôi thường được duy trì ở hai mức: nồng độ oxy thấp (5%) và nồng độ oxy khí quyển (20%). Về mặt sinh lý, đường sinh sản của con người và động vật có vú có nồng độ oxy thấp, dao động từ 1,5% đến 8,7% và dịch nang noãn chứa 1% đến 5% oxy (Whitty *et al.*, 2021). Điều này đặt ra câu hỏi, noãn và phôi người *in vitro* có thể phát triển tối ưu trong những điều kiện tương tự sinh lý tự nhiên hay không? Mặc dù, hiện nay đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ oxy đến kết quả IVM và phôi học nhưng các nghiên cứu vẫn chưa có đủ cơ sở để đưa ra kết luận về nồng độ oxy tối ưu. Hệ thống CAPA-IVM đang sử dụng nồng độ oxy trong khí quyển và thiếu dữ liệu về ảnh hưởng của nồng độ oxy thấp trong CAPA-IVM trên người. Do đó, nghiên cứu thí điểm chia noãn này được thực hiện nhằm trả lời cho câu hỏi nghiên cứu: “Sử dụng nồng độ oxy thấp (5%) và nồng độ oxy khí quyển (20%) trong nuôi trưởng thành noãn non *in vitro* ở chu kỳ CAPA-IVM mang lại hiệu quả khác nhau như thế nào về khả năng trưởng thành noãn và tiềm năng phát triển phôi trên nhóm bệnh nhân PCOS?”

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thí điểm chia noãn (NCT06087354) được thực hiện tại Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận, TPHCM từ ngày 09/11/2023 đến 22/5/2024. Nghiên cứu đã được chấp thuận bởi hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức, TPHCM (Mã số 11/23/DD-BVMD, ngày 12/10/2023) và được thực hiện theo nguyên tắc thực hành lâm sàng tốt và tuyên bố Helsinki 2002. Tất cả bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều được tư vấn về nghiên cứu và đồng ý tham gia nghiên cứu.



Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu tổng thể

Dân số nghiên cứu

Đối tượng tham gia nghiên cứu là những bệnh nhân trong độ tuổi 18-37 mắc hội chứng buồng trứng đa nang (có 25 nang với đường kính 2-9 mm trong toàn bộ buồng trứng và/hoặc thể tích buồng trứng tăng > 10 mL (Group, 2004)) và có từ 20 COCs trở lên được thu nhận sau chọc hút (ovum pick-up-OPU). Tiêu chuẩn loại là chu kỳ xin noãn, chu kỳ xét nghiệm di truyền tiền làm tổ (Pre-implantation genetic testing-PGT) và các trường hợp có tình trạng yếu nặng (Severe male factor-SMF) có mật độ <1 triệu tinh trùng/mL, khả năng di chuyển <10% và tình trạng từ thủ thuật chọc hút tinh trùng từ mào tinh hoàn qua da/thu nhận tinh trùng từ tinh hoàn (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration-PESA/ Testicular Sperm Extraction-TESE). Trong lần thăm khám đầu tiên, bệnh nhân sẽ được cung cấp thông tin về nghiên cứu và những bệnh nhân đồng ý tham gia sẽ ký vào đơn đồng ý tham gia nghiên cứu.

Can thiệp và đánh giá

Sau chọc hút noãn non, COCs được thu nhận từ mỗi bệnh nhân được chia ngẫu nhiên vào một trong hai nhóm: nuôi cấy ở nồng độ oxy thấp (5%) hoặc ở nồng độ oxy khí quyển (20%) trong cả hai bước của quy trình CAPA-IVM. Nghiên cứu sử dụng tủ cấy benchtop BT37 (Origio, Đan Mạch) và sử dụng hỗn hợp khí trộn thương mại tương ứng với từng điều kiện nuôi cấy.

Chọc hút noãn non (ovum pick-up-OPU)

Trong lần khám đầu tiên, bệnh nhân được siêu âm để xác định AFC và nồng độ hormone kháng Müllerian (Anti-mullerian hormone-AMH). Bệnh nhân được chẩn đoán mắc PCOS (Group, 2004) và được sàng lọc các tiêu chí đủ điều kiện tham gia nghiên cứu. Nghiên cứu không sử dụng gonadotropin trong điều trị là dựa trên kết quả của thử nghiệm lâm sàng trước đây (NCT05600972). Theo đó, việc sắp xếp lịch khám và chọc hút noãn non được linh hoạt, phụ thuộc vào thời gian phù hợp của bệnh nhân và bác sĩ. Quy trình chọc hút noãn non giống nhau đối với tất cả bệnh nhân, như đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây (Vuong *et al.*, 2020).

Thu nhận và phân chia noãn

COCs từ dịch nang được thu nhận bằng cách quan sát dưới kính hiển vi soi nổi. Sau đó, tất cả dịch nang được đổ vào phễu lọc để kiểm tra lần cuối xem có bất kỳ COCs nào bị bỏ sót hay không. Sau OPU, tất cả COCs được rửa trong môi trường đệm (global® Collect®, Life Global, USA) và được phân chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm: nhóm nồng độ oxy thấp hoặc nồng độ oxy khí quyển. COCs được đánh giá hình thái và được phân loại là được bao quanh hoàn toàn khi có ít nhất ba lớp tế bào cumulus bao bọc hoàn toàn noãn hoặc được bao quanh một phần khi chỉ một phần noãn được bao phủ bởi các tế bào cumulus, như mô tả của Sanchez và cộng sự (Sanchez *et al.*, 2019). Các nghiên cứu đã đề cập rằng noãn chỉ được bao quanh một phần bởi cumulus dẫn đến khả năng trưởng thành và phôi kém hơn (Sanchez *et al.*, 2019). Các noãn được bao quanh hoàn toàn và các noãn được bao quanh một phần cumulus được chia đều cho 2 nhóm. Noãn không có cumulus xung quanh sẽ được loại bỏ.

Nuôi cấy CAPA-IVM và tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intracytoplasmic sperm injection-ICSI)

Nghiên cứu sử dụng tủ cấy benchtop BT37 (Origio, Đan Mạch) với hỗn hợp khí trộn thương mại tương ứng với từng điều kiện nuôi cấy (IVF Trigas Cylinder, Thai Special Gas Co., Ltd, Thái Lan) cho cả nhóm oxy thấp (7% CO₂, 5% O₂, 88% N₂) và oxy khí quyển (7% CO₂, 20% O₂, 73% N₂).

Môi trường tiền trưởng thành (bước CAPA), bao gồm môi trường IVM (MediCult IVM System, ORIGIO, Đan Mạch), được bổ sung hormone kích thích nang noãn tái tổ hợp (rFSH) 1 mIU/mL (Puregon, MSD, Australia), insulin 5 ng/mL (Insulin human, Sigma-Aldrich, Đức), estradiol 10 nmol/L (Estradiol, Sigma-Aldrich, Đức), albumin huyết thanh người 5 mg/mL (Human Serum Albumin, SAGE, Đan Mạch) và CNP-22 25nmol/L (C-type natriuretic peptide 1-22, Tocris, UK), được phủ dầu và cân bằng qua đêm.

COCs được rửa và nuôi cấy trong môi trường CAPA, với 5-10 COCs trên 500 µL môi trường trong đĩa 4 giếng (Nunc™, ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ) (Sanchez *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020). Sau đó, các đĩa cấy được nuôi cấy trong tủ cấy tương ứng với nhóm nồng độ oxy thấp hoặc oxy khí quyển để nuôi cấy CAPA trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy tiền trưởng thành, COCs được rửa sạch và chuyển sang môi trường trưởng thành (bước IVM) bao gồm môi trường IVM, được bổ sung rFSH 100 mIU/mL, insulin 5 ng/mL, estradiol 10 nmol/L và AREG tái tổ hợp ở người 100 ng/mL (Recombinant Mouse Amphiregulin Protein, R&D Systems, USA) và nuôi cấy thêm 30 giờ ở 37°C, có phủ dầu. Việc chuẩn bị bước IVM cho 2 nhóm cũng tương tự như bước CAPA nêu trên.

Sau 30 giờ nuôi cấy IVM, noãn được tách bỏ cumulus và trạng thái trưởng thành của noãn được đánh giá dưới kính hiển vi đảo ngược. Noãn trưởng thành được xác định là những noãn đã đạt đến giai đoạn metaphase II (MII) dựa trên sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Noãn trưởng thành được thụ tinh bằng kỹ thuật ICSI và nuôi cấy trong tủ nuôi cấy có tích hợp camera quan sát liên tục (timelapse incubator-CCM-iBIS, Astec, Nhật Bản) ở 37°C, 6% CO₂ và 5% O₂ có phủ dầu. Kiểm tra thụ tinh được thực hiện 16-18 giờ sau khi ICSI tuân theo đồng thuận Alpha-ESHRE 2011. Đánh giá phôi ngày 3 được thực hiện vào lúc 68 ± 1 giờ sau ICSI, dựa trên sự đồng thuận Istanbul. Tất cả phôi được nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang. Đánh giá phôi nang được thực hiện ở thời điểm 116 ± 2 giờ sau ICSI theo đồng thuận của Gardner 2016.

Động học phát triển phôi được đánh giá các thông số theo hướng dẫn Hiệp hội Sinh sản và Phôi học châu Âu-ESHRE năm 2020 bao gồm: thời gian tổng xuất thể cực thứ 2 (TPB2), thời gian 2 tiền nhân xuất hiện (TPNa), thời gian 2 tiền nhân biến mất (TPNf), thời gian phôi phân chia từ 2-8 tế bào (t2-t8), thời gian phôi bắt đầu nên (tSC), thời gian phôi nên hoàn toàn (phôi đầu-tM), thời gian bắt đầu hình thành phôi nang (tSB) và thời gian phôi nang nở rộng (tEB). Ngoài ra, tỷ lệ phôi nang bất thường phân chia (Direct cleavage-DC) ở chu kỳ phân bào thứ nhất (DC1) và chu kỳ phân bào thứ hai (DC2) cũng được so sánh ở 2 nhóm. Phôi nang được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa (Cryotech, Nhật Bản).

Chuyển phôi đông lạnh (Frozen embryo tranfer-FET)

Trong chu kỳ FET, nội mạc tử cung được chuẩn bị bằng cách sử dụng estradiol valerate đường uống 8 mg/ngày bắt đầu từ ngày thứ 2 hoặc thứ 3 của chu kỳ kinh nguyệt. Độ dày nội mạc tử cung được theo dõi từ ngày thứ 6 trở đi và bắt đầu sử dụng progesterone âm đạo khi độ dày nội mạc tử cung đạt ≥ 8 mm. Chuyển phôi nang được thực hiện vào ngày thứ 6 sau khi bắt đầu sử dụng progesterone. Estradiol và progesterone được sử dụng để hỗ trợ hoàng thể sau chuyển phôi cho đến tuần thứ 7 của thai kỳ. Nồng độ hCG huyết thanh được đo 2 tuần sau khi chuyển phôi và nếu dương tính, siêu âm tử cung được thực hiện khi thai được 7 và 12 tuần.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả chính của nghiên cứu là số lượng noãn trưởng thành. Kết quả phụ bao gồm kết quả phôi học và kết quả lâm sàng. Các kết quả về phôi học bao gồm số noãn được thụ tinh 2 tiền nhân (2PN), số phôi nang, số phôi nang chất lượng tốt, số phôi nang đông lạnh và động học phát triển phôi. Kết quả lâm sàng bao gồm xét nghiệm thai dương tính β -hCG 14 ngày sau chuyển phôi, thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ, thai ngoài tử cung và đa thai.

Phân tích thống kê

Dữ liệu được trình bày bằng cách sử dụng số liệu thống kê mô tả (giá trị trung bình và độ lệch chuẩn cho các biến phân phối chuẩn hoặc trung vị và liên vùng [IQR] cho các biến phân phối không chuẩn). Biến phân loại được trình bày dưới dạng số (%). Sự khác biệt giữa các nhóm về kết quả chính và phụ được phân tích bằng thử nghiệm chính xác của Fisher (các biến phân loại), được báo cáo là các giá trị rủi ro tương đối (RR) và khoảng tin cậy (CI) 95%. Giá trị $p < 0,05$ là được xem là có ý nghĩa thống kê cho tất cả các thử nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dân số nghiên cứu

Từ ngày 9/11/2023 đến ngày 22/5/2024, tổng cộng 20 bệnh nhân mắc PCOS đã được tham gia vào nghiên cứu (tuổi trung bình $31,4 \pm 3,2$ tuổi, chỉ số khối cơ thể trung bình $22,6 \pm 2,5$ kg/m²). Thời gian vô sinh trung bình là 2 năm, tất cả bệnh nhân đều thực hiện CAPA-IVM lần đầu và 3/4 là vô sinh nguyên phát. Tổng cộng có 554 COCs được thu nhận (276 ở nhóm oxy thấp và 278 ở nhóm oxy khí quyển).

Kết quả noãn trưởng thành và phôi học

Khi được phân tích theo COCs, số lượng noãn trưởng thành và số lượng noãn thụ tinh 2PN thấp hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm nồng độ oxy thấp so với nhóm nồng độ oxy khí quyển. Số lượng phôi nang, phôi nang tốt và phôi nang đông lạnh cũng thấp hơn ở nhóm oxy thấp, nhưng sự khác biệt so với nhóm oxy khí quyển không đạt ý nghĩa thống kê (Bảng 1). Những kết quả tương tự cũng đạt được khi dữ liệu được phân tích trên cơ sở từng bệnh nhân (Bảng 2).

Bảng 1. Kết quả phôi học trên từng phức hợp noãn-cumulus (COCs)

Đặc điểm	5% O ₂ (N = 276)	20% O ₂ (N = 278)	RR (95% CI)	P-value
Noãn trưởng thành, n (%)	148 (53,6)	183 (65,8)	0,81 (0,71-0,94)	0,004
Noãn thụ tinh 2PN, n (%)	91 (33)	133 (47,8)	0,69 (0,56-0,85)	<0,001
Phôi nang, n (%)	31 (11,2)	46 (16,5)	0,68 (0,44-1,04)	0,07
Phôi nang tốt, n (%)	8 (2,9)	14 (5)	0,58 (0,25-1,35)	0,2
Phôi nang đông lạnh, n (%)	31 (11,2)	46 (16,5)	0,68 (0,44-1,04)	0,07

Từ viết tắt: CI, confidence interval; RR, relative risk.

Bảng 2. Kết quả phôi học trên mỗi bệnh nhân

Đặc điểm	5% O ₂ (N = 20)	20% O ₂ (N = 20)	P-value
Phức hợp noãn-cumulus	14 [12; 16]	14 [11; 16]	0,902
Số lượng noãn trưởng thành	8 [6; 9]	9 [7; 11]	0,058
Tỷ lệ noãn trưởng thành, %	57,3 [45,0;64,4]	67,7 [57,5;78,1]	0,029

CÔNG NGHỆ SINH HỌC Y DƯỢC

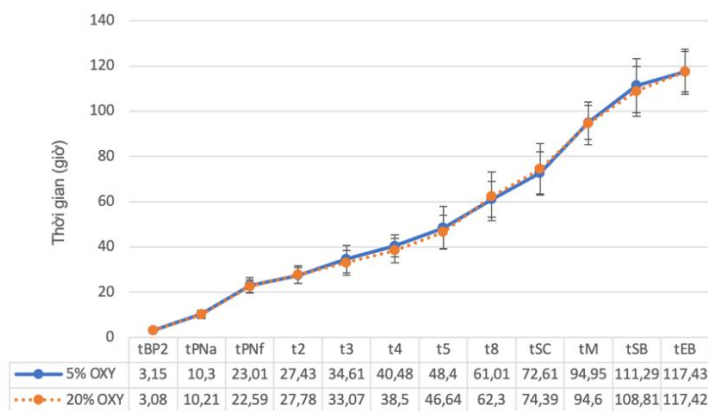
Noãn thụ tinh 2PN	4 [3; 6]	7 [4; 9]	0,036
Phôi nang	2 [1; 2]	2[1; 3]	0,357
Phôi nang tốt	0 [0; 1]	1[0; 1]	0,121
Không phôi ^a , n (%)	4 (20,0)	3 (15,0)	0,680
Phôi nang đông lạnh	2 [1; 2]	2 [1; 3]	0,357

Giá trị: trung vị [tứ phân vị 1; tứ phân vị 3], hoặc số lượng bệnh nhân (%).

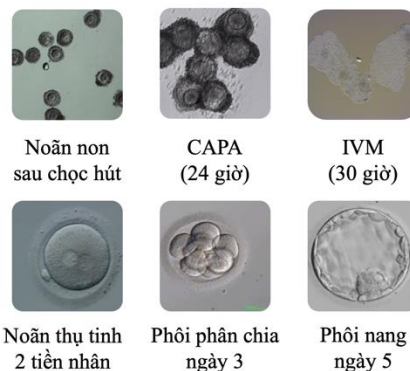
^aSố bệnh nhân không có phôi nang ở mỗi nhóm, trong đó có 2 bệnh nhân không có phôi nang để chuyển ở cả hai nhóm.

Kết quả động học phát triển phôi CAPA-IVM ở 2 nhóm điều kiện nuôi cấy

Các thông số động học phát triển phôi là tương đương nhau khi nuôi cấy CAPA-IVM ở 2 nhóm nồng độ oxy (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn và $P > 0,05$) (Hình 2). Ngoài ra, tỷ lệ phôi nang có phân chia trực tiếp DC1 (29,03% so với 21,74%) và DC2 (6,45% so với 8,70%) là tương đương nhau giữa 2 nhóm nồng độ oxy thấp và nồng độ oxy khí quyển với $P < 0,05$.



Hình 2. Đồ thị động học phát triển phôi CAPA-IVM



Hình 3. Quá trình phát triển noãn non CAPA-IVM, sự thụ tinh và phát triển phôi

Kết quả lâm sàng

Trong số 20 bệnh nhân PCOS, có 16 bệnh nhân được chuyển phôi đông lạnh. Một bệnh nhân yêu cầu chuyển 2 phôi nang (một phôi nang từ nồng độ oxy thấp và một phôi nang từ nồng độ oxy trong khí quyển), do đó đã bị loại khỏi phân tích. Tổng cộng có 15 bệnh nhân chuyển đơn phôi nang được phân tích trong nghiên cứu, trong đó 6 người ở nhóm oxy thấp và 9 ở nhóm oxy khí quyển. Tỷ lệ thử thai sinh hoá, thai lâm sàng, thai diễn tiến và các kết quả về khả năng sinh sản khác biệt đáng kể giữa hai nhóm (Bảng 3).

Bảng 3. Kết quả lâm sàng sau lần chuyển phôi trữ đầu tiên

Kết quả	5% O ₂ (n=6)	20% O ₂ (n=9)	P-value
Chất lượng phôi nang			0,01
Phôi nang loại tốt	2 (33,3)	9 (100,0)	
Phôi nang loại xấu	4 (66,7)	0 (0,0)	
Thai sinh hoá	3 (50,0)	7 (77,8)	0,58
Thai lâm sàng	3 (50,0)	5 (55,6)	0,95
Thai diễn tiến	2 (33,3)	5 (55,6)	0,75
Tỷ lệ phôi làm tổ	60,0 $\pm$ 54,8	50 $\pm$ 52,7	0,75
Thai lưu <12 tuần	1 (16,7)	0 (0,0)	-
Thai ngoài tử cung	0 (0,0)	0 (0,0)	-
Đa thai	0 (0,0)	0 (0,0)	-

Giá trị: trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn hoặc số lượng bệnh nhân (%).

Thảo luận

Trong nghiên cứu thí điểm này với những bệnh nhân PCOS, việc sử dụng nồng độ oxy thấp (5%) cho hệ thống nuôi cấy CAPA-IVM đã làm giảm đáng kể khả năng trưởng thành của noãn so với nồng độ oxy khí quyển (20%).

Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ oxy thấp trong CAPA-IVM không cải thiện khả năng trưởng thành noãn ở bệnh nhân PCOS. Những phát hiện này hỗ trợ cho thực tiễn áp dụng nồng độ oxy khí quyển trong cả hai bước của quy trình CAPA-IVM hiện tại và cung cấp bằng chứng bổ sung để giúp tối ưu hóa hệ thống nuôi cấy CAPA-IVM.

Đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá tác động của nồng độ oxy lên sự trưởng thành COCs trong hệ thống CAPA-IVM trên người. Trong nghiên cứu có liên quan (Akin *et al.*, 2023), nồng độ oxy thấp trong giai đoạn CAPA có ảnh hưởng đến sự trưởng thành của COCs chuột. Trong nghiên cứu này, COCs chuột được nuôi cấy với 5% oxy trong giai đoạn CAPA, tiếp theo là 20% oxy trong giai đoạn IVM. Không có sự khác biệt về tỷ lệ noãn trưởng thành, đường kính noãn, tỷ lệ phân chia ngày 2 hoặc tỷ lệ phôi nang giữa các nhóm nuôi cấy CAPA với nồng độ oxy 5% hoặc 20%. Tuy nhiên, các noãn non (Germinal vesicle-GV) từ COCs được nuôi cấy trong điều kiện oxy thấp so với oxy khí quyển trong bước CAPA cho thấy cấu hình hô hấp của ty thể gần với cấu hình hô hấp của ty thể từ noãn GV-COCs *in vivo* hơn. Nghiên cứu hiện tại của chúng tôi nhằm mục đích nuôi cấy cả hai bước CAPA-IVM ở nồng độ oxy thấp, phù hợp với xu hướng gần đây trong các hệ thống nuôi cấy phôi thiên về mức oxy thấp hơn (~5%). Lý do cơ bản thực hiện nghiên cứu là sử dụng cùng điều kiện oxy cho cả nuôi cấy phôi và noãn *in vitro*, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho việc xây dựng hệ thống tủ nuôi cấy phôi sử dụng phương pháp CAPA-IVM. Điều này có nghĩa là nồng độ oxy 5% được áp dụng cho cả bước CAPA và IVM. Tuy nhiên, cách tiếp cận này có tác động tiêu cực đến hiệu quả trưởng thành noãn và tiềm năng phát triển phôi nang. Vai trò của nồng độ oxy trong từng giai đoạn của hệ thống CAPA-IVM vẫn chưa được hiểu rõ và có ít bằng chứng giải thích tại sao nồng độ oxy thấp dường như không hiệu quả khi nuôi cấy IVM của COCs trên người, trái ngược với sinh lý tự nhiên (Whitty *et al.*, 2021). Tuy nhiên, dữ liệu của chúng tôi và những phát hiện của Akin và cộng sự có thể chỉ ra rằng việc giảm nồng độ oxy chỉ ở bước CAPA có thể là một chiến lược nuôi cấy đầy hứa hẹn cho CAPA-IVM (Akin *et al.*, 2023).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vai trò quan trọng của nồng độ oxy đối với hiệu quả của IVM tiêu chuẩn. Hầu hết các nghiên cứu đều dựa trên mô hình động vật và kết quả vẫn còn gây tranh cãi. Nghiên cứu trên chuột cho thấy không có sự khác biệt về khả năng trưởng thành noãn, thụ tinh và tạo phôi ở điều kiện nồng độ oxy thấp trong IVM, nhưng tổng số tế bào phôi nang cao hơn đã được ghi nhận. Tế bào trứng của bò và lợn cho thấy tiềm năng phát triển tốt hơn khi chúng được nuôi cấy trong điều kiện oxy thấp. Cũng có nghiên cứu cho thấy sự hình thành phôi nang tốt hơn khi noãn được nuôi cấy IVM trong điều kiện oxy khí quyển. Sự khác biệt quan sát được có thể là do việc sử dụng các môi trường nuôi cấy và hệ thống IVM khác nhau.

Nghiên cứu hiện tại sử dụng phác đồ không có FSH dành cho bệnh nhân mắc PCOS trong chu kỳ CAPA-IVM dựa trên kết quả của một thử nghiệm lâm sàng được thực hiện tại trung tâm của chúng tôi (NCT05600972). Theo đó, bệnh nhân không cần sử dụng liều gonadotropin nào (so với 2-3 liều trong các nghiên cứu đã công bố (Sanchez *et al.*, 2019; Vuong *et al.*, 2020)). Vai trò của mỗi FSH (Follicle Stimulating Hormone) trong CAPA-IVM vẫn chưa rõ ràng. Tuy nhiên, phác đồ không có FSH có thể ngăn ngừa tác dụng phụ, an toàn cho bệnh nhân và góp phần tiết kiệm chi phí. Trong nghiên cứu này, thời gian trung bình từ ngày kinh cuối cùng đến ngày chọc hút là 3,5 [2,8; 5,5] ngày.

Nghiên cứu của chúng tôi đã báo cáo các kết quả lâm sàng tương đương sau chu kỳ FET đơn phôi nang đầu tiên từ nhóm oxy thấp và oxy khí quyển (Bảng 3). Tuy nhiên, cỡ mẫu nhỏ và sự sắp xếp chuyển phôi không đồng đều giữa hai nhóm khó đưa ra bất kỳ kết luận chắc chắn nào về kết quả lâm sàng. Mặc dù số lượng phôi nang cao hơn ở nhóm oxy khí quyển so với nhóm oxy thấp, nhưng sự khác biệt giữa các nhóm không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ thai lâm sàng tương đương ở nhóm oxy thấp và nhóm oxy khí quyển (50,0% và 55,6% với $P = 0,95$) và không có trường hợp đa thai.

Điểm mạnh của nghiên cứu là việc sử dụng cùng loại tủ cấy cho cả hai nhóm và hệ thống cung cấp khí sử dụng khí trộn thương mại với nồng độ khí chính xác, được nhà sản xuất và phòng thí nghiệm xác nhận về chất lượng. Điều này đảm bảo mức oxy đồng nhất trong suốt nghiên cứu. Hơn nữa, COCs được nuôi cấy trong các buồng riêng biệt của tủ cấy sẽ giảm thiểu khả năng dao động về nhiệt độ và nồng độ khí. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng có một số hạn chế: thứ nhất, cỡ mẫu tương đối nhỏ và chỉ bao gồm dân số Việt Nam; thứ hai, nghiên cứu tập trung vào bệnh nhân mắc PCOS và do đó cần thận trọng khi ngoại suy kết quả cho các nhóm bệnh nhân khác. Cuối cùng, nghiên cứu này không bao gồm phân tích quá trình chuyển hóa glucose hoặc hô hấp ty thể của COCs trong quy trình CAPA-IVM, vì điều này có thể cung cấp những hiểu biết có giá trị về các cơ chế phân tử ảnh hưởng đến sự trưởng thành noãn.

KẾT LUẬN

Việc sử dụng nồng độ oxy thấp (5%) trong cả hai bước của CAPA-IVM làm giảm số lượng noãn trưởng thành và noãn thụ tinh 2PN so với nồng độ oxy khí quyển (20%). Hiện tại, hệ thống nuôi cấy CAPA-IVM vẫn nên sử dụng nồng độ oxy khí quyển và cần có nghiên cứu sâu hơn để xác định nồng độ oxy tối ưu cho từng giai đoạn của CAPA-IVM.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin cảm ơn các nhân viên tại Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận đã hỗ trợ thu thập dữ liệu. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia Việt Nam (NAFOSTED) theo số tài trợ FWO.108-2022.01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akin N, Le AH, Ha UD, Romero S, Sanchez F, Pham TD, Nguyen MH, Anckaert E, Ho TM, Smitz JJHR (2022) Positive effects of amphiregulin on human oocyte maturation and its molecular drivers in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 37: (1) 30-43.
- Akin N, Ates G, von Mengden L, Herta A-C, Meriggioli C, Billooye K, Stocker WA, Ghesquiere B, Harrison CA, Cools W (2023) Effects of lactate, super-GDF9, and low oxygen tension during bi-phasic *in vitro* maturation on the bioenergetic profiles of mouse cumulus–oocyte complex. *Biol Reprod* 109: (4) 432-449.
- Brinsden P, Wada I, Tan SL, Balen A, Jacobs HSBjoo, gynaecology (1995) Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Brit J Obs Gynaecol* 102: (10) 767-772.
- Das M, Son WY, Buckett W, Tulandi T, Holzer H (2014) *In-vitro* maturation versus IVF with GnRH antagonist for women with polycystic ovary syndrome: treatment outcome and rates of ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod BioMed Onl* 29: (5) 545-551.
- Edwards RG (1965) Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *The Lancet* 286: (7419) 926-929.
- Group REASPCW (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 19: (1) 41-47.
- Paulson RJ, Fauser BC, Vuong LT, Doody K (2016) Can we modify assisted reproductive technology practice to broaden reproductive care access? *Fert Ster* 105: (5) 1138-1143.
- Sanchez F, Le AH, Ho VN, Romero S, Van Ranst H, De Vos M, Gilchrist RB, Ho TM, Vuong LN, Smitz JJJoar, genetics (2019) Biphasic in vitro maturation (CAPA-IVM) specifically improves the developmental capacity of oocytes from small antral follicles. *J Assis Reprod Genet* 36: 2135-2144.
- Teede HJ, Tay CT, Laven JJ, Dokras A, Moran LJ, Piltonen TT, Costello MF, Boivin J, Redman LM, Boyle JA (2023) Recommendations from the 2023 international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 189: (2) G43-G64.
- Vuong LN, Ho TM, Gilchrist RB, Smitz J (2019) The place of *in vitro* maturation in assisted reproductive technology. *Fert Reprod* 1: (01) 11-15.
- Vuong LN, Ho VN, Ho TM, Dang VQ, Phung TH, Giang NH, Le AH, Pham TD, Wang R, Smitz J (2020) *In-vitro* maturation of oocytes versus conventional IVF in women with infertility and a high antral follicle count: a randomized non-inferiority controlled trial. *Hum Reprod* 35: (11) 2537-2547.
- Whitty A, Kind KL, Dunning KR, Thompson JG (2021) Effect of oxygen and glucose availability during in vitro maturation of bovine oocytes on development and gene expression. *J Ass Reprod Genet* 38: (6) 1349-1362.

IMPACT OF LOW VERSUS AIR OXYGEN TENSION ON OOCYTE MATURATION DURING BIPHASIC IVM IN PCOS: A SIBLING OOCYTE PILOT STUDY

Tran Quoc Viet^{1,3*}, Pham Hoang Huy^{1,3}, Le Hoang Anh^{1,3}, Pham Duong Toan³, Nguyen Le Duy³, Vu Thi Lan Anh³, Le Long Ho^{1,3}, Le Khắc Tiến^{1,3}, Ho Manh Tuong^{2,3}, Vương Thị Ngọc Lan⁴

¹IVMFD Phu Nhuan, My Duc Phu Nhuan Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam

²IVFMD, My Duc Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam

³HOPE Research Center, My Duc Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

SUMMARY

In vitro maturation (IVM) is an alternative assisted reproductive technology that minimizes hormone-related side effects and treatment burden for patients. Capacitation-IVM (CAPA-IVM), a biphasic IVM system, improves the competence of oocytes matured *in vitro*. The current CAPA-IVM culture operates under air oxygen concentration, but it is important to understand the impact of oxygen tension on oocyte maturation because it remains unclear whether the maturation process aligns with *in vivo* conditions. This study investigated the effectiveness of using low oxygen tension for both steps of CAPA-IVM culture. Cumulus-oocyte complexes (COCs) recruited from 20 women with polycystic ovary syndrome (PCOS) were allocated into two groups and underwent CAPA-IVM culture with low oxygen tension (5%) or air oxygen tension (20%). Cultivation of COCs took place in two benchtop incubators, each equipped with commercial mix-gas bottles to establish the respective oxygen conditions. The number of matured oocytes and the number of 2-pronuclei fertilized oocytes were significantly lower when COCs were cultured under low versus air oxygen tension during the two steps of biphasic CAPA-IVM. This is the first study to report the impact of low oxygen tension on the *in vitro* maturation of human COCs in a biphasic CAPA-IVM system. Air oxygen tension should be chosen for human COCs maturation in the CAPA-IVM approach.

Keywords: CAPA-IVM, cumulus-oocyte complex, *in vitro* maturation, oxygen tension, Polycystic Ovary Syndrome-PCOS.

* Author for correspondence: Tel: 0966050928; Email: viet.tq@myduchospital.vn

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG BỘ TOPSENSI®STD-12 qPCR KIT VÀ ỨNG DỤNG TRONG ĐÁNH GIÁ SỰ ĐỒNG NHIỄM HPV VỚI STD TRÊN MẪU XÉT NGHIỆM HPV

Phan Thị Ngọc Diễm, Nguyễn Duy Khánh, Đỗ Ngọc Diễm Trúc, Trương Gia Hưng, Mai Hoàng Khánh Chi

Công ty TNHH Giải pháp Y sinh ABT – Chi nhánh Long Hậu, Việt Nam

TÓM TẮT

Bệnh lây truyền qua đường tình dục là vấn đề sức khỏe được quan tâm trên thế giới. Việc tìm ra phương pháp xác định tác nhân gây bệnh sinh dục đạt chất lượng tốt với chi phí hợp lý đóng vai trò quan trọng trong hỗ trợ chẩn đoán, điều trị và phòng ngừa các bệnh sinh dục, góp phần bảo vệ sức khỏe cộng đồng, giảm các gánh nặng y tế liên quan. Nhóm nghiên cứu thực hiện đánh giá chất lượng bộ kit phát hiện 12 tác nhân lây truyền qua đường tình dục phổ biến được sản xuất tại Việt Nam bằng phương pháp realtime PCR, TopSENSI® STD-12 qPCR Kit (ABT) và ứng dụng trong đánh giá sự đồng nhiễm STD với HPV. Bộ kit cho hiệu quả chẩn đoán tương đương với kit có cùng mục đích sử dụng của nước ngoài (CE-IVD). Kết quả ghi nhận 10/12 tác nhân mục tiêu có tỷ lệ phần trăm nhất quán tổng thể trên 90%; tỷ lệ phần trăm nhất quán tổng thể theo từng mẫu xét nghiệm giữa kit ABT và kit đối chứng là 91,46% (95%CI*: 84,17% đến 96,12%) với tỷ lệ phần trăm nhất quán dương tính là 93,15 % (95%CI*: 84,74% đến 97,74%). Ngoài ra, nghiên cứu này cũng đóng góp thêm thông tin về mức độ đồng nhiễm HPV với STD vào cơ sở dữ liệu lâm sàng cùng với các nghiên cứu trước đó. Thông qua phân tích thống kê chi bình phương ghi nhận mối tương quan chặt chẽ giữa HPV và các tác nhân lây truyền qua đường tình dục với giá trị $\chi^2 = 8,547$ ($p = 0,003$), nghiên cứu cũng ghi nhận rằng *Gardnerella vaginalis* là tác nhân có tần suất xuất hiện nhiều nhất (39,82%), tiếp theo là *Ureaplasma parvum* (25,66%) và *Candida albicans* (15,34%). Điều này có thể do tính chất và nguồn gốc lây truyền giống nhau của các tác nhân; đồng thời, đặc điểm sinh hoạt và đời sống ở khu vực thu mẫu có thể là nguyên nhân tích lũy nhiều mầm bệnh.

Từ khóa: Bệnh lây truyền qua đường tình dục, đồng nhiễm, HPV, realtime PCR, STD, STIs.

MỞ ĐẦU

Bệnh lây truyền qua đường tình dục (STD) hay nhiễm trùng lây truyền qua đường tình dục (STI) là một vấn đề sức khỏe cộng đồng quan trọng trên toàn cầu, ảnh hưởng đến cả nam và nữ ở mọi lứa tuổi. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization - WHO), mỗi ngày có hơn 1 triệu ca nhiễm STD mới ở người trưởng thành trong độ tuổi 15-49 và phần lớn không biểu hiện thành triệu chứng rõ ràng. Hơn 30 tác nhân được xác định có thể là mầm bệnh lây truyền bệnh sinh dục và các cá nhân có thể bị nhiễm nhiều bệnh cùng một lúc (WHO, 2024). Tại Việt Nam, STD cũng là một vấn đề đáng được quan tâm, hệ thống dữ liệu quốc gia về STD còn hạn chế (WHO tại Việt Nam, 2020) nhưng dữ liệu giám sát các chương trình cục bộ vẫn cho thấy tình trạng nhiễm các tác nhân lây truyền qua đường tình dục ngày càng gia tăng, có xu hướng trẻ hóa, đặc biệt ở nhóm đối tượng nam quan hệ tình dục đồng giới và nữ mại dâm. Bệnh lây truyền qua đường tình dục (STD) không chỉ ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe mà còn tiềm ẩn những hậu quả nặng nề về kinh tế và xã hội. Vì vậy, việc nâng cao nhận thức về STD và thực hiện các biện pháp phòng ngừa, tầm soát là vô cùng quan trọng, giúp phát hiện kịp thời, ngăn ngừa lây nhiễm, theo dõi và điều trị hiệu quả.

Hiện nay, có nhiều phương pháp xét nghiệm chẩn đoán STD tiên tiến có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, giúp phát hiện chính xác tác nhân gây bệnh, điển hình trong số đó phải kể đến phương pháp xét nghiệm phân tử realtime PCR, tuy nhiên, chi phí để thực hiện phương pháp xét nghiệm phân tử này còn khá cao, hạn chế khả năng tiếp cận của người bệnh. Việc phát triển và sử dụng rộng rãi các bộ kit xét nghiệm STD chất lượng tốt và giá thành hợp lý sẽ góp phần quan trọng vào việc kiểm soát và phòng ngừa STD.

TopSENSI® STD-12 qPCR Kit là bộ kit xét nghiệm giúp kiểm tra sự hiện diện của 12 tác nhân nguy cơ cao gây bệnh đường sinh dục *Mycoplasma hominis* (MH); *Mycoplasma genitalium* (MG); *Trichomonas vaginalis* (TV); *Ureaplasma parvum* (UP); *Ureaplasma urealyticum* (UU); *Gardnerella vaginalis* (GV); *Human herpesvirus 1* (HSV1); *Human herpesvirus 2* (HSV2); *Treponema pallidum* (TP); *Chlamydia trachomatis* (CHT); *Neisseria gonorrhoeae* (NGN) và *Candida albicans* (CA) trong mẫu dịch phát âm đạo/niệu đạo hoặc sinh thiết cổ tử cung bằng kỹ thuật realtime PCR dựa trên sự hiện diện của gene mục tiêu tương ứng với từng tác nhân. Bộ kit được nghiên cứu và sản xuất bởi Công ty TNHH Giải pháp Y sinh ABT, Việt Nam với chất lượng và chi phí có khả năng cạnh tranh tốt với các bộ kit của nước ngoài, tăng khả năng tiếp cận các sản phẩm “made in Vietnam”, giảm gánh nặng chi phí cho cá nhân, gia đình và hệ thống y tế.

Trong nghiên cứu này, nhóm chúng tôi thực hiện đánh giá hiệu quả chẩn đoán của bộ kit TopSENSI® STD-12 qPCR Kit (ABT, Việt Nam) trên mẫu lâm sàng so với kit đối chứng nước ngoài được chứng nhận CE-IVD. Đồng thời khảo sát tỷ lệ đồng nhiễm giữa HPV và 12 tác nhân nguy cơ cao gây bệnh sinh dục kể trên.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

- Nghiên cứu sử dụng 312 mẫu dịch phết âm đạo cho xét nghiệm HPV được thu thập tại các phòng khám trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh được chia ra làm 2 đợt đánh giá. Các mẫu trên được lấy ngẫu nhiên và được thu nhận bằng tăm bông.

- Bộ kit tách chiết TopPURE® Maga Genomic DNA/RNA Extraction Kit_HI-612 (ABT, Việt Nam).

- Bộ kit TopSENSI® STD-12 qPCR Kit_SQH-007 (ABT, Việt Nam).

- Bộ kit đối chứng phát hiện tác nhân gây bệnh sinh dục phổ biến được chứng nhận CE-IVD với độ nhạy chuẩn đoán và độ đặc hiệu chuẩn đoán trên 96%: Bộ kit RevoDx Sexually Transmitted Infections (STIs) Pathogen Detection Kit (Idilbiotech, Thổ Nhĩ Kỳ) và Bộ kit Care GENE STD detection kit (Wellsbio, Hàn Quốc, được Bộ Y tế Việt Nam cấp phép lưu hành loại C).

- Bộ TopSENSI® HPV qPCR Kit_SQH-103 và TopSENSI® HPV 6, 11, 16, 18 & High Risk qPCR Kit_SQH-006 (ABT, Việt Nam).

- Hệ thống tinh sạch acid nucleic NPA-32 (Gene Pure Pro) (Bioer, Trung Quốc).

- Máy realtime PCR LineGene 9600 Plus, FQD-96A (Bioer, Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện trong 2 đợt đánh giá:

Đợt 1: Thực hiện đánh giá tương quan giữa bộ kit TopSENSI® STD-12 qPCR Kit với đối chứng Care GENE STD detection kit và RevoDx Sexually Transmitted Infections (STIs) Pathogen Detection Kit trên 100 mẫu dịch phết âm đạo. Ghi nhận kết quả dương tính với từng tác nhân mục tiêu của từng bộ kit. Xác minh hiệu quả chẩn đoán của bộ kit TopSENSI® STD-12 qPCR Kit bằng cách đánh giá độ tương quan về kết quả phát hiện từng tác nhân mục tiêu và tổng thể xét nghiệm của từng mẫu.

Đợt 2: Đánh giá mối liên hệ giữa sự hiện diện của HPV và các tác nhân gây bệnh sinh dục nguy cơ cao khác trên 212 mẫu dịch phết âm đạo.

Phương pháp ly trích DNA

Mẫu dịch phết sau khi lấy bằng tăm bông được sử dụng cho tách chiết bằng cách ngâm và vortex kỹ trong 500 μ L TE 1X. Sau đó, 200 μ L mẫu được sử dụng cho tách chiết DNA theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit TopPURE® Maga Genomic DNA/RNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam). Bộ kit sử dụng phương pháp tách chiết từ tự động với nguyên lý hoạt động dựa vào liên kết chọn lọc giữa hạt từ với nucleic axit (Berensmeier S., 2006). Cuối cùng, axit nucleic tinh sạch được thu nhận và bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các đánh giá realtime PCR.

Xét nghiệm DNA HPV

Xét nghiệm DNA HPV được thực hiện theo quy trình của bộ kit TopSENSI® HPV qPCR Kit và TopSENSI® HPV 6, 11, 16, 18 & High Risk qPCR Kit (ABT, Việt Nam) nhằm phát hiện tuýp nguy cơ cao và tuýp 06, 11. Bộ kit sử dụng kỹ thuật realtime PCR với công nghệ Taqman probe (mẫu dò Taqman) để khuếch đại và phát hiện DNA mục tiêu (John J. O'Leary et al., 2003).

Xét nghiệm DNA của STD

212 mẫu sử dụng cho xét nghiệm HPV-DNA, sau đó tiếp tục được đánh giá với bộ kit TopSENSI® STD-12 qPCR Kit (ATB, Việt Nam) để xác định tác nhân gây bệnh sinh dục. 12 tác nhân bao gồm: *Mycoplasma hominis* (MH); *Mycoplasma genitalium* (MG); *Trichomonas vaginalis* (TV); *Ureaplasma parvum* (UP); *Ureaplasma urealyticum* (UU); *Gardnerella vaginalis* (GV); *Human herpesvirus 1* (HSV1); *Human herpesvirus 2* (HSV2); *Treponema pallidum* (TP); *Chlamydia trachomatis* (CHT); *Neisseria gonorrhoeae* (NGN) và *Candida albicans* (CA). Các điều kiện PCR của bộ kit như sau: 1 chu kỳ: 37°C trong 2 phút, 95°C trong 30 giây; 45 chu kỳ 95°C trong 10 giây, 60°C trong 30 giây.

Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm IBM®SPSS® Statistics 22.0 x 64 bit phân tích chi bình phương và Fisher's exact để đánh giá thống kê mối liên hệ giữa các tác nhân mục tiêu với $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê. Đồng thời sử dụng phần mềm phân tích MedCalc Version 22.026 để đánh giá tương quan giữa chất lượng bộ kit phát hiện tác nhân

gây bệnh sinh dục phổ biến của ABT so với kit đối chứng sản xuất bởi nước ngoài. Tất cả các phương pháp thống kê được coi là có ý nghĩa với mức độ tin cậy 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá tương quan TopSENSI® STD-12 qPCR Kit với bộ kit STD khác trên thị trường

Thực hiện đánh giá tương quan bộ kit TopSENSI® STD-12 qPCR được nghiên cứu và sản xuất tại Việt Nam với các bộ kit đối chứng của nước ngoài, trong 100 mẫu phết âm đạo được đánh giá ở đợt 1 của nghiên cứu, ghi nhận dương tính với sự hiện diện của 11/12 tác nhân mục tiêu mà bộ kit hướng tới, ngoại trừ *T. pallidum*. Theo Cục Y tế Dự phòng, *T. pallidum* không thể tồn tại lâu dài bên ngoài cơ thể con người và thường xuất hiện với tỉ lệ cao ở nam giới (Torrone *et al.*, 2019). Nghiên cứu này thực hiện trên mẫu phết âm đạo của nữ, nên trong số mẫu thu nhận của đánh giá này không có sự hiện diện của *T. pallidum* cũng là điều hợp lý. Dựa vào kết quả phát hiện tác nhân gây bệnh qua đường tình dục của bộ kit ABT so với kit đối chứng nhằm xác nhận chất lượng và giá trị sử dụng của bộ kit TopSENSI® STD-12 qPCR Kit.

Đa số các kết quả xét nghiệm bởi kit ABT và kit đối chứng trên tác nhân mục tiêu đều ghi nhận tính nhất quán cao, tỷ lệ phần trăm nhất quán dương tính, âm tính và tổng thể đều trên 90% (Bảng 1). Riêng đối với tác nhân *T. vaginalis* và *C. albicans* tỷ lệ phần trăm nhất quán tổng thể lần lượt là 86,37% (95%CI: 78,06% to 92,42%) và 82,24% (95%CI: 73,32% to 89,16%)

Bảng 1. Phân tích tính nhất quán của kết quả xét nghiệm kit ABT và kit đối chứng theo tác nhân mục tiêu

Tác nhân \ Tiêu chí	Tỷ lệ phần trăm nhất quán dương tính	Tỷ lệ phần trăm nhất quán âm tính	Tỷ lệ phần trăm nhất quán tổng thể
<i>M. hominis</i>	100% 95%CI*: 86,77% to 100,00%	94,59% 95%CI: 86,73% to 98,51%	97,73% 95%CI: 95,85% to 100,00%
<i>M. genitalium</i>	100% 95%CI: 63,06% to 100,00%	96,74% 95%CI: 90,77% to 99,32%	99,84% 95%CI: 96,05% to 100,00%
<i>T. vaginalis</i>	85,71% 95%CI: 42,13% to 99,64%	98,92% 95%CI: 94,15% to 99,97%	86,37% 95%CI: 78,06% to 92,42%
<i>U. parvum</i>	90,70% 95%CI: 77,86% to 97,41%	98,25% 95%CI: 90,61% to 99,96%	91,08% 95%CI: 83,69% to 95,85%
<i>U. urealyticum</i>	100,00% 95%CI: 79,41% to 100,00%	98,81% 95%CI: 93,54% to 99,97%	99,94% 95%CI: 96,38% to 100,00%
<i>G. vaginalis</i>	93,94% 95%CI: 85,20% to 98,32%	94,12% 95%CI: 80,32% to 99,28%	93,95% 95%CI: 87,33% to 97,73%
<i>C. trachomatis</i>	100,00% 95%CI: 71,51% to 100,00%	100,00% 95%CI: 95,94% to 100,00%	100,00% 95%CI: 96,38% to 100,00%
<i>N. gonorrhoeae</i>	100,00% 95%CI: 15,81% to 100,00%	100,00% 95%CI: 96,31% to 100,00%	100,00% 95%CI: 96,38% to 100,00%
<i>C. albicans</i>	81,40% 95%CI: 66,60% to 91,61%	98,25% 95%CI: 90,61% to 99,96%	82,24% 95%CI: 73,32% to 89,16%
<i>HSV1</i>	100,00% 95%CI: 2,50% to 100,00%	100,00% 95%CI: 2,50% to 100,00%	100,00% 95%CI: 96,38% to 100,00%
<i>HSV2</i>	100,00% 95%CI: 39,76% to 100,00%	100,00% 95%CI: 96,23% to 100,00%	100,00% 95%CI: 96,38% to 100,00%
<i>T. pallidum</i>	-	-	-

Chú thích: *95%CI là Khoảng tin cậy 95%. Tỷ lệ nhất quán tổng thể nằm trong khoảng từ 0% đến 100%.

Dựa trên kết quả so sánh từng mẫu xét nghiệm giữa bộ kit ABT và bộ kit đối chứng cho thấy sự tương đồng cao về khả năng chẩn đoán. Cụ thể, hai bộ kit cho kết quả trùng khớp nhau ở 84% số mẫu xét nghiệm. Khi đánh giá chung về độ chính xác, bộ kit ABT đạt tỉ lệ nhất quán là 91,46% (95%CI*: 84,17% đến 96,12%) so với bộ kit đối chứng, trong đó tỷ lệ nhất quán dương tính đạt 93,15 % (95%CI*: 84,74% đến 97,74%). Điều này cho thấy bộ kit ABT có độ tin cậy cao trong việc phát hiện các tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, tỷ lệ nhất quán âm tính ghi nhận chỉ đạt 59,26% (95%CI*: 38,80% đến 77,61%) (Bảng 2), dữ liệu này cần được xem xét kỹ hơn trong phần đánh giá bên dưới.

Bảng 2. Bảng so sánh kết quả xét nghiệm tổng thể của kit ABT và kit đối chứng theo từng mẫu

Xét nghiệm	Kit đối chứng		Tổng
	Dương tính	Âm tính	
Kit ABT	Dương tính	TP = 68	FP = 11
	Âm tính	FN = 5	TN = 16
Tổng	TP+FN = 73	FP+TN = 27	N = 100

Trong đó: **TP**: Bộ kit ABT cho kết quả dương tính trùng khớp tất cả các tác nhân với ít nhất 1 trong 2 bộ kit đối chứng; **TN**: Bộ kit ABT cho kết quả âm tính trùng khớp với cả 2 bộ kit đối chứng; **FP**: Bộ kit ABT cho kết quả dương tính không trùng khớp giữa các bộ kit do kit ABT phát hiện nhiều hơn đối chứng ít nhất 1 tác nhân, tập trung vào *G. vaginalis*, *U. parvum*, *U. urealyticum* và *M. genitalium*. Để kiểm chứng lại độ đặc hiệu của bộ kit ABT, chúng tôi tiến hành lựa chọn mẫu có kết quả trùng khớp giữa các bộ kit, sau đó thực hiện pha loãng mẫu trong TE1X. Các mẫu pha loãng được tiến hành chạy phản ứng realtime PCR với từng bộ kit nhằm ghi nhận khả năng phát hiện mục tiêu. Kết quả ghi nhận được đối với các mẫu DNA pha loãng chạy cùng kit ABT vẫn cho tín hiệu dương tính đối với các đối tượng *G. vaginalis*, *U. parvum*, *U. urealyticum* và *M. genitalium* ở nồng độ DNA thấp nhưng không ghi nhận tín hiệu ở kit đối chứng. Kết quả trên là căn cứ củng cố cho giả thuyết về nguyên nhân kit ABT phát hiện được nhiều mẫu dương hơn kit đối chứng ở một số tác nhân là do độ nhạy (giới hạn phát hiện) của bộ kit. Tuy nhiên, đối với *C. albicans*, khả năng phát hiện ở kit đối chứng tốt hơn so với kit ABT khi có một số mẫu *C. albicans* dương tính với kit đối chứng mà kit ABT không phát hiện được. Như vậy, nhìn chung, hiệu quả sử dụng của kit ABT kit là tương đối tốt với độ chính xác cao.

Các mẫu sai lệch kết quả giữa kit ABT so với đối chứng phần lớn là mẫu có tín hiệu phát hiện ở Ct trễ (sau chu kỳ 30), điều này có thể do giới hạn phát hiện của các bộ kit là khác nhau, từ đó dẫn đến sai khác khi phân tích kết quả ở những mẫu có nồng độ mục tiêu thấp. 6 trong 11 mẫu cho kết quả dương tính không trùng khớp giữa các bộ kit do kit ABT phát hiện nhiều hơn đối chứng ít nhất 1 tác nhân, tập trung vào *G. vaginalis*, *U. parvum*, *U. urealyticum* và *M. genitalium*. Để kiểm chứng lại độ đặc hiệu của bộ kit ABT, chúng tôi tiến hành lựa chọn mẫu có kết quả trùng khớp giữa các bộ kit, sau đó thực hiện pha loãng mẫu trong TE1X. Các mẫu pha loãng được tiến hành chạy phản ứng realtime PCR với từng bộ kit nhằm ghi nhận khả năng phát hiện mục tiêu. Kết quả ghi nhận được đối với các mẫu DNA pha loãng chạy cùng kit ABT vẫn cho tín hiệu dương tính đối với các đối tượng *G. vaginalis*, *U. parvum*, *U. urealyticum* và *M. genitalium* ở nồng độ DNA thấp nhưng không ghi nhận tín hiệu ở kit đối chứng. Kết quả trên là căn cứ củng cố cho giả thuyết về nguyên nhân kit ABT phát hiện được nhiều mẫu dương hơn kit đối chứng ở một số tác nhân là do độ nhạy (giới hạn phát hiện) của bộ kit. Tuy nhiên, đối với *C. albicans*, khả năng phát hiện ở kit đối chứng tốt hơn so với kit ABT khi có một số mẫu *C. albicans* dương tính với kit đối chứng mà kit ABT không phát hiện được. Như vậy, nhìn chung, hiệu quả sử dụng của kit ABT kit là tương đối tốt với độ chính xác cao.

Xét nghiệm chẩn đoán xác định chính xác tác nhân gây bệnh là vô cùng quan trọng, giúp bác sĩ đưa ra chẩn đoán và phác đồ điều trị phù hợp, hiệu quả, tránh nhầm lẫn và điều trị sai các tác nhân gây bệnh có biểu hiện lâm sàng tương đồng, hạn chế tình trạng sử dụng kháng sinh bừa bãi, góp phần bảo tồn hiệu quả của kháng sinh. Xét nghiệm có độ nhạy tốt cho phép phát hiện căn nguyên ở giai đoạn đầu, giúp can thiệp sớm, ngăn ngừa biến chứng và lây truyền cho người khác, góp phần kiểm soát, phòng ngừa dịch bệnh.

Các xét nghiệm chẩn đoán có thể được chia thành ít nhất 3 loại khác nhau: phát hiện trực tiếp, phát hiện thông qua phản ứng của vật chủ hoặc phát hiện chất chuyển hóa. Trong đó, việc phát hiện trực tiếp sự hiện diện của các vi sinh vật mục tiêu thông qua kính hiển vi với sự hỗ trợ của thuốc nhuộm hoặc soi tươi hiện đang là phương pháp chính trong chẩn đoán xác định phát hiện tác nhân gây bệnh gây bệnh sinh dục nguy cơ cao. Mặc dù xét nghiệm trực tiếp có chi phí thấp, dễ dàng thực hiện tại cơ sở y tế, không đòi hỏi sự hỗ trợ của công nghệ cao nhưng hạn chế về độ nhạy, độ đặc hiệu và một số tác nhân gây bệnh khó soi hoặc nhuộm tế bào (HPV, HSV...). Vì vậy, xét nghiệm phân tử, đặc biệt là realtime PCR là phương pháp thay thế tiềm năng trong hỗ trợ chẩn đoán xác định ở những giai đoạn đầu, với nồng độ tác nhân thấp, hiệu quả chẩn đoán cao. Bộ TopSENSI® STD-12 qPCR Kit của ABT, ngoài đạt được chất lượng tốt, tương quan cao về hiệu quả chẩn đoán so với các bộ kit đối chứng được sản xuất bởi nước ngoài và được công nhận tại thị trường châu Âu (CE-IVD), bộ kit còn khắc phục tồn đọng liên quan đến giá thành của phương pháp do được nghiên cứu và sản xuất tại Việt Nam, mang lại nhiều lợi ích lớn về phía cá nhân người bệnh, gia đình và nguồn lực y tế.

Đánh giá sự đồng nhiễm HPV và STD trên mẫu xét nghiệm HPV ở phụ nữ

Tiếp tục triển khai nghiên cứu đợt 2 trên 212 mẫu dịch tiết (n = 212), mẫu được tách chiết thu nhận DNA và tiến hành xét nghiệm định tính DNA-HPV và 12 tác nhân STD, trong đó có 180 mẫu (84,5%) cho tín hiệu dương tính đối với HPV và 172 mẫu (80,8%) cho tín hiệu dương tính đối với ít nhất 1 tác nhân STD. Có 152 mẫu (71,4%) cho kết quả dương tính với HPV và STD; 28 mẫu (13,1%) dương tính với HPV nhưng không cho tín hiệu dương tính với tác nhân nào của STD và 20 (9,4%) mẫu phát hiện dương tính ít nhất với 1 tác nhân STD nhưng âm tính với HPV (Bảng 3).

Bảng 3. Tổng hợp kết quả xét nghiệm HPV và STD

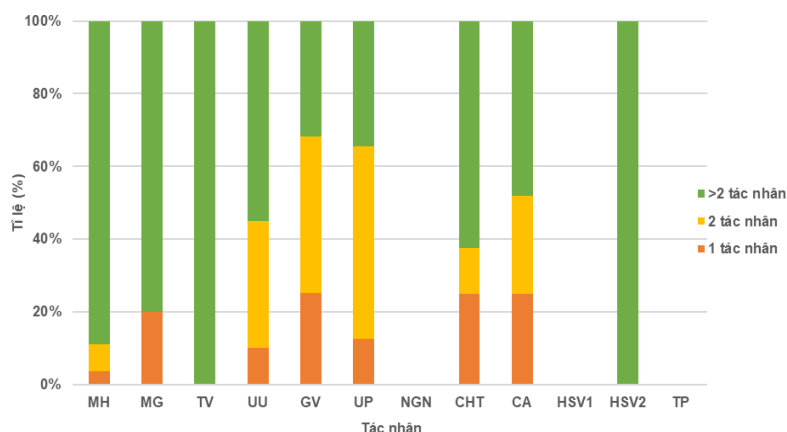
			HPV		Total
			(-)	(+)	
STD (-)	Count		12	28	40
	% of Total		5.7%	13.2%	18.9%
	(+)	Count	20	152	172
	% of Total		9.4%	71.7%	81.1%
Total	Count		32	180	212
	% of Total		15.1%	84.9%	100.0%

Bảng 4. Số mẫu xét nghiệm dương tính/âm tính với từng loại mầm bệnh lây truyền qua đường tình dục STD đợt 2

**Neisseria gonorrhoeae*, *Human herpesvirus 1*, *Treponema pallidum*: không có mẫu dương tính

Tỷ lệ đồng nhiễm khác nhau tùy theo tác nhân lây truyền qua đường tình dục, tỉ lệ đồng nhiễm dao động từ 75% đến 100%. Trong đó, mầm bệnh phổ biến nhất là *Gardnerella vaginalis/Ureaplasma parvum* (23,3%), *Gardnerella vaginalis* (19,8%) (Biểu đồ 1). *M. hominis*, *U. parvum*, *U. urealyticum* có tỷ lệ nhiễm đơn lẻ thấp và tỷ lệ đồng nhiễm cao. Những mẫu nhiễm *M. hominis*, *T. vaginalis*, *HSV2* đều bị đồng nhiễm với hơn hai tác nhân gây bệnh trở lên (Biểu đồ 2).





Biểu đồ 2. Tỷ lệ đồng nhiễm theo từng tác nhân gây bệnh

Dữ liệu của nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả trong các nghiên cứu trước đó. Một nghiên cứu khác của Shipitsyna và đồng tác giả (2020), ghi nhận mối liên hệ đáng kể không phụ thuộc vào độ tuổi giữa viêm âm đạo liên quan đến vi khuẩn gây viêm và sự hiện diện của *M. hominis*, *T. vaginalis* và *C. trachomatis*. Dữ liệu trong nghiên cứu này không ghi nhận trường hợp *N. gonorrhoeae* và *T. pallidum* nào được phát hiện. Điều này phù hợp với loại mẫu được sử dụng cho đánh giá (phết âm đạo ở nữ) và công tác kiểm soát, điều trị hiện tại đã làm giảm tỷ lệ nhiễm các vi sinh vật lây truyền qua đường tình dục liên quan đến lậu và giang mai. Việc nắm bắt được xu hướng đồng nhiễm các tác nhân là tư liệu hữu ích cho xây dựng phát đồ điều trị hiệu quả đa tác nhân, tăng hiệu quả sử dụng thuốc và rút ngắn thời gian chữa trị. Các dữ liệu ghi nhận từ khảo sát tần số xuất hiện và tỷ lệ đồng nhiễm các tác nhân cung cấp thêm thông tin cho các cơ quan dịch tễ hoặc các đơn vị liên quan.

KẾT LUẬN

Bộ kit TopSENSI® STD-12 qPCR Kit (ABT, Việt Nam) đạt chất lượng và hiệu quả phát hiện mục tiêu tương đương với các bộ kit nước ngoài (CE-IVD) có cùng mục đích sử dụng. Trong 100 mẫu lâm sàng được dùng để so sánh giữa các bộ kit xét nghiệm 12 tác nhân nguy cơ cao gây bệnh đường sinh dục đợt 1, 10/12 tác nhân có tỷ lệ phần trăm nhất quán tổng thể trên 90%; tỷ lệ phần trăm nhất quán tổng thể theo sự trùng khớp hoàn toàn theo từng mẫu xét nghiệm (đúng và đủ tất cả tác nhân trong mẫu) giữa kit ABT với kit đối chứng là 91,46% (95%CI*: 84,17% đến 96,12%), trong đó, tỷ lệ phần trăm nhất quán dương tính là 93,15 % (95%CI*: 84,74% đến 97,74%). Những kết quả này chứng minh tiềm năng của Bộ xét nghiệm TopSENSI® STD-12 qPCR (ABT) như một công cụ có giá trị để cải thiện hiệu quả chẩn đoán và phòng ngừa STD. Đồng thời nghiên cứu này cũng đóng góp thêm thông tin về mức độ đồng nhiễm HPV với STD vào cơ sở dữ liệu lâm sàng cùng với các nghiên cứu trước đó. Thông qua phân tích thống kê chi bình phương ghi nhận mối tương quan chặt chẽ giữa HPV và STD với giá trị $\chi^2 = 8,547$ ($p = 0,003$). Ngoài ra, nghiên cứu ghi nhận *Gardnerella vaginalis* là tác nhân có tần suất xuất hiện nhiều nhất (39,82%), tiếp theo là *Ureaplasma parvum* (25,66%) và *Candida albicans* (15,34%). *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* có tỷ lệ nhiễm đơn lẻ thấp và tỷ lệ đồng nhiễm cao. Những mẫu dương tính *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Human herpesvirus 2* đều bị đồng nhiễm với hơn hai tác nhân gây bệnh. Xác suất và tỷ lệ đồng nhiễm tùy thuộc vào tác nhân gây bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Berensmeier S (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(3), 495-504. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0>.
- Cục Y tế Dự phòng (2016). BỆNH GIANG MAI (Syphilis). <https://vncdc.gov.vn/benh-giang-mai-nd14525.html>
- Kairys N, Carlson K, Garg M. Vaginalis G. [Updated 2023 Nov 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.
- O'Leary JJ, Sheils O, Martin C, et al., Crocker J, Murray PG (2003). TaqMan® technology and realtime polymerase chain reaction. *Molecular biology in cellular pathology*. Chichester John Wiley & Sons, Ltd: 251-268.
- Shipitsyna E, Khusnutdinova T, Budilovskaya O, Krysanova A, Shalepo K, Savicheva A, Unemo M (2020). Bacterial vaginosis-associated vaginal microbiota is an age-independent risk factor for Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium and Trichomonas vaginalis infections in low-risk women, St. Petersburg, Russia *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39, 1221–1230.
- Torrone EA, Miller WC (2018). Congenital and Heterosexual Syphilis: Still Part of the Problem. *Sexual Trans Dis*, 45(9S), S20-S22. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000837>
- United Nations Viet Nam (2020). VN032 - National consultant for revision and update of national guidelines on diagnosis and treatment of sexual transmitted infections. <https://vietnam.un.org/en/91238-vn032-national-consultant-revision-and-update-national-guidelines-diagnosis-and-treatment>.

EVALUATION OF THE QUALITY OF THE TOPSENSI®STD-12 qPCR KIT AND ITS APPLICATION IN ASSESSING HPV COINFECTION WITH STD AGENTS IN HPV TEST SAMPLES

Phan Thi Ngoc Diem, Nguyen Duy Khanh*, Do Ngoc Diem Truc, Truong Gia Hung, Mai Hoang Khanh Chi

ABT Biological Solutions Co., Ltd – Long Hau Branch, Vietnam

SUMMARY

Sexually transmitted diseases (STDs) are a health concern worldwide. Thus, finding a method to identify sexually transmitted pathogens that are of good quality and reasonably priced plays an important role in supporting the diagnosis, treatment, and prevention of these diseases. This can contribute to protecting public health and reducing related medical burdens. The research team evaluated the quality of the TopSENSI® STD-12 qPCR Kit (ABT), a Vietnamese-made kit for detecting 12 common sexually transmitted pathogens using realtime PCR, and applied it to assess the co-infection of STDs with HPV. Compared with other foreign kits (CE-IVD) that have the same features and purpose of use, this kit has equivalent quality and diagnostic efficiency. The results show that 10/12 target pathogens have an overall consistency percentage of over 90%; The overall consistency percentage according to the complete match between the ABT kit and the control kit was 91.46% (95%CI*: 84.17% to 96.12%) with the consistent positive percentage according to the test sample was 93.15% (95%CI*: 84.74% to 97.74%). These results demonstrate the potential of the ABT TopSENSI® STD-12 qPCR Kit as a valuable tool for improving STD diagnosis and prevention. Besides, this study also contributed information about the level of co-infection between HPV and STIs to the existing clinical database from previous studies. Through the statistical analysis of chi-square, a strong correlation was recorded between HPV and sexually transmitted agents with a value of $\chi^2 = 8.547$ ($p = 0.003$). In addition, the study recorded that *Gardnerella vaginalis* was the agent with the highest frequency of occurrence (39.82%), followed by *Ureaplasma parvum* (25.66%) and *Candida albicans* (15.34%). The above data may be explained by the similar characteristics and transmission routes of these pathogens, coupled with the diverse and potentially high-risk population sampled.

Keywords: Sexually Transmitted Diseases, co-infection, HPV, realtime PCR, STD, STIs.

* Author for correspondence: Tel: 0938647377; Email: ndkhanh@abt-vn.net

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ XỬ LÝ CỦA CÁC HỆ THỐNG TẾ BÀO HỌC CHẤT LỎNG (LIQUID-BASED CYTOLOGY-LBC) VÀ ỨNG DỤNG CỦA ABT®PAPNICOLAOU STAINING KIT TRONG XÉT NGHIỆM TẾ BÀO HỌC CỔ TỬ CUNG

Trương Gia Hưng, Nguyễn Duy Khánh, Đỗ Ngọc Diễm Trúc, Nguyễn Huỳnh Cẩm Tú*

Công ty TNHH Giải Pháp Y Sinh ABT – chi nhánh Long Hậu, Việt Nam

TÓM TẮT

Tế bào học dựa trên chất lỏng (Liquid-based cytology-LBC) hiện là một kỹ thuật cải tiến quan trọng nhằm nâng cao độ nhạy và độ đặc hiệu trong xét nghiệm tế bào học tầm soát ung thư cổ tử cung. Nghiên cứu tiến hành thu nhận mẫu dịch phết phụ khoa và so sánh hiệu quả xử lý mẫu bằng ba phương pháp LBC khác nhau bao gồm hệ thống phết ly tâm (Cyto-centrifuge Smear Processor), hệ thống hút nén khí kết hợp màng lọc đơn (Liquid-based cytology Smear Processor) và hệ thống màng lọc đôi (HURO PATH®Slide Process). Kết quả cho thấy cả 3 hệ thống đều đảm bảo độ đa dạng và độ chống chéo tế bào không quá 75%. Trong đó, hệ thống màng lọc đôi đã loại bỏ tốt cả tế bào viêm, protein máu và mảnh mô vụn cho hiệu quả tốt nhất trong xử lý tế bào từ mẫu dịch phết phụ khoa. ABT®Papanicolaou Staining Kit được thiết kế cho kỹ thuật nhuộm Pap, với quy trình nhuộm không sử dụng xylene-dung môi độc hại. Kết quả ghi nhận các tế bào phụ khoa khác nhau sau khi nhuộm có thể nhìn rõ nhân và tế bào chất khi quan sát dưới kính hiển vi. Chỉ số giá trị QI trung bình của vết nhuộm khi nhuộm với thuốc nhuộm ABT®Papanicolaou Staining cao hơn thuốc nhuộm thương mại khác ($0,92 \pm 0,16$ so với $0,85 \pm 0,18$). Như vậy, những kết quả ghi nhận từ nghiên cứu này cho thấy công nghệ LBC sử dụng màng lọc đôi kết hợp ABT®Papanicolaou Staining Kit cho hiệu quả tốt trong xét nghiệm tế bào học cổ tử cung và giảm thiểu các yếu tố gây hại đến sức khỏe của kỹ thuật viên thao tác.

Từ khóa: ABT®Papanicolaou Staining Kit, Liquid-based cytology, nhuộm Papanicolaou, tế bào học cổ tử cung, Pap test.

MỞ ĐẦU

Xét nghiệm phết tế bào cổ tử cung (Pap test) được giới thiệu lần đầu bởi George Papanicolaou vào năm 1940 và được ứng dụng rộng rãi sàng lọc sớm ung thư cổ tử cung-một bệnh lý ác tính ở phụ nữ. Thông qua sự bất thường về tỉ lệ nhân/tế bào chất (N/C) của các tế bào lớp biểu mô tổn thương được gây ra bởi *Human papillomavirus* (HPV) ở giai đoạn đầu để sàng lọc sớm các trường hợp có nguy cơ mắc ung thư cổ tử cung. Theo một nghiên cứu của Yang và đồng tác giả (2018) cho thấy sự tầm soát sớm ung thư cổ tử cung giúp giảm 50% tỷ lệ mắc mới giai đoạn đầu và giai đoạn cuối ở trên 100000 phụ nữ trong giai đoạn từ năm 1976 đến 2009. Tuy nhiên, Pap test truyền thống này lại có độ nhạy và độ đặc hiệu thấp do bị ảnh hưởng của sự hiện diện của các yếu tố che lấp từ nền mẫu như các tế bào máu, tế bào viêm, chất nhầy cũng như sự chồng chéo giữa các tế bào lên nhau.

Sự ra đời của phương pháp Pap nhúng dịch (Liquid-based Pap test) vào năm 1950 đã giải quyết các vấn đề của phương pháp truyền thống giúp cải thiện độ nhạy và độ đặc hiệu trong tầm soát sớm ung thư cổ tử cung (Makde *et al.*, 2022). Phương pháp này là sự kết hợp giữa kỹ thuật tế bào học chất lỏng (LBC) và Pap test truyền thống. Mẫu dịch phết sẽ được xử lý trực tiếp trong hỗn hợp dung dịch cồn đậm cho thu nhận tế bào và được phết trực tiếp lên trên lam kính bằng các hệ thống chuẩn bị mẫu dựa trên các công nghệ phết khác nhau. Đầu tiên, công nghệ ly tâm phết tế bào (cytospin), dịch tế bào sau khi thu nhận sẽ được chuyển trực tiếp lên buồng ly tâm và các tế bào sẽ được phết trực tiếp lên trên lam kính nhờ vào lực ly tâm (Khalbuss *et al.*, 2000). Tiếp theo, công nghệ hút nén khí kết hợp màng lọc đơn, các tế bào trong dịch xử lý phết lên lam kính bằng một lực hút áp suất kết hợp với màng lọc đơn để loại bỏ các yếu tố che lấp hiệu quả, đi đầu trong công nghệ này là hệ thống Thinprep-Hologic (Abulafia *et al.*, 2003). Cuối cùng, công nghệ màng lọc đôi, được cải tiến từ màng lọc đơn. Mẫu dịch phết sau khi xử lý sẽ được chuyển lên cốc lọc và được hút xuống bằng lực áp suất không khí đi qua 2 màng lọc giúp tối ưu việc loại bỏ các yếu tố che lấp (Oh *et al.*, 2017). Các công nghệ này đều đã được chứng minh là có hiệu quả tương đương hoặc tốt hơn so với phương pháp phết truyền thống (Zheng *et al.*, 2017; Lien *et al.*, 2022; Ratman *et al.*, 2024).

Bên cạnh việc xử lý mẫu, kỹ thuật nhuộm Papanicolaou (nhuộm Pap) là một phần không thể thiếu trong quy trình xét nghiệm (Chantziantoniou *et al.*, 2017). Đây là một kỹ thuật nhuộm đa sắc được chia thành hai bước chính là nhuộm nhân với Hematoxylin và nhuộm tế bào chất với Ogrange-G (OG) và Eosin Azure (EA). Các tế bào sau

khi nhuộm có thể nhìn thấy rõ nhân và tế bào chất dưới kính hiển vi. Tuy nhiên, một nhược điểm của phương pháp này là các quy trình nhuộm truyền thống quá nhiều bước, thời gian nhuộm dài và sử dụng nhiều dung môi có hại cho sức khỏe người dùng và môi trường như Xylene (Raju *et al.*, 2016). ABT®Papanicolaou Staining Kit được phát triển phục vụ cho kỹ thuật nhuộm Pap với quy trình nhuộm không sử dụng Xylene, ít gây độc hại. Bộ kit đã được Sở Y Tế Long An cấp phép Lưu hành Trang Thiết bị Y tế Loại A với Số công bố là 240000014/PCBA-LA. Do đây là bộ kit được sản xuất và thương mại tại Việt Nam dẫn đến giá thành rẻ góp phần làm giá thành các xét nghiệm sàng lọc sớm ung thư cổ tử cung xuống, tạo điều kiện cho phụ nữ Việt Nam dễ tiếp cận hơn.

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả xử lý của các hệ thống tế bào học chất lỏng (LBC) dựa trên các công nghệ phết khác nhau và đưa ra công nghệ phết tối ưu nhất đối với mẫu dịch phết phụ khoa. Đồng thời, nghiên cứu cũng đánh giá khả năng ứng dụng của ABT®Papanicolaou Staining Kit trên các tế bào có trong nền mẫu dịch phết phụ khoa thông qua khả năng nhuộm và so sánh chất lượng về các thuốc nhuộm thương mại hóa.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chuẩn bị mẫu

Mẫu dịch phết phụ khoa được thu nhận ngẫu nhiên từ các tình nguyện viên tại các cơ sở xét nghiệm trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh theo quy định của Bộ Y tế (Phụ lục 1, Quyết Định 3877/QĐ-BYT 2019). Mẫu sau khi thu nhận được xử lý theo hướng dẫn của bộ kit TopPURE®HPV Pap Smear Collection (ABT, Việt Nam) và được bảo quản ở nhiệt độ phòng 20-25°C trong suốt quá trình nghiên cứu. Các mẫu dịch phết được sử dụng cho các đánh giá trong nghiên cứu này phải đáp được các tiêu chí sau: (1) về thời gian thu nhận và bảo quản của mẫu dịch phết sẽ diễn ra trong vòng một tháng, vượt quá thời điểm này các mẫu sẽ không được sử dụng; (2) các mẫu dịch phết sau khi xử lý, phết lam và nhuộm Pap phải quan sát và ghi nhận được tế bào dưới kính hiển vi.

Mẫu dịch phết sau khi thu nhận và xử lý sẽ được vortex trộn đều trong 15 giây để đồng nhất các tế bào cũng như tạp chất có trong mẫu. Tiến hành phết các tế bào lên trên lam kính bằng 3 hệ thống tế bào học chất lỏng khác nhau gồm có hệ thống phết ly tâm (Cyto-centrifuge Smear Processor) (thử nghiệm 1), hệ thống hút nén khí kết hợp màng lọc đơn (Liquid-based cytology Smear Processor) (thử nghiệm 2) và hệ thống màng lọc đôi (HURO PATH®Slide Process) (thử nghiệm 3). Thứ tự thực hiện xử lý của một mẫu trên cả 3 hệ thống lần lượt là thử nghiệm 1, thử nghiệm 3 và thử nghiệm 2. Trong đó, thử nghiệm 1 và thử nghiệm 3 sẽ diễn ra song song và lượng mẫu còn lại sẽ được thực hiện cho thử nghiệm 2.

- Thử nghiệm 1: Hút 1 mL mẫu dịch phết đã được trộn đều và cho lên trên buồng lắng và đặt mẫu đối xứng vào máy. Tiến hành ly tâm 12000 vòng trong 3 phút theo hướng dẫn sử dụng của máy.

- Thử nghiệm 2: Đổ 15 mL mẫu dịch phết đã thu nhận vào chai chuyên dụng của máy đặt vào vị trí quy định theo hướng dẫn sử dụng của máy. Chọn chế độ GYN, thực hiện thu nhận tế bào và phết lam theo chương trình của máy.

- Thử nghiệm 3: Hút 1 mL mẫu dịch phết đã được trộn đều và cho lên trên cốc lọc đôi. Tiến hành chọn chế độ GYN và thực hiện phết lam theo chương trình của máy.

Các lam kính sau khi phết sẽ được cố định trong Ethanol 96% trong vòng 15 phút và nhuộm Pap theo hướng dẫn sử dụng của ABT®Papanicolaou Staining Kit (ABT, Việt Nam). Mẫu sau khi nhuộm sẽ được quan sát dưới kính hiển vi (Euromex, Hà Lan) và đánh giá bởi kỹ thuật viên tế bào học.

Đánh giá hiệu quả xử lý của các hệ thống tế bào học chất lỏng (LBC)

Khả năng xử lý của các hệ thống LBC được đánh giá thông qua các tiêu chí gồm có: (1) độ bao phủ của các tế bào biểu mô lên lam kính; (2) độ chồng chéo của các tế bào; (3) độ đa dạng của các tế bào và (4) độ tinh sạch, loại bỏ các yếu tố che lấp (Nafis *et al.*, 2021). Độ bao phủ các tế bào biểu mô lên lam kính được đánh giá thông qua hình dạng vết phết lam ghi nhận được. Độ bao phủ đạt yêu cầu khi các tế bào biểu mô được phết lên trên lam kính chiếm trên 80% đường kính vết phết ghi nhận được.

Các chỉ tiêu còn lại sẽ được đánh giá thông qua kết quả quan sát các lam kính dưới kính hiển vi. Hệ thống LBC được cho là xử lý tốt khi độ đa dạng của tế bào trong mẫu phết thu nhận được từ 3-5 loại tế bào phụ khoa khác nhau. Độ chồng lấp giữa các tế bào lên nhau không quá 75% và phải loại bỏ hoặc hạn chế được các yếu tố che lấp như tế bào máu, tế bào viêm và các mảnh mô vụn có trong nền mẫu.

Đánh giá khả năng ứng dụng của ABT®Papanicolaou Staining Kit

Tất cả các mẫu dịch phết được xử lý và phết lại 1 lần bằng hệ thống LBC tối ưu đã được đánh giá ở thí nghiệm trên và nhuộm với bộ hóa chất nhuộm Papanicolaou (Epredia/Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Tiến hành phân tích và so sánh chất lượng ABT®Papanicolaou Staining Kit (ABT, Việt Nam). Mẫu sau khi nhuộm bằng cả 2 hai bộ kit sẽ được làm mờ và mã hóa trước khi phân tích. Quá trình phân tích được thực hiện bởi các kỹ thuật viên tế bào và chấm điểm cho các chỉ tiêu theo Bảng 1. Sử dụng phân tích Chi-square để xác định mối quan hệ giữa các biến chất lượng của vết nhuộm Pap với chất lượng của thuốc nhuộm. Trong đó, nếu giá trị p-value < 0,05 kết luận chất lượng của vết nhuộm Pap phụ thuộc vào chất lượng của thuốc nhuộm và ngược lại p-value > 0,05 kết luận không phụ thuộc.

Bảng 1. Các chỉ số đánh giá chất lượng vết nhuộm Pap

Chỉ số chất lượng	Điểm	Chỉ số chất lượng	Điểm
Nhuộm nhân		Nhuộm tế bào chất	
Đạt	2	Đạt	2
Không đạt	1	Không đạt	1
Chi tiết nhân		Chi tiết tế bào chất	
Rõ	2	Rõ	2
Mờ	1	Mờ	1

Chất lượng của thuốc nhuộm Pap được thể hiện thông qua chỉ số chất lượng (QI) của vết nhuộm của cả hai bộ kit được tính toán bằng công thức sau: $QI = A_1/A_0$. Trong đó, A_1 là tổng điểm thực tế ghi nhận từ 4 chỉ số ở Bảng 1 và A_0 là tổng điểm tối đa của cả 4 chỉ số là 8. Tiến hành tính toán và ghi nhận giá trị QI trung bình của cả 2 hai bộ kit khi nhuộm trên các mẫu dịch phết khác nhau

Phân tích và xử lý số liệu

Các số liệu được ghi nhận dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD). Phân tích, xử lý thống kê và khảo sát tương quan giữa các biến số với nhau bằng phần mềm SPSS 27.

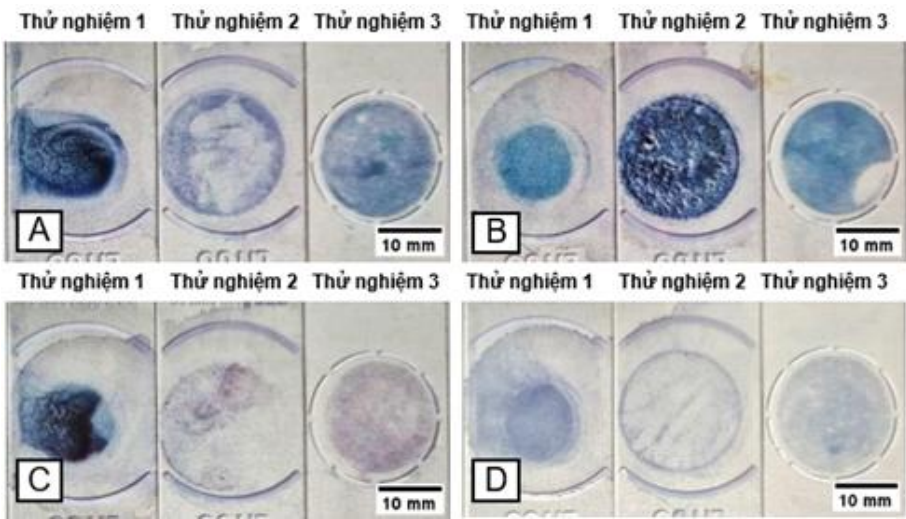
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chuẩn bị mẫu

Tổng cộng có 53 mẫu dịch phết phụ khoa được thu nhận từ các tình nguyện viên tại các cơ sở xét nghiệm trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh trong khoảng thời gian từ tháng 04-05/2024. Các mẫu dịch phết sau khi thu nhận sẽ được xử lý với TopPURE®HPV Pap Smear Collection với tổng thể tích một mẫu là 20 mL. Các mẫu dịch phết có đa dạng nền mẫu gồm có mẫu nhiều máu, mẫu nhiều chất nhầy, tế bào viêm và mẫu nhiều mảnh mô vụn. Trong đó, có 50 mẫu dịch phết được xem là đạt yêu cầu và sử dụng tiếp cho các đánh giá sau khi thời gian thu nhận đến thời gian đánh giá là 1 tháng và ghi nhận sự hiện diện của tế bào trên lam kính sau khi phết và nhuộm. Còn lại 3 mẫu không đạt yêu cầu do không ghi nhận được tế bào, do đó được loại khỏi nghiên cứu này.

Đánh giá hiệu quả xử lý của các hệ thống tế bào học chất lỏng (LBC)

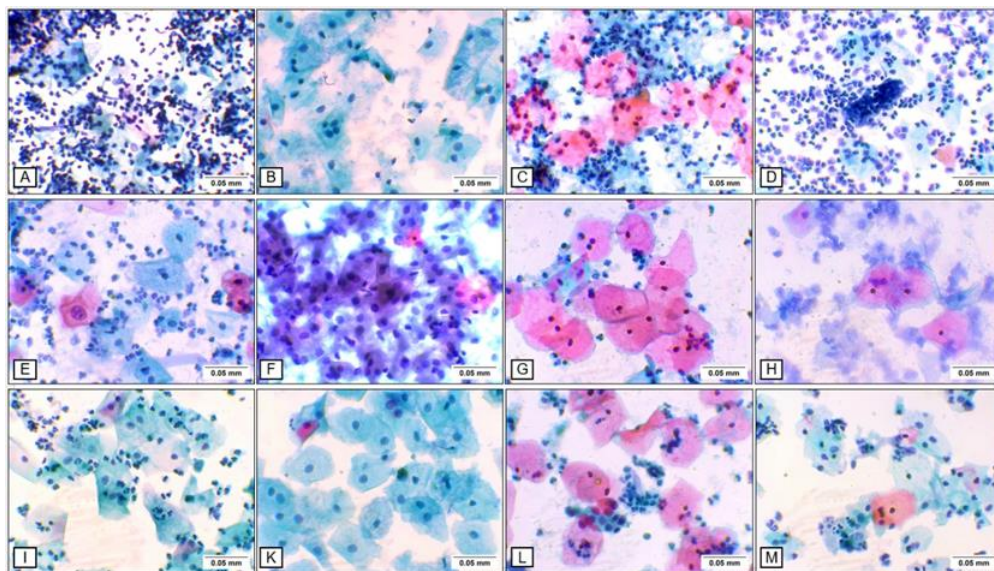
Quá trình đánh giá được thực hiện trên các mẫu nhiều chất nhầy, tế bào viêm, mẫu nhiều máu và mẫu nhiều mảnh mô vụn. Kết quả quan sát bằng mắt thường cho thấy các bảo được phết lên trên lam kính bằng 3 hệ thống LBC khác nhau tạo thành lớp mỏng có đường kính khoảng 13-20 mm trên một lam (Hình 1). Trong đó, đường kính phết thử nghiệm 2 và thử nghiệm 3 là 20 mm và đường kính phết của thử nghiệm 1 là 13 mm. Độ bao phủ của các tế bào biểu mô lên lam kính ở thử nghiệm 1 và thử nghiệm 3 hơn 50%. Ngược lại, thử nghiệm 2 lại cho độ bao phủ ở một số mẫu thấp hơn 50%. Hiện tượng này được gây ra bởi độ nhớt của mẫu gây cản trở lực hút ngược chiều trọng lực của hệ thống này dẫn đến khả năng thu nhận các tế bào kém hiệu quả.



Hình 1. Hình dạng vết phết của các công nghệ tế bào học chất lỏng khác nhau.

(A) Mẫu 1 (nhiều tế bào viêm); (B) Mẫu 2 (nhiều mảnh mô vụn); (C) Mẫu 3 (nhiều máu); (D) Mẫu 4 (độ nhớt cao).

Kết quả quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, ở cả 3 thử nghiệm đều thu nhận được nhiều loại tế bào phụ khoa khác nhau tạo thành một lớp không xếp chồng lên nhau đảm bảo được tiêu chí về độ đa dạng của tế bào và độ chồng chéo của các tế bào không quá 75%. Ở thử nghiệm 1, dịch xử lý sẽ được chuyển lên buồng ly tâm và phết trên lam bằng hệ thống ly tâm. Buồng ly tâm ở đây là 1 cấu trúc gồm có ống ly tâm được cố định trực tiếp lên lam kính. Trong thử nghiệm này, các mẫu giàu tế bào viêm và máu (Hình 2A, 2C và 2D) hệ thống phết ly tâm không loại bỏ tốt các tế bào viêm và các protein được giải phóng trong quá trình ly giải máu dẫn đến các yếu tố này che lấp các tế bào biểu mô mục tiêu cần thiết cho chẩn đoán. Ngược lại, đối với mẫu nhiều mảnh mô vụn hệ thống xử lý và loại bỏ hiệu quả không ghi nhận sự hiện diện trên lam kính (Hình 2B).



Hình 2. Các tế bào phụ khoa của các thử nghiệm quan sát dưới kính hiển vi (40X)

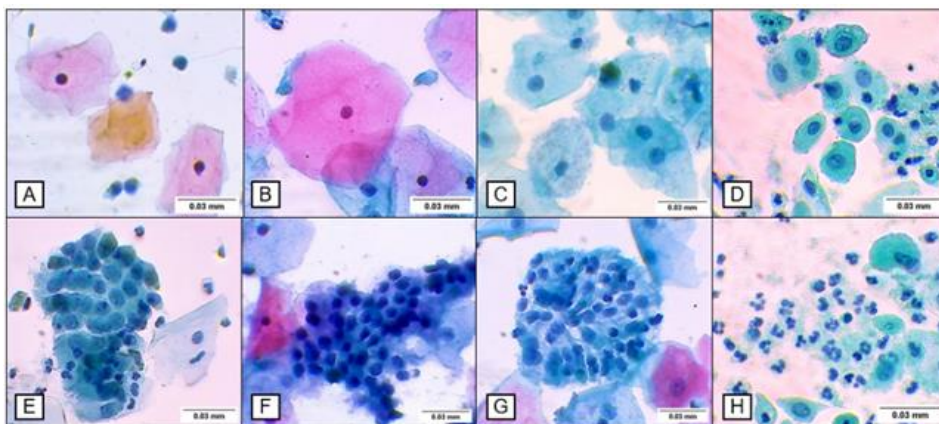
(A) Mẫu 1, thử nghiệm 1; (B) Mẫu 2, thử nghiệm 1; (C) Mẫu 3, thử nghiệm 1; (D) Mẫu 4, thử nghiệm 1; (E) Mẫu 1, thử nghiệm 2; (F) Mẫu 2, thử nghiệm 2; (G) Mẫu 3, thử nghiệm 2; (H) Mẫu 4, thử nghiệm 2; (I) Mẫu 1, thử nghiệm 3; (K) Mẫu 2, thử nghiệm 3; (L) Mẫu 3, thử nghiệm 3; (M) Mẫu 4, thử nghiệm 3.

Ở thử nghiệm 2, các tế bào được thu nhận và phết bằng hệ thống nén khí kết hợp màng lọc đơn. Màng lọc đơn sử dụng cho hệ thống này là một màng polymer được thiết kế với các lỗ lọc có kích thước nhỏ hơn tế bào mục tiêu cho phép thu nhận tế bào mục tiêu và loại bỏ các yếu tố che lấp nhỏ hơn tế bào mục tiêu. Điều đó được thể hiện qua kết quả ở các mẫu 1 và mẫu 3 (Hình 2E, 2G) khi các tế bào viêm và các protein máu được loại bỏ một cách hiệu quả. Ngược lại, ở mẫu 2, ghi nhận sự hiện diện mảnh mô vụn trên lam sau phết, do các mảnh mô này có kích thước lớn hơn các tế bào mục tiêu (Hình 2F). Bên cạnh đó, ở mẫu 4 số lượng tế bào ghi nhận được khá ít so với các công nghệ còn lại cho thấy độ nhớt gây cản trở quá trình thu nhận và phết lam của hệ thống nén khí (Hình 2H). Đối với thử nghiệm 3, đây là hệ thống xử lý và phết tế bào bằng bộ lọc đôi. Bộ lọc được cấu tạo gồm 2 lớp màng chính là màng lọc thô giúp loại bỏ mảnh mô vụn và màng lọc đôi giúp loại bỏ tế bào viêm và máu. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, ở các mẫu giàu tế bào viêm và máu (Hình 2I, 2L và 2M) các tế bào viêm và protein máu được loại bỏ 1 phần giúp giảm thiểu khả năng che lấp của tế bào mục tiêu nhưng cũng không làm mất tính chất của nền mẫu. Trong trường hợp mẫu có nhiều mảnh mô vụn, kết quả cho thấy hệ thống xử lý và loại bỏ hoàn toàn không ghi nhận có yếu tố che lấp (Hình 2K). Đồng thời, trong đánh giá này cũng ghi nhận được sự ảnh hưởng xấu của chất nhầy có trong mẫu có độ nhớt cao cũng gây cản trở đến khả năng bắt màu thuốc nhuộm của tế bào. Điều đó được thể hiện qua kết quả đánh giá trên mẫu số 4-mẫu có độ nhớt cao, khi xử lý không sạch ở thử nghiệm 1 (Hình 2D) và thử nghiệm 2 (Hình 2H) cho kết quả các tế bào bắt màu với thuốc nhuộm nhạt hơn và so với các tế bào ở thử nghiệm 3 khi loại bỏ hết hầu các yếu tố này (Hình 2M). Kết hợp kết quả hình dạng vết phết và hình ảnh quan sát được dưới kính hiển vi cho thấy hệ thống màng lọc đôi là hệ thống thu nhận và xử lý các tế bào từ mẫu dịch phết phụ khoa hiệu quả nhất khi đạt các tiêu chí ban đầu đề ra.

Đánh giá ứng dụng của ABT®Papanicolaou Staining Kit

ABT®Papanicolaou Staining Kit là bộ kit được thiết kế cho kỹ thuật nhuộm tế bào học đa sắc-nhuộm Pap, gồm có 3 thuốc nhuộm thành phần ABT®Nuclear Stain Solution (nhuộm nhân); ABT®OG Stain Solution và ABT®EA Stain Solution (nhuộm tế bào chất). Tổng thời gian cố định và nhuộm của bộ kit là 20 phút, ngắn hơn so với các quy trình nhuộm Pap truyền thống là 30 phút (Gupta *et al.*, 2009). Bên cạnh đó, quy trình của bộ kit không sử dụng xylene, đây là một hóa chất độc hại với sức khỏe và gây ô nhiễm môi trường. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi cho thấy các tế bào phụ khoa sau khi nhuộm với ABT® Papanicolaou Staining Kit có thể nhìn rõ và phân biệt được nhân và tế bào chất cũng như phân biệt được các tế bào phụ khoa khác nhau. Nhân tế bào sau nhuộm

sẽ có màu xanh tím đậm ở giữa và kết hợp với màu của tế bào chất ở một số tế bào biểu mô sẽ cho màu xanh tím hoặc màu đỏ tím. Tế bào chất của các tế bào khác nhau sẽ bắt màu khác nhau sau khi nhuộm. Đối với các tế bào hoạt động mạnh như tế bào trung gian, tế bào cận đáy, tế bào vùng chuyển tiếp, nội mạc tử cung và các tế bào nội tiết sau khi nhuộm tế bào chất thường bắt màu xanh dương cho đến màu xanh ngọc (Hình 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H). Ngược lại, đối với các tế bào ít hoạt động như các tế bào lớp bề mặt sau khi nhuộm tế bào chất thường bắt màu đỏ đến hồng (Hình 2B) và đến khi không còn hoạt động (tế bào chết, mất nhân) các tế bào chất sẽ bắt màu cam (Hình 2A). Sự khác biệt về màu sắc của tế bào chất ngoài trạng thái hoạt động của tế bào thì còn bị ảnh hưởng bởi quá trình sinh lý của cơ thể phụ nữ, sự khác nhau về giá trị pH ở các mẫu bệnh phẩm.



Hình 3. Các loại tế bào phụ khoa nhuộm với ABT® Papanicolaou Staining (40X).

(A) Tế bào sừng hóa (cam); (B) Tế bào bề mặt (hồng); (C) Tế bào trung gian; (D) Tế bào cận đáy; (E) Tế bào vùng chuyển tiếp cổ tử cung; (F) Nội mạc tử cung; (G) Tế bào nội tiết trụ; (H) Bạch cầu đa nhân.

Một trong những yếu tố quan trọng nhất gây ảnh hưởng đến kết quả chẩn đoán Pap test là độ rõ của nhân và tế bào chất sau khi nhuộm Pap. Các tế bào sau khi nhuộm có thể quan sát rõ nhân và tế bào chất góp phần nâng cao độ nhạy trong các xét nghiệm tế bào học, đặc biệt là sàng lọc sớm ung thư cổ tử cung. Do đó, trong nghiên cứu việc đánh giá và so sánh chất lượng của ABT®Papanicolaou Staining Kit với Bộ hóa chất nhuộm Papanicolaou của Thermo-thương mại hóa trên thị trường, được thực hiện dựa trên 4 chỉ số chất lượng của vết nhuộm Pap gồm có: (1) khả năng nhuộm nhân, (2) chi tiết nhân, (3) khả năng nhuộm tế bào chất và (4) chi tiết tế bào chất. Kết quả so sánh chỉ số chất lượng được thể hiện ở Bảng 2, phần lớn các mẫu dịch phết sau khi nhuộm với cả 2 thuốc nhuộm đều cho kết quả nhìn thấy rõ nhân và tế bào chất. Đồng thời, tỉ lệ các mẫu đạt yêu cầu và rõ ràng chi tiết nhân và tế bào chất lớn hơn so với các mẫu không đạt yêu cầu và mờ khi nhuộm với thuốc nhuộm của ABT. Đồng thời, tỉ lệ này cũng lớn hơn tỉ lệ các mẫu đạt yêu cầu và rõ ràng chi tiết nhân và tế bào chất khi nhuộm với thuốc nhuộm Thermo.

Bảng 2. So sánh chỉ số đánh giá chất lượng vết nhuộm Pap

Chỉ số chất lượng	ABT®Papanicolaou Staining Kit	Bộ hóa chất nhuộm Papanicolaou Thermo	Giá trị Chi-square p-value
Nhuộm nhân			
Đạt	84 %	76 %	13,581
Không đạt	16 %	24 %	< 0,001
Chi tiết nhân			
Rõ	84 %	72 %	10,436
Mờ	16 %	28 %	0,001
Nhuộm tế bào chất			
Đạt	88 %	70%	4,365
Không đạt	12 %	30%	0,037
Chi tiết tế bào chất			
Rõ	82 %	60 %	6,527
Mờ	18 %	40 %	0,011
Giá trị QI trung bình	0,92 ± 0,16	0,85 ± 0,18	

Chỉ số giá trị QI trung bình của ABT®Papanicolaou Staining Kit và bộ hóa chất nhuộm Papanicolaou Thermo ghi nhận được lần lượt là $0,92 \pm 0,16$ và $0,85 \pm 0,18$; như vậy thuốc nhuộm ABT có chỉ số QI cao hơn cho thấy chất lượng tốt hơn thuốc nhuộm Thermo-thuốc nhuộm được thương mại hóa trên thị trường hiện nay. Đồng thời, kết quả phân tích Chi-square về mối liên hệ giữa các chỉ số chất lượng vết nhuộm Pap với chất lượng thuốc nhuộm cho thấy các giá trị Chi-square đều ghi nhận được p-value < 0,05 cho thấy chất lượng các vết nhuộm Pap phụ thuộc vào chất lượng của thuốc nhuộm. Từ các kết quả trên, cho thấy ABT®Papanicolaou Staining Kit có khả năng sử dụng cho nhuộm đa sắc các tế bào phụ khoa trong các xét nghiệm tế bào học cổ tử cung.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá hiệu quả của ba hệ thống tế bào học chất lỏng (LBC) trên các mẫu nhiều chất nhầy, tế bào viêm, máu và mảnh mô vụn. Trong 3 hệ thống LBC, hệ thống màng lọc đôi đạt hiệu quả tốt nhất trong việc xử lý và loại bỏ các yếu tố gây nhiễu (tế bào viêm, protein máu và mảnh mô vụn) đảm bảo tiêu chí về độ đa dạng và độ chồng chéo của tế bào không quá 75%. Nghiên cứu cũng chứng minh thuốc nhuộm ABT®Papanicolaou Staining Kit có khả năng phân biệt tế bào phụ khoa hiệu quả sau khi xử lý với hệ thống LBC, với chỉ số giá trị QI trung bình cao hơn so với thuốc nhuộm thương mại (Thermo), đảm bảo độ rõ của nhân và tế bào chất. Các kết quả này cho thấy tiềm năng lớn của việc kết hợp hệ thống LBC và ABT®Papanicolaou Staining Kit trong việc nâng cao chất lượng và hiệu quả của các xét nghiệm tế bào học cổ tử cung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abulafia O, Pezzullo JC, Sherer DM (2003). Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol Oncol*, 90(1): 137-144.
- Chantziantoniou N, Donnelly AD, Mukherjee M, Boon ME, Austin RM (2017). Inception and development of the papanicolaou stain method. *Acta Cytol*, 61(4-5): 266-280.
- Gupta S, Chachra KL, Bhadola P, Sodhani P (2010). Modified Papanicolaou staining protocol with minimum alcohol use: a cost-cutting measure for resource-limited settings. *Cytopathol*, 21(4): 229-233.
- Hoda RS, Loukeris K, Abdul-Karim FW (2013). Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations: a comprehensive review of similarities and differences. *Diagn Cytopathol*, 41(3): 257-278.
- Makde MM, Sathawane P (2022). Liquid-based cytology: Technical aspects. *Cyto J*, 19:41
- Oh EJ, Jung CK, Kim DH, Kim HK, Kim WS, Jin SY, Yoon HK (2017). Fellowship Council and Committee of Quality Improvement of the Korean Society for Cytopathology. Current Cytology Practices in Korea: A Nationwide Survey by the Korean Society for Cytopathology. *J Pathol Transl Med*, 51(6):579-587.
- Khalbuss WE, Rudomina D, Kauff ND, Chuang L, Melamed MR (2000). SpinThin, a simple, inexpensive technique for preparation of thin-layer cervical cytology from liquid-based specimens: Data on 791 cases. *Cancer*, 90(3): 135-142.
- Nafis NSM, Zin AAM. (2021). Evaluation of PathTezt™, a Liquid-Based Cytology System. *Asian Pac J Cancer Prev*, 22(10): 3261-3266.
- Raju K (2016). Evolution of pap stain. *Biomed Res Ther*, 3: 1-11.
- Ratman OM, Fauzi CN, and Juniari N (2024). Sitologi Berbasis Konvensional dibandingkan dengan Cairan sebagai Skrining Kanker Serviks: Sebuah Sistematis Review. *Al-Hayat J Biol Appl Biol*, 2(1): 1-14.
- Yang DX, Soulos PR, Davis B, Gross CP, Yu JB (2018). Impact of Widespread Cervical Cancer Screening: Number of Cancers Prevented and Changes in Race-specific Incidence. *Am J Clin Oncol*, 41(3):289-294
- Zheng B, Austin RM, Liang X, Wei G, You J, Liang Y, and Zhao C (2017). Conventional Pap smear cervical cancer screening in 11 rural counties in Hainan Province, China: analysis of Bethesda system reporting rates for 218,195 women (predominantly ages 35-64 years) screened in China's National Cervical Cancer Screening Program in Rural Areas (NCCSPRA). *J Am Soc Cytopathol*, 6(3): 120-125.

EFFICIENCY OF LIQUID-BASED CYTOLOGY (LBC) SYSTEMS AND APPLICATION OF THE ABT®PAPANICOLAOU STAINING KIT IN CERVICAL CYTOLOGY TESTING

Truong Gia Hung, Nguyen Duy Khanh, Do Ngoc Diem Truc, Nguyen Huynh Cam Tu*

ABT Biological Solutions Co. Ltd – Long Hau Branch, Vietnam

SUMMARY

Liquid-based cytology (LBC) is currently a significant advanced technique developed to enhance the sensitivity and specificity in cervical cancer screening cytology tests. The study collected gynecological smear samples and compared the sample processing efficiency using three different LBC methods, including the Cyto-centrifuge Smear Processor, the Liquid-based cytology Smear Processor with a single filter membrane, and the HURO PATH®Slide Process with a dual filter membrane. The results showed that all three systems ensured cell diversity and overlap of no more than 75%. Among them, the dual filter membrane system effectively removed inflammatory cells, blood proteins, and tissue fragments, providing the best efficiency in processing cells from gynecological smear samples. The ABT®Papanicolaou Staining Kit, designed for the Pap staining technique, uses a staining procedure that avoids the use of xylene, a toxic solvent. The results indicated that various gynecological cells, after staining, exhibited clearly visible nuclei and cytoplasm when observed under a microscope. The average QI value of the stain when stained with ABT®Papanicolaou Staining is higher than that with other commercial stains (0.92 ± 0.16 vs. 0.85 ± 0.18). Thus, the findings from this study demonstrated that the LBC technology using a dual filter membrane combined with the ABT®Papanicolaou Staining Kit is effective in cervical cytology testing and minimizes health risks for technicians.

Keywords: ABT®Papanicolaou Staining Kit, cervical cytology, LBC, Pap test, Papanicolaou staining.

* Author for correspondence: Tel: 0765221859; Email: camtu2601@gmail.com

HIỆU QUẢ WEDELOLACTONE TỪ CÂY NHỌ NỒI (*ECLIPTA PROSTRATA* (L.) L.) TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐỘNG KINH TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT THÔNG QUA THỤ THỂ GABA

Trịnh Tất Cường, Dương Đức Thiện

Phòng Thí nghiệm Trọng điểm công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Hà Nội

TÓM TẮT

Động kinh là một bệnh não mạn tính không lây, đặc trưng bởi các cơn động kinh tái phát, là những chuyển động không tự chủ ngắn ngủi. Rối loạn này ảnh hưởng đến hơn 50 triệu người trên toàn thế giới. Mặc dù, nhiều loại thuốc chống động kinh đã được thương mại nhưng ngày càng nhiều nguyên nhân của bệnh động kinh được xác định. Bên cạnh đó, khoảng một phần ba số người bị động kinh vẫn trải qua các cơn động kinh không đáp ứng với thuốc. Do đó, hiểu được các cơ chế liên quan đến việc gây ra bệnh động kinh sẽ hỗ trợ sự phát triển của các loại thuốc mới. Trong hơn 10 năm qua, các bằng chứng lâm sàng và thực nghiệm đã hỗ trợ mạnh mẽ cho giả thuyết rằng các quá trình viêm trong não có thể tạo thành một cơ chế phổ biến và quan trọng trong sinh lý bệnh động kinh. γ -aminobutyric acid (GABA) là chất ức chế dẫn truyền thần kinh chính trong hệ thống thần kinh trung ương của động vật có vú trưởng thành. Vai trò chính của nó là làm giảm sự kích thích thần kinh trong toàn bộ hệ thống thần kinh. Hiện có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng quá trình ức chế thông qua trung gian thụ thể GABA là nguyên nhân dẫn đến co giật trên mô hình *in vivo*. Cây nhọ nồi hay cỏ mực, hàn liên thảo (*Eclipta prostrata* L.) là một loài thực vật phân bố rộng rãi trên toàn thế giới ở các vùng ôn đới, nhiệt đới. Trong nghiên cứu này, Wedelolactone tách chiết từ cây nhọ nồi đã cho thấy khả năng kháng viêm, giảm độc tính của picrotoxin thông qua khả năng ức chế khởi phát các cơn co giật, giảm tần suất co giật, đồng thời hỗ trợ sự tăng cường hấp thụ GABA trong não chuột một cách hiệu quả.

Từ khóa: *Eclipta prostrata*, epilepsy, GABA, GABA receptor, inflammation, Wedelolactone.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo tổ chức y tế thế giới (WHO), động kinh là một bệnh mạn tính không lây nhiễm của não, nó được đặc trưng bởi các cơn co giật tái phát, là những đợt cử động không tự chủ ngắn có thể liên quan đến một phần cơ thể hoặc toàn bộ cơ thể. Trên toàn cầu, khoảng 50 triệu người mắc chứng động kinh và gần 80% sống ở các nước đang phát triển (Shaikh *et al.*, 2013). Về cơ chế phân tử, các cơn co giật trong bệnh động kinh chủ yếu bắt nguồn từ một số nguyên nhân, như sự mất cân bằng trạng thái ổn định giữa kích thích và ức chế ở các tế bào thần kinh mà cụ thể là màng trước và sau synap (khớp thần kinh). Chịu trách nhiệm cho sự cân bằng và ổn định này là các tế bào thần kinh sản xuất GABA (GABAergic) và các tế bào thần kinh sản xuất glutamate (glutamatergic) nằm tại các synap (Wong *et al.*, 2003). Nhiều nghiên cứu chỉ ra các quá trình viêm không được kiểm soát dẫn đến kết nối thần kinh không ổn định và mạng lưới tế bào thần kinh bị tăng kích thích là trung gian khởi phát bệnh động kinh (Musto *et al.*, 2011). Các cytokine được nghiên cứu rộng rãi nhất trong thần kinh trung ương cũng như bệnh động kinh là Tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , và IL-6 (Li *et al.*, 2011).

GABA là chất dẫn truyền thần kinh ức chế chính trong não. Tại các synap, GABA hoạt động liên kết với một trong hai thụ thể: GABA_A hoặc GABA_B. Thụ thể GABA_A là các kênh ion phối tử (còn được gọi là các thụ thể ionotropic) có chức năng siêu phân cực tế bào thần kinh bằng cách tăng độ dẫn clorua vào trong tế bào và có tác dụng ức chế nhanh). Thụ thể GABA_B có tác dụng ức chế chậm, là thụ thể liên kết với protein G làm siêu phân cực tế bào thần kinh bằng cách tăng độ dẫn kali, giảm sự xâm nhập của canxi, đồng thời ức chế tiền synap giải phóng các chất dẫn truyền khác). Với khả năng ức chế nhanh nên các loại thuốc đã tập trung nhiều vào thụ thể GABA_A để điều trị co giật (Wong *et al.*, 2003).

Hiện nay, nhiều bằng chứng cho thấy một số cytokine đã ức chế GABA và thụ thể của nó. Nghiên cứu của Roseti và đồng tác giả cho thấy nồng độ của IL-1 β trong bệnh động kinh thùy thái dương làm giảm tới 30% dẫn truyền thần kinh qua trung gian GABA và dẫn đến co giật do tăng kích thích tế bào thần kinh (Roseti *et al.*, 2015). Một nghiên cứu khác trên chuột biến đổi gen biểu hiện quá mức IL-6 trong tế bào sao đã chỉ ra sự tăng độ nhạy cảm với các cơn co giật do các chất chủ vận glutamatergic (axit kainic và NMDA) (Samland *et al.*, 2011).

Cây nhọ nồi hay cỏ mực (*Eclipta prostrata* (L.) L.) là một loài thực vật có hoa thuộc họ Cúc (Asteraceae), phân bố rộng rãi trên toàn thế giới. *Eclipta prostrata* chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, bao gồm các dẫn xuất coumestan, saponin triterpene, saponin steroid, triterpene, steroid, alkaloid steroid, flavonoid, axit phenolic, dẫn xuất thiophene và nhiều hợp chất khác (Timalsina *et al.*, 2001). Cây nhọ nồi được sử dụng trong y học cổ truyền,

đặc biệt là ở khu vực phía Nam Ấn Độ để điều trị bệnh động kinh từ thời cổ đại. Lá nhọ nôi già nát với nước ép tỏi và ớt được dùng bằng đường uống để điều trị bệnh động kinh bởi các thầy lang truyền thống (Shaikh *et al.*, 2013). Cho đến nay, các chất chiết xuất trong nước và cồn của *E. prostrata* đã được đánh giá về các hoạt động an thần, giãn cơ, giải lo âu, nootropic và chống trầm cảm, tăng cường trí nhớ (Jahan *et al.*, 2014). Tuy nhiên, hiện chưa có nghiên cứu nào chỉ ra rằng chất nào trong cây nhọ nôi có khả năng hỗ trợ điều trị bệnh động kinh cũng như chỉ ra cơ chế tác động của nó.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu thực vật: cây nhọ nôi được thu thập tại tỉnh Thái Bình. Sau khi được định danh tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật (TC01, TC02, TC03), mẫu được sấy khô ở 60°C trong 24 giờ, sau đó được nghiền thành dạng bột và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Mẫu động vật: Nghiên cứu được thực hiện trên dòng chuột đực Swiss trắng có cân nặng từ 17-19 gram, được cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết Wedelolactone

Wedelolactone được tách chiết từ cây nhọ nôi theo phương pháp được mô tả bởi Cuong và đồng tác giả (2018). Lá của nhọ nôi được chiết xuất trong methanol bằng Soxhlet. Dung môi được loại bỏ, phần lá được đun trong nước ở 80°C. Sau khi lọc, pha nước được phân chia bằng ethyl acetate. Pha hữu cơ được thu và bay hơi thu được bột màu nâu nhạt. Bột được phân đoạn bằng sắc ký cột gel, pha động sử dụng chloroform: methanol (70: 30).

Tách chiết đại thực bào từ tủy xương chuột

Tế bào đại thực bào được tách ra từ xương đùi chuột (BMDM) theo phương pháp được mô tả bởi Cuong và đồng tác giả (2018). BMDMs được nuôi từ 5 đến 7 ngày trong môi trường DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) bổ sung 10% L929 (yếu tố kích thích M – CSF (macrophage-specific colony stimulating factor), 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL Streptomycin, và 5×10^{-5} M β – mercaptoethanol, ở 37°C bổ sung 5% CO₂.

Đánh giá độc tính của Wedelolactone đối với sự sống sót của đại thực bào phân lập từ chuột

Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng sử dụng kit đếm tế bào (CellTiter 96 R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tế bào được ủ cùng Wedelolactone với các nồng độ 10, 20, 40 µg/mL trong 48 giờ. Sau đó, 10 µL của dung dịch kit được đưa vào giếng nuôi. Giá trị hấp thụ của các giếng tại bước sóng 450 nm sẽ được tính tỉ lệ phần trăm so với giếng không được xử lý với Wedelolactone. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá khả năng kháng viêm của Wedelolactone trên đại thực bào phân lập từ chuột

Các tế bào đại thực bào được phân chia vào các giếng ở nồng độ 5×10^5 tế bào/giếng bằng cách sử dụng buồng đếm, sau đó tế bào được ủ với các nồng độ 1, 2, 4, 8, 10 µg/mL của Wedelolactone trong 45 phút. Sau đó, đại thực bào tiếp tục được ủ với LPS (Lipopolysaccharide) ở nồng độ 1 µg/mL. Sau 18 giờ, dịch tế bào được thu lại bằng ly tâm. Nồng độ cytokine tiền viêm trong dịch nuôi tế bào được đo bằng kit ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đánh giá khả năng chống co giật của Wedelolactone trên mô hình chuột động kinh cấp tính

Khả năng chống co giật của Wedelolactone được đánh giá theo phương pháp mô tả bởi Shaikh và đồng tác giả (2013). Chuột được chia thành 5 nhóm, mỗi nhóm gồm 10 con. Đối chứng âm, đối chứng dương, các nhóm được uống diazepam (2 mg/kg) và 10, 20 mg/kg Wedelolactone, liên tục trong 7 ngày. Một giờ sau khi cho uống ở ngày thứ 7, chuột được tiêm Picrotoxin (PIC) 100 mg/kg vào màng bụng, sau đó quan sát trong 30 phút sau tiêm và ghi lại các thông số: thời gian khởi phát cơn co giật đầu tiên, số lần co giật trong 30 phút, và % chuột được bảo vệ khỏi tử vong.

Phân tích GABA trong não chuột

Định tính GABA trong não chuột được thực hiện bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC) bởi Rao và đồng tác giả (1998). Mô não chuột sau thí nghiệm về hoạt tính chống co giật được hòa tan với ethanol theo tỉ lệ: 100 mg mô não : 2 mL ethanol 80%, ly tâm 1200 vòng/phút, 10 phút, phần dịch nổi được thu và làm khô ở 70°C và hòa tan lại trong nước cất, sau đó 20 µL dịch được sử dụng để phân tích lượng GABA.

Đánh giá mối liên quan giữa viêm và động kinh trên não chuột

Để đánh giá mối liên quan giữa viêm và động kinh trên não chuột, nồng độ cytokine gây viêm được đo bằng cách sử dụng kit ELISA theo phương pháp được mô tả bởi Zhao và đồng tác giả (2019). 100 mg mô não chuột sau thí nghiệm hoạt tính chống co giật được hòa trong 1 mL PBS lạnh, các mẫu sau đó được ly tâm ở 12.000 vòng/phút, 15 phút. Phần dịch nổi được thu để xác định hàm lượng cytokine. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

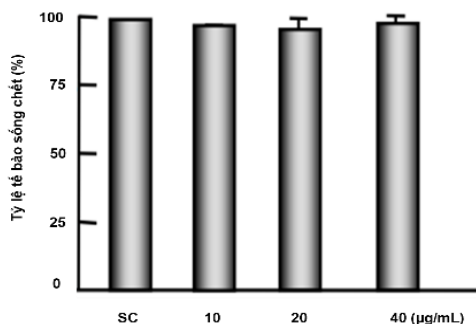
Phân tích thống kê

Độ tin cậy của các thử nghiệm được đánh giá bằng phương pháp phân tích thống kê ANOVA. Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

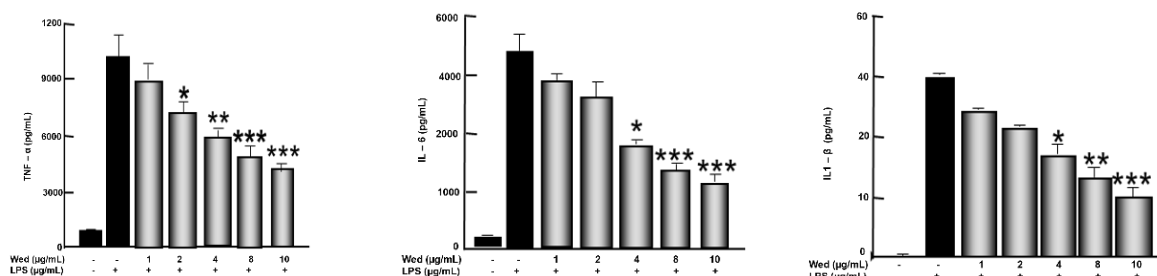
Độc tính của Wedelolactone đối với sự sống sót của đại thực bào

Kết quả cho thấy Wedelolactone gần như không gây độc cho tế bào, thể hiện ở tỷ lệ sống sót của đại thực bào đều đạt trên 95%.



Hình 1. Khả năng sống sót của đại thực bào xử lý với Wedelolactone (SC: Solvent control)

Khả năng kháng viêm của Wedelolactone trên đại thực bào



Hình 2. Nồng độ cytokine sản xuất bởi đại thực bào xử lý với Wedelolactone (*, $p < 0.5$, **, $p < 0.1$, ***, $p < 0.01$)

Wedelolactone có khả năng kháng viêm *in vitro*. Ở giếng đối chứng dương kích thích bởi LPS, nồng độ TNF-α là hơn 10000 pg/mL, nồng độ này giảm dần xuống lần lượt là khi xử lý tế bào tương ứng với 1, 2, 4, 8, 10 µg/mL Wedelolactone. Tương tự, nồng độ IL-6, IL-1β ở các mẫu đối chứng dương lần lượt là 5000 pg/mL và 40 pg/mL. Nồng độ cytokine cũng được ghi nhận giảm dần khi tăng nồng độ tiền xử lý với Wedelolactone.

Khả năng chống co giật của Wedelolactone trên mô hình chuột động kinh cấp tính

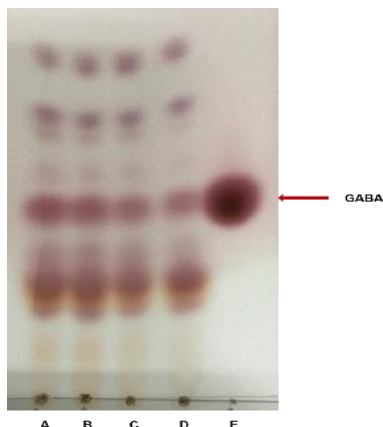
Bảng 1. Hoạt tính chống co giật của Wedelolactone

Điều trị	Kích thích co giật bằng Picrotoxin		
	Thời gian khởi phát co giật (giây)	Số lần co giật trong 30 phút	% Bảo vệ khỏi tử vong
Đối chứng PIC 100 mg/kg	100 ± 2	34 ± 2	0 %
Diazepam 2 mg/kg	397 ± 5	42 ± 3	70%
Wedelolactone 10 mg/kg	122 ± 3	33 ± 2	50%
Wedelolactone 20 mg/kg	375 ± 4	33 ± 2	70%

Trong mô hình co giật trên chuột gây ra bởi picrotoxin cho thấy có sự chậm trễ đáng kể của sự khởi phát cơn co giật đầu tiên, quan sát được trên tất cả các nhóm được điều trị với Wedelolactone và nhóm điều trị với Diazepam khi so sánh với nhóm đối chứng. Đáng chú ý, ở nhóm được điều trị với Wedelolactone liều 20 mg/kg, thời gian khởi phát cơn co giật đầu tiên là 375 giây, gần như tương đương với thuốc chữa động kinh phổ biến trên thị trường hiện nay là Diazepam (397 giây), đồng thời cao hơn rất nhiều khi so sánh với nhóm đối chứng (100 giây). Phần trăm bảo vệ khỏi tử vong của nhóm được điều trị với Diazepam là 70%, tương đồng với kết quả đã được báo cáo bởi Shaikh và đồng tác giả (2013). Con số này ở nhóm chuột được điều trị với 20 mg/kg Wedelolactone cũng là 70%, tương đương với Diazepam, trong khi đó, ở liều dùng 10 mg/kg, Wedelolactone cũng cho thấy khả năng bảo vệ đáng kể khi có 50% chuột được bảo vệ khỏi tử vong (Bảng 1). Từ kết quả này chỉ ra Wedelolactone có thể xem như có tiềm năng với hoạt tính chống co giật.

Kết quả phân tích GABA trong não chuột điều trị với Wedelolactone

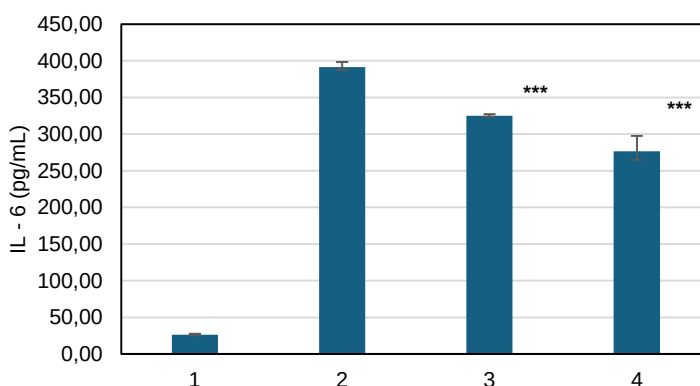
Phân tích hàm lượng GABA trong não trên các nhóm chuột cho thấy nồng độ GABA ở nhóm chuột đối chứng dương cao hơn đáng kể so với các nhóm còn lại, chứng tỏ có sự tích lũy GABA bên ngoài synap. GABA không liên kết được với thụ thể GABA_A để biểu hiện các chức năng sinh lý, điều này là do tác động của picrotoxin ngăn chặn GABA liên kết với thụ thể của nó. Trong khi đó, hàm lượng GABA của nhóm chuột được điều trị với Wedelolactone (20 mg/kg) và nhóm chuột đối chứng âm là tương đương nhau, thấp hơn nhiều so với các nhóm đối chứng dương, thấp hơn cả nhóm chuột sử dụng thuốc chữa bệnh động kinh Diazepam. Ngoài ra, nồng độ GABA ở các nhóm chuột này thấp tương đương với nhóm đối chứng âm cho thấy GABA có hoạt động bình thường. Kết quả này đã chứng minh chức năng của thụ thể GABA_A không bị ngăn chặn bởi PIC. Pôças và đồng tác giả (2006) đã chỉ ra rằng, Wedelolactone có ái lực với vị trí gắn kết Benzodiazepine trên thụ thể GABA_A, cùng với kết quả trong nghiên cứu này đã chỉ ra hoạt động chống co giật của Wedelolactone là do nó có khả năng liên kết với thụ thể GABA_A, giúp cho thụ thể này hoạt động bình thường.



Hình 3. Sắc ký bản mỏng GABA trong não các nhóm chuột xử lý với Wedelolactone

(A) Picrotoxin 100 mg/kg, (B) Diazepam 2 mg/kg, (C) Wedelolactone 20 mg/kg, (D) Chuột đối chứng, (E) GABA chuẩn.

Mối liên quan giữa viêm và động kinh trên não chuột điều trị với Wedelolactone



Hình 4. Nồng độ cytokine gây viêm trong não chuột sử dụng Wedelolactone

1. Chuột đối chứng, 2. Chuột bị tiêm picrotoxin 100 mg/kg, 3. Chuột điều trị với Diazepam 2 mg/kg, 4. Chuột điều trị với Wedelolactone 20 mg/kg (***, $p < 0,01$).

Kết quả phân tích hàm lượng IL-6 trong não chuột cho thấy, ở nhóm chuột tiêm picrotoxin (100 mg/kg), nồng độ cytokine IL-6 trong não xấp xỉ 400 pg/mL, giá trị này lớn hơn khá nhiều khi so sánh với nhóm chuột điều trị với Diazepam 2 mg/kg (325 pg/mL), cũng như nhóm chuột sử dụng Wedelolactone 20 mg/kg (xấp xỉ 275 pg/mL). Kết quả này cho thấy Wedelolactone có khả năng tác động ngăn chặn tế bào thần kinh đệm, tế bào hình sao sản xuất IL-6.

KẾT LUẬN

Wedelolactone có khả năng chống co giật. Trong đó, Wedelolactone có thể có tác động hỗ trợ điều trị bệnh động kinh thông qua thụ thể GABA_A. Ngoài ra, Wedelolactone có khả năng ức chế sản xuất cytokine tiền viêm trong não sau co giật. Wedelolactone có khả năng kháng viêm và chống co giật. Trong đó, Wedelolactone có thể có tác động chống co giật thông qua thụ thể GABA_A. Ngoài ra, Wedelolactone có khả năng ức chế sản xuất cytokine tiền viêm trong não chuột.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện nhờ kinh phí của đề tài KLEPT 02.2022.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cuong TT, Diem GH, Doan TT, Huy NQ, Phuong N, Hung HT (2018). Wedelolactone from Vietnamese *Eclipta prostrata* (L.) L. protected zymosan-induced shock in mice. *Iran J Pharma Res*, 17(2), 653.
- Jahan R, Al-Nahain A., Majumder S, Rahmatullah M (2014). Ethnopharmacological significance of *Eclipta alba* (L.) hassk. (Asteraceae). *Int Schol Res Notic*, 2014, 385969.
- Li G, Bauer S, Nowak M, Norwood B, Tackenberg B, Rosenow F, Knake S, Oertel WH, Hamer MH (2011). Cytokines and epilepsy. *Seizure*, 20(3), 249-256.
- Musto AE, Gjorstrup P, Bazan NG (2011). The omega-3 fatty acid-derived neuroprotectin D1 limits hippocampal hyperexcitability and seizure susceptibility in kindling epileptogenesis. *Epilepsia*, 52(9), 1601-1608.
- Pôças ESC, Lopes DVS, Silva AJM. da, Pimenta PHC, B. Leitão F, D. Netto C, D. Buarque C, V. Brito F, R.R. Costa F, Noël F (2011). Structure-activity relationship of wedelolactone analogues: structural requirements for inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase and binding to the central benzodiazepine receptor. *Bioorgan Med Chem*, 14(23), 7962-7966.
- Rao BS, Raju TR, Meti BL (1998). Self-stimulation of lateral hypothalamus and ventral tegmentum increases the levels of noradrenaline, dopamine, glutamate, and AChE activity, but not 5-hydroxytryptamine and GABA levels in hippocampus and motor cortex. *Neurochem Res*, 23(8), 1053-1059.
- Roseti C, Vliet EAV, Cifelli P, Ruffolo G, Baayen JC, Castro MAD, Bertolini C, Limatola C, Aronica E, Vezzani A, Palma E (2015). GABAA currents are decreased by IL-1 β in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. *Neurobiol Dis*, 82, 311-320.
- Samland H, Huitron-Resendiz S, Masliah E, Criado J, Henriksen SJ, Campbell IL (2003). Profound increase in sensitivity to glutamatergic-but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. *J Neurosci Res*, 73(2), 176-187.
- Shaikh MF, Sancheti J, Sathaye S (2013). Effect of *Eclipta alba* on acute seizure models: a GABAA-mediated effect. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 75(3): 380.
- Timalsina D, Devkota HP (2021). *Eclipta prostrata* (L.) L.(Asteraceae): ethnomedicinal uses, chemical constituents, and biological activities. *Biomolecules*, 11(11), 1738.
- Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC (2003). GABA, axit gamma-hydroxybutyric, and neurological disease. *Ann Neurol*, 54 (6): S3-12.
- Zhao J, Wei B, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, Lu D, Wei W, Wang Y, Li H, Fu Y, Zhu L (2019). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep*, 9(1), 1-12.

EFFECT OF WEDELOLACTONE FROM *ECLIPTA PROSTRATA* (L) L. IN THE TREATMENT OF EPILEPSY ON MOUSE MODEL THROUGH GABA RECEPTOR

Trinh Tat Cuong*, Duong Duc Thien

Key Laboratory for Enzyme and Protein Technology, Vietnam National University University of Science, Hanoi, Vietnam

SUMMARY

Epilepsy is a chronic, non-communicable brain disorder characterized by recurrent seizures, which are brief, involuntary movements. This neurological condition affects more than 50 million people globally. Despite the availability of numerous antiepileptic drugs on the market, the underlying causes of epilepsy are increasingly being studied and identified. However, one-third of individuals with epilepsy continue to suffer from seizures that do not respond effectively to existing medications. As a result, a deeper understanding of the mechanisms involved in the development and progression of epilepsy is essential for the advancement of new and more effective therapeutic options. In the past decade, both clinical and experimental research has robustly supported the idea that inflammatory processes in the brain could play a critical and common role in the pathophysiology of epilepsy. γ -aminobutyric acid (GABA) functions as the principal inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of adult mammals, and its main function is to decrease neuronal excitability across the nervous system. Numerous studies have demonstrated that the inhibition process mediated by GABA receptors is closely linked to the occurrence of seizures in in vivo models. *Eclipta prostrata* L., a plant species that is widely distributed in temperate and tropical regions around the world, has shown potential benefits in this context. In this particular study, Wedelolactone, which is extracted from *Eclipta prostrata*, exhibited notable anti-inflammatory properties. It effectively reduced the toxicity of picrotoxin by inhibiting the onset of seizures, decreasing the frequency of seizures, and supporting an increase in GABA absorption within the mouse brain, thus highlighting its potential as a therapeutic agent for epilepsy.

Keywords: *Eclipta prostrata*, epilepsy, GABA, GABA receptor, inflammation, Wedelolactone.

* Author for correspondence: Tel: 0984814776; Email: cuongtrinhstat@gmail.com

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ VÀ CHỐNG OXY HÓA CỦA VI NẤM NỘI SINH PHÂN LẬP TRÊN CÂY XÀ CĂN (*Ophiorrhiza baviensis* Drake)

Nguyễn Mậu Hưng¹, Quách Ngọc Tùng^{1,2}, Hồ Ngọc Anh^{1,2}, Đoàn Thị Nhung¹, Đỗ Thị Thảo^{1,2}, Hoàng Hà¹, Chu Hoàng Hà^{1,2*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Nấm nội sinh trên cây dược liệu là một nguồn cung cấp đa dạng các hợp chất có hoạt tính sinh học như kháng sinh, gây độc tế bào ung thư và chống oxy hóa. Cây xà căn (*Ophiorrhiza baviensis* Drake) là loài cây dược liệu quý được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền, tuy nhiên những thông tin về nấm nội sinh hiện vẫn còn hạn chế. Nghiên cứu này tập trung phân lập và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư, chống oxy hóa của nấm nội sinh trên cây xà căn thu thập tại Ba Vì, Hà Nội. Từ các mẫu rễ, thân, lá trên cây Xà căn, 9 chủng nấm nội sinh đã được phân lập, trong đó số lượng nấm nội sinh giữa các bộ phận cây tương đương nhau, khoảng 33,3%. Dựa trên phân tích trình tự gen ITS, 9 chủng lập được phân loại thuộc 3 chi *Colletotrichum* (6 chủng), *Fusarium* (2 chủng) và *Volutella* (1 chủng). Kết quả đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư của 9 chủng nấm trên dòng tế bào ung thư phổi A549 ở nồng độ 20 µg/mL cho thấy chủng XCB2.L4 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh nhất với tỷ lệ ức chế đạt $56,97 \pm 1,44\%$. Hơn nữa, cao chiết XCB2.L4 còn thể hiện khả năng trung hòa gốc DPPH và hydroxyl mạnh, với tỷ lệ tương ứng là $79,09 \pm 0,83\%$ và $81,72 \pm 3,92\%$. Do vậy, chủng nấm XCB2.L4 nội sinh có thể là nguồn cung cấp các hoạt chất kháng ung thư và kháng oxy hóa tiềm năng.

Từ khóa: Chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư, ITS, nấm nội sinh, xà căn.

MỞ ĐẦU

Ngày nay, xã hội phát triển kéo theo sự phát sinh nhiều tác nhân ảnh hưởng lớn đến sức khỏe con người như: môi trường ô nhiễm, các chất có hại trong mỹ phẩm và thực phẩm. Đây là những tác nhân chính dẫn tới sự hình thành tế bào ung thư (Perillo et al., 2020). Ngoài ra, nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh các tác nhân trên là nguồn sinh ra các gốc oxy hóa (reactive oxygen species, ROS), một trong những nguyên nhân dẫn đến sự hình thành các tế bào ung thư. Nhiều chất chống oxy hóa tổng hợp bị rút khỏi thị trường do những tác dụng phụ liên quan đến tổn thương gan, thận và ung thư và các chất điều trị ung thư không còn hiệu quả trong điều trị lâm sàng. Ngoài ra, hiện tượng kháng kháng sinh và các nghiên cứu lâm sàng về thuốc điều trị ung thư đã cạn kiệt. Chính vì vậy, việc tìm ra các loại thuốc kháng sinh hay chất chống ung thư mới từ tự nhiên ngày càng cấp thiết (Uzma et al., 2018).

Trong những năm gần đây, nấm nội sinh đã thu hút được nhiều sự chú ý của cộng đồng khoa học do tiềm năng to lớn của chúng trong việc tổng hợp các loại hợp chất chống ung thư khác nhau. Nấm nội sinh là một nhóm các vi sinh vật nội sinh được định nghĩa là các loài nấm sống trong các mô thực vật trong toàn bộ hoặc một phần vòng đời, thiết lập mối quan hệ sinh tồn cùng có lợi với cây chủ mà không gây ra tác dụng phụ hoặc bệnh tật rõ ràng cho cây (Prajapati et al., 2021). Các chất điều trị ung thư sử dụng trong điều trị lâm sàng như paclitaxel, podophyllotoxin, camptothecin, vinblastine, hypericin và diosgenin trước đây chỉ được tách chiết từ cây dược liệu, nay đã được chứng minh được tổng hợp bởi nấm nội sinh. Ví dụ, camptothecin được chứng minh tách chiết từ một số nấm nội sinh trên cây dược liệu như *Entrophospora infrequens*, *Fusarium solani*, *Aspergillus* sp. và *Trichoderma atroviride* (Uzma et al., 2018). Ngoài các chất có nguồn gốc từ thực vật, nấm nội sinh còn sinh tổng hợp nhiều chất có hoạt tính ức chế tế bào ung thư mới như rhytidchromone, aspermicrone, oryzaein, fusarielin, penicisulfuranol và pyrenosetin (Prajapati et al., 2021).

Cây xà căn (*Ophiorrhiza baviensis*) là cây dược liệu phân bố ở Trung Quốc và một số tỉnh phía bắc Việt Nam như Cao Bằng, Hà Nội, Ninh Bình và Phú Thọ. Trong y học cổ truyền, xà căn có khả năng chữa lành vết rạn nứt, viêm miệng, loét, ho. Nghiên cứu gần đây đã phát hiện chất mới 3β,23,24-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid và 8 chất khác từ cây xà căn, trong đó các chất này thể hiện hoạt tính ức chế tế bào ung thư và chống oxy hóa (Viet Cuong et al., 2021). Tuy nhiên, nấm nội sinh cũng như hoạt tính ức chế tế bào ung thư và chống oxy hóa của chúng vẫn chưa được khai thác. Nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên phân lập và khảo sát tiềm năng gây độc tế bào ung thư, chống oxy hóa của nấm nội sinh trên cây xà căn thu thập tại Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các mẫu cây xà cừ được thu thập tại Ba Vì, Hà Nội và được vận chuyển đến phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Dòng tế bào ung thư phổi A549 ở người do GS. Jeanette Maier, Trường Đại học Milan, Ý và GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, Mỹ cung cấp.

Môi trường nuôi cấy: PDA (g/L): dịch chiết khoai tây 200, dextrose 20, H₂O bổ sung đủ 1000 mL, thạch 20, pH 6,5; PDB (g/L): dịch chiết khoai tây 200, dextrose 20, H₂O bổ sung đủ 1000 mL, pH 6,5.

Phương pháp

Phân lập nấm nội sinh

Các mẫu xà cừ được rửa sạch bằng nước, chia thành 3 phần, gồm rễ, thân, lá và được hong khô cho ráo nước. Các mẫu rễ, thân, lá được khử trùng bề mặt theo phương pháp được mô tả trước đây của nhóm nghiên cứu (Doan *et al.*, 2024). Các mẫu được lần lượt xử lý bằng 70% ethanol trong 30 giây, khử trùng bằng 3,5% NaOCl trong 2 phút và 70% ethanol trong 2-5 giây. Tiếp theo, các mẫu được rửa 3 lần bằng nước cất khử trùng để loại bỏ hoàn toàn hóa chất còn dư. Cuối cùng, các mẫu được để khô trong buồng cấy khử trùng và cắt nhỏ để đặt trên môi trường PDA có bổ sung 100 mg/L streptomycin. Các đĩa Petri được ủ ở 28°C trong 14 ngày và sự phát triển của các khuẩn lạc nấm được theo dõi hàng ngày. Các chủng nấm được cấy chuyển và làm sạch trên môi trường PDA.

Phân loại các chủng nấm bằng phân tích trình tự gen ITS

Các chủng nấm được nuôi trên môi trường PDA ở 28°C trong 3-5 ngày để quan sát hình thái khuẩn lạc và tách chiết DNA tổng số bằng kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') để khuếch đại vùng gen Internal Transcribed Spacer (ITS) (Vu *et al.*, 2022). Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty 1st BASE (Singapore). Sau khi được xử lý bằng phần mềm BioEdit v.7.2.5, trình tự cuối được so sánh với các chủng nấm tham chiếu trên GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Dùng phần mềm MEGA v.11.0 để xây dựng cây phát sinh loài theo Neighbor – Joining với bootstrap sử dụng 1000 lần lặp.

Đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư

Chủng nấm được lên men trong môi trường PDB ở 28°C với tốc độ lắc 160 vòng/phút trong 10 ngày. Sau 10 ngày lên men, dịch lên men được ly tâm để thu sinh khối nấm. Sau đó, sinh khối nấm được sấy khô ở 50°C, nghiền thành bột và sau đó được chiết với hỗn hợp dichloromethane:methanol (90:10, v/v) theo tỷ lệ bột nấm và dung môi là 1:10 (w/v). Cao chiết được hòa tan bằng dimethyl sulfoxide (DMSO). Cao chiết nấm được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi A549 bằng phương pháp nhuộm màu với sulforhodamine B (SRB). Tế bào ung thư phổi A549 với mật độ khoảng 1×10^5 tế bào/mL nuôi trên đĩa 96 giếng trong 24 giờ ở 37°C và 5% CO₂. Các đĩa nuôi tế bào được thử độc tính bằng cách bổ sung dịch cao chiết thô từ nấm ở nồng độ 20 µg/mL và 100 µg/mL trong thời gian 48 giờ. Giá trị OD được đọc ở bước sóng 515 nm trên máy ELISA Plate Reader. Giá trị OD máy đo được tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein. Giá trị OD càng cao thì hàm lượng tế bào và hàm lượng protein càng nhiều. Ellipticine ở nồng độ 10 µg/mL được sử dụng làm đối chứng dương và 0,1% (v/v) DMSO được sử dụng làm đối chứng âm.

Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết thô được xác định theo sự chuyển màu của 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Cao chiết thô hòa tan trong ethanol 70% ở nồng độ 100-1200 µg/mL được phản ứng với 0,2 mL DPPH ở nồng độ 0,1 mM và sau đó bổ sung 2,0 mL nước khử ion. Phản ứng được ủ trong bóng tối 30 phút và độ hấp thụ sau đó được đo ở bước sóng 517 nm. Hoạt động nhát gốc DPPH của cao chiết thô được tính theo công thức: $I\% = 1 - [(As - A0)/Ab] \times 100\%$, trong đó As: độ hấp thụ của hỗn hợp bao gồm cao chiết thô, A0: độ hấp thụ của ethanol 70% và dung dịch 0,1 mM DPPH, Ab: độ hấp thụ của ethanol 70% (Vu *et al.*, 2022).

Cao chiết thô ở nồng độ 100-1200 µg/mL được bổ sung vào phản ứng chứa 0,75 mM 1,10-phenanthroline, 0,75 mM FeSO₄, 0,01% H₂O₂, 0,15 M đệm sodium phosphate (pH 7,4). Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 30 phút và đo ở bước sóng 536 nm. Hoạt tính ức chế gốc hydroxyl được tính theo công thức: $I\% = [(As - Ab)/(Ao - Ab)] \times 100\%$. Trong đó: Ao: giá trị mật độ quang của phản ứng không bổ sung cao chiết thô và H₂O₂; As: giá trị mật độ quang của mẫu thử; Ab: giá trị mật độ quang của mẫu nước cất. Hoạt tính loại bỏ gốc tự do hydroxyl được xác định bằng phản ứng màu dựa trên sự oxy hóa của pyrogallol (Vu *et al.*, 2022).

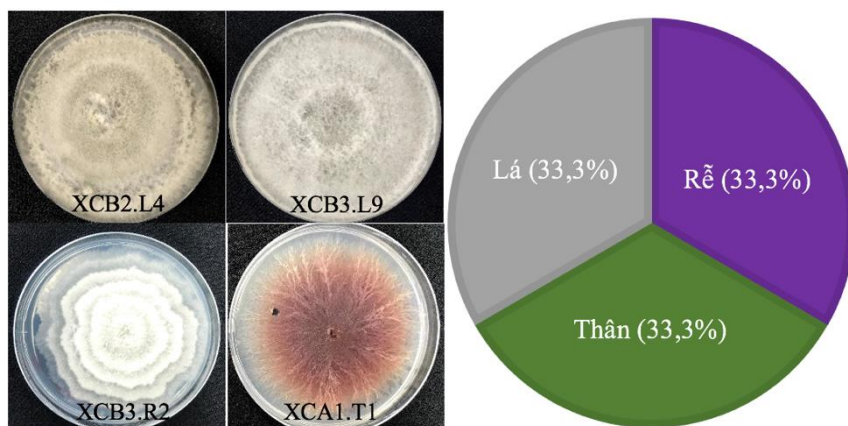
Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các số liệu được xử lý trên Excel, được trình bày dạng mean $\pm$ SD.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và đánh giá phân bố của nấm nội sinh trên cây xà cừ

Từ các mẫu xà cừ thu thập tại Ba Vì, Hà Nội, đã phân lập được 9 chủng nấm thuần với các đặc điểm hình thái khác nhau. Các chủng ký hiệu là XCA1.L4, XCA1.R2, XCA1.T1, XCB1.L6, XCB2.L4, XCB2.R2, XCB2.T7, XCB3.L9 và XCB3.T5. Đánh giá phân bố của các chủng nấm cho thấy số lượng các chủng nấm ở rễ (3 chủng), thân (3 chủng), lá (3 chủng) khá đồng đều. Khác biệt với kết quả trên, 16 chủng nấm đã được phân lập từ cây xà cừ đậu (*Ophiorrhiza mungos*) (Aswani *et al.*, 2020). Số lượng chủng nấm phụ thuộc nhiều vào số lượng mẫu, phương pháp phân lập và mục tiêu nghiên cứu.



Hình 1. Đặc điểm hình thái trên môi trường PDA của một số chủng nấm đại diện (A) và phân bố của nấm nội sinh theo bộ phận cây xà cừ (B)

Phân loại nấm nội sinh bằng sinh học phân tử

Trong nghiên cứu này, 9 chủng nấm nội sinh được phân loại dựa trên cơ sở so sánh trình tự gen ITS tham chiếu trên GenBank. Các chủng vi nấm được tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen ITS bằng phản ứng PCR. Quá trình khuếch đại gen ITS của 9 chủng nấm nghiên cứu đều thu được các băng có kích thước dao động khoảng 550 bp. Kết quả so sánh trình tự gen ITS cho thấy trình tự của 9 chủng vi nấm có độ tương đồng cao với một số loài thuộc các chi *Colletotrichum*, *Fusarium* và *Volutella* (Bảng 1). Trong đó, chi *Colletotrichum* chiếm số lượng chủng nấm cao nhất với 6 chủng, trong đó các chủng này thuộc 5 loài *Colletotrichum* khác nhau. Ở mức độ thấp hơn, chi *Fusarium* và *Volutella* chiếm lần lượt 2 và 1 chủng, tương ứng. Nghiên cứu nấm nội sinh trên cây thiết sam (*Tsuga chinensis*) cho thấy 16 chủng nấm thuộc 7 chi như *Aspergillus*, *Daldinia*, *Fusarium*, *Neocosmospora*, *Neofusicoccum*, *Xylaria* và *Penicillium*. Trong đó, chi *Fusarium* và *Aspergillus* chiếm tỷ lệ cao nhất (Vu *et al.*, 2022). Do vậy, mức độ đa dạng nấm nội sinh trên cây xà cừ thu thập tại Ba Vì, Hà Nội ở mức thấp.

Bảng 1. Mức độ tương đồng trình tự ITS của 9 chủng nấm nội sinh với các chủng nấm tham chiếu trên GenBank

Tên chủng	Nguồn phân lập	Chủng tham chiếu có độ tương đồng cao nhất	Mức độ tương đồng (%)	Mã số Genbank
XCA1.L4	Lá	<i>Colletotrichum fiorinae</i> CBS 128517 ^T	99,21	NR_111747
XCA1.R2	Rễ	<i>Fusarium longifundum</i> NRRL 36372 ^T	99,40	NR_171059
XCA1.T1	Thân	<i>Fusarium concentricum</i> NRRL 25181 ^T	99,59	NR_111886
XCB1.L6	Lá	<i>Colletotrichum fiorinae</i> CBS 128517 ^T	100	NR_111747
XCB2.L4	Lá	<i>Colletotrichum arenicola</i> CGMCC 3.19667 ^T	99,62	NR_120143
XCB2.R2	Rễ	<i>Volutella leucaenae</i> MFLUCC 17-2620 ^T	98,17	NR_189395
XCB2.T7	Thân	<i>Colletotrichum boninense</i> CBS 123755 ^T	99,63	NR_165949
XCB3.L9	Lá	<i>Colletotrichum queenslandicum</i> ICMP 1778 ^T	99,44	NR_144796
XCB3.T5	Thân	<i>Colletotrichum gigasporum</i> CBS 133266 ^T	98,94	NR_145380

Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các chủng nấm nội sinh

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi A549 được xác định bằng tỉ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào ung thư thử nghiệm và kết quả thể hiện ở Bảng 2.

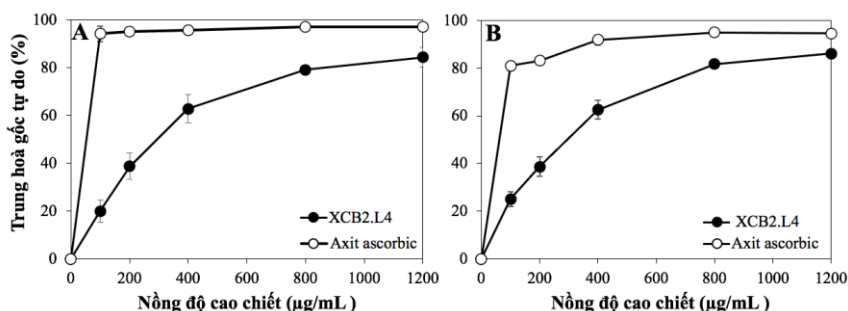
Bảng 2. Hoạt tính gây độc trên tế bào ung thư phổi A549 của cao chiết thô từ 9 chủng nấm nội sinh

Cao chiết nấm nội sinh	Tỷ lệ ức chế tế bào ung thư của cao chiết thô (%)	
	20 µg/mL	100 µg/mL
XCB2.L4	56,97 ± 1,44	95,12 ± 3,09
XCB3.T5b	29,16 ± 1,41	97,27 ± 3,13
XCB2.R2b	15,97 ± 3,43	64,74 ± 4,11
XCB2.T7a	21,61 ± 1,14	94,43 ± 1,65
XCB3.L9b	14,60 ± 2,54	31,18 ± 3,63
XCB3.R2	16,62 ± 1,55	43,43 ± 2,27
XCB1.L6	12,96 ± 2,32	76,65 ± 6,43
XCA1.L4	24,25 ± 5,39	48,68 ± 4,22
XCA1.T1	18,19 ± 4,37	85,18 ± 5,34
Ellipticine (10 µg/mL)	90,5 ± 3,01	

Kết quả cho thấy 100 µg/mL cao chiết thô của các chủng nấm ức chế mạnh tế bào ung thư phổi, dao động từ 31,18 ± 3,63% đến 97,27 ± 3,13 (Bảng 2). Cao chiết XCB3.L9b và XCB3.R2 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư thấp nhất, trong khi đó cao chiết thô XCB2.L4 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất. Để đánh giá rõ hơn hoạt tính gây độc tế bào, nồng độ cao chiết là 20 µg/mL được sử dụng. Kết quả Bảng 2 cho thấy hoạt tính gây độc tế bào ung thư giảm rõ rệt so với 100 µg/mL cao chiết thô. Kết quả cho thấy 20 µg/mL cao chiết thô không ức chế mạnh tế bào ung thư A549, ngoại trừ XCB2.L4 (56,97 ± 1,44). Ở mẫu đối chứng, 10 µg/mL ellipticine ức chế tới 90,5 ± 3,01 sự sống sót của tế bào ung thư. Tương tự, hoạt tính gây độc tế bào ung thư A549 của vi nấm nội sinh trên các cây ngập mặn chỉ đạt dao động từ 7 - 57,6% ở nồng độ 20 µg/mL cao chiết thô (Liu *et al.*, 2017). Trong chi *Colletotrichum*, cao chiết thô từ *Colletotrichum gloeosporioides* được chứng minh ức chế mạnh tế bào ung thư vú MCF-7 (Rai *et al.*, 2023). Sự ức chế mạnh các dòng tế bào ung thư có thể do các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cao chiết tác động tới protein p53, một protein quan trọng nằm trong điều hòa chu kỳ tế bào – gọi là gen áp chế khối u p53. Khi DNA bị thương tổn, p53 làm ngừng chu kỳ tế bào cho đến khi DNA được sửa chữa hoặc p53 kích hoạt tế bào chết theo lập trình (apoptosis) nếu không còn khả năng sửa chữa DNA (Vu *et al.*, 2022).

Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của chủng nấm XCB2.L4

Các chất chống oxy hóa đóng vai trò quan trọng trong bảo vệ tế bào khỏi sự oxy hóa của ROS và ngăn ngừa bệnh ung thư. Dung dịch DPPH có màu tím, có độ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 517 nm, khi có sự hiện diện của các chất chống oxy hóa ở nồng độ thích hợp, dung dịch này sẽ chuyển sang màu vàng. Do đó, giá trị OD đo được ở bước sóng 517 nm càng thấp chứng tỏ khả năng trung hòa gốc tự do của chất chống oxy hóa càng cao. Kết quả cho thấy khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của cao chiết thô XCB2.L4 tuyến tính với nồng độ cao chiết sử dụng (Hình 3A). Tại nồng độ 100 µg/mL, hoạt tính trung hòa gốc DPPH chỉ đạt 20,01 ± 4,67%. Khi tăng nồng độ cao chiết tăng đến 800 µg/mL, hoạt tính chống oxy hóa tăng đáng kể, đạt 79,09 ± 0,83%. Hoạt tính trung hòa gốc DPPH không tăng đáng kể khi sử dụng 1200 µg/mL cao chiết XCB2.L4. Tuy nhiên, hoạt tính trung hòa gốc DPPH đạt cao nhất vẫn thấp hơn so với chất chống oxy hóa chuẩn, axit ascorbic (97,25 ± 1,03%). Gốc DPPH là gốc tự do được sử dụng trong nhiều thí nghiệm đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết thô và hợp chất tinh sạch từ nấm nội sinh. Chủng vi nấm *Xylaria feejeensis* HMJAU22039 nội sinh trên cây sồi Ấn Độ (*Tectona grandis*) được chứng minh có hoạt tính trung hòa DPPH đạt mức cao nhất là 69,34 ± 0,31% (Rebbapragada & Rajagopal, 2016), thấp hơn so với cao chiết thô XCB2.L4. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh các hợp chất thuộc nhóm polyphenol và flavonoid là nguyên nhân chính giúp cao chiết thô từ nấm có hoạt tính chống oxy hóa (Liu *et al.*, 2007).

**Hình 3. Hoạt tính trung hòa gốc DPPH (A) và hydroxyl (B) tự do của cao chiết từ chủng nấm XCB2.L4**

Trong số các loại gốc tự do, gốc hydroxyl là gốc oxy hóa mạnh nhất và là nguyên nhân dẫn đến sự phá hủy các phân tử của tế bào như DNA, RNA và lipid. Gốc hydroxyl được sinh ra từ phản ứng Fenton và phản ứng Haber – Weiss thông qua sự chuyển hóa của ion sắt (Perillo *et al.*, 2020). Tương tự phản ứng với DPPH, kết quả thử hoạt tính trung hòa gốc hydroxyl cho thấy, hoạt tính trung hòa gốc hydroxyl tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết thô sử dụng. Hoạt tính trung hòa hydroxyl tăng từ 0 đến $86,12 \pm 1,67\%$ ở dải nồng độ từ 0 – 1200 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 3B). Ngoài ra, không có sự khác biệt đáng kể giữa nồng độ 800 $\mu\text{g/mL}$ và 1200 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả này chứng minh, cao chiết thô XCB2.L4 thể hiện khả năng ức chế 2 gốc oxy hóa khá mạnh. Tới nay, chưa có công bố liên quan đến hoạt tính chống oxy hóa của *Colletotrichum arecicola*.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 9 chủng nấm nội sinh đã được phân lập từ cây xà cừ thu thập tại Ba Vì, Hà Nội. Phân tích trình tự gen 16S rDNA cho thấy 9 chủng nấm được phân loại thuộc chi *Colletotrichum*, *Fusarium* và *Volutella*, trong đó chi *Colletotrichum* chiếm 6 chủng nấm. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào thư của 9 chủng nấm trên dòng tế bào ung thư phổi A549 cho thấy cao chiết từ tế bào chủng XCB2.L4 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh nhất với tỷ lệ ức chế đạt $56,97 \pm 1,44$ ở nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$. Hơn nữa, cao chiết thô XCB2.L4 cũng thể hiện hoạt tính ức chế gốc oxy hóa DPPH và hydroxyl mạnh với tỷ lệ trung hòa tương ứng là $79,09 \pm 0,83\%$ và $81,72 \pm 3,92\%$. Nghiên cứu tinh sạch và xác định các chất chống ung thư và oxy hóa cần được thực hiện cho các phân tích sâu hơn đối với chủng XCB2.L4. Nghiên cứu này đã chứng minh cây xà cừ là nguồn khai thác nấm nội sinh có hoạt tính chống ung thư tiềm năng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện nhờ kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với mã số đề tài TĐCNSH.03/20-22.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aswani R, Jasim B, Arun Vishnu R, Antony L, Remakanthan A, Aravindakumar CT, *et al.* (2020). Nanoelictor based enhancement of camptothecin production in fungi isolated from *Ophiorrhiza mungos*. *Biotech Progress* 36: e3039.
- Doan TN, Le TD, Ho NA, Ho TT, Do TT, Hoang H, *et al.* (2024). Isolation, anticancer potency, and camptothecin-producing ability of endophytic fungi isolated from *Ixora chinensis*. *Sci Pro* 107: 368504241253675.
- Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, & Yan G (2007). Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chem* 105: 548-554.
- Liu X, Wu X, Ma Y, Zhang W, Hu L, Feng X, *et al.* (2017). Endophytic fungi from mangrove inhibit lung cancer cell growth and angiogenesis in vitro. *Onco Rep* 37: 1793-1803.
- Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, *et al.* (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med* 52: 192-203.
- Prajapati J, Goswami D, & Rawal RM (2021). Endophytic fungi: A treasure trove of novel anticancer compounds. *CRPHAR* 2: 100050.
- Rai N, Gupta P, Verma A, Tiwari RK, Madhukar P, Kamble SC, *et al.* (2023). Ethyl acetate extract of *Colletotrichum gloeosporioides* promotes cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cells. *ACS Omega* 8: 3768-3784.
- Rebbapragada D, & Rajagopal K (2016). Evaluation and optimization of antioxidant potentiality of *Xylaria feejeensis* HMJAU22039. *Asian J Pharm Clin Res* 9: 269-273.
- Uzma F, Mohan CD, Hashem A, Konappa NM, Rangappa S, Kamath PV, *et al.* (2018). Endophytic fungi—alternative sources of cytotoxic compounds: A review. *Front Pharma* 9.
- Viet Cuong LC, Anh LT, Huu Dat TT, Anh TTP, Lien LQ, Kim YH, *et al.* (2021). Cytotoxic and anti-inflammatory activities of secondary metabolites from *Ophiorrhiza baviensis* growing in Thua Thien Hue, Vietnam. *Nat Pro Res* 35: 4218-4224.
- Vu THN, Pham NS, Le PC, Pham QA, Quach NT, Nguyen VT, *et al.* (2022). Distribution, cytotoxicity, and antioxidant activity of fungal endophytes isolated from *Tsuga chinensis* (Franch.) Pritz. in Ha Giang province, Vietnam. *Ann Microbiol* 72: 36.

EVALUATION OF CYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Ophiorrhiza baviensis* Drake

Nguyen Mau Hung¹, Quach Ngoc Tung^{1,2}, Ho Ngoc Anh^{1,2}, Doan Thi Nhung¹,
Do Thi Thao^{1,2}, Hoang Ha¹, Chu Hoang Ha^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Endophytic fungi from medicinal plants are prolific sources of bioactive compounds such as antibiotics, anticancer agents, and antioxidant. *Ophiorrhiza baviensis* is a valuable medicinal plant used for folk medicine, however fungal endophytes have not been reported yet. The present study was focused on isolation and evaluation of anticancer, antioxidant activities of endophytic fungi isolated from *O. baviensis* collected in Ba Vi, Hanoi. Nine endophytic fungi were isolated from roots, stems, and leaves, and number of endophytic fungi was equal for all different plant origins. Based on ITS gene sequence analyses, 9 isolates were classified into the 3 genera including *Colletotrichum* (6 strains), *Fusarium* (2 strains), and *Volutella* (1 strain). Evaluation of cytotoxicity of 9 endophytic fungal crude extracts showed that 20 µg/mL of XCB2.L4 extract exhibited the strongest cytotoxic activity against A549 cell lines with the inhibition rate of $56.97 \pm 1.44\%$. Furthermore, XCB2.L4 extract also showed strong DPPH and hydroxyl radical scavenging ability, reaching $79.09 \pm 0.83\%$ and $81.72 \pm 3.92\%$, respectively. Therefore, endophytic strain XCB2.L4 may be a potent source of anticancer and antioxidant compounds

Keywords: Antioxidant, cytotoxic activity, endophytic fungi, ITS, *Ophiorrhiza baviensis*.

* Author for correspondence: Tel: 02437562790; Email: chuhoangha@ibt.ac.vn

ANTI-CANCER EFFECTS OF TAMARIND SEED AND PULP EXTRACTS FROM *TAMARINDUS INDICA* L.

Minh Ngoc Khong¹, Quang Khai Doan¹, Tran Ngoc Anh Nguyen¹, Hoang Long Le¹,
Thi Trang Huyen Nguyen¹, Thi Mai Phuong Nguyen², Thi Hong Minh Nguyen^{1*}

¹University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Although diagnostic methods and medications have been significantly improved throughout the years, cancer still stands as one of the most concerning health-related problems worldwide. Compared to conventional anticancer therapies which hold many adverse effects, plant derivatives are preferred as they can minimize these disadvantages. Extracts of tamarind have been previously proved to have an antitumor effect, however, the mechanism underlying this phenomenon has not clearly understood. Hence, this study aimed to evaluate the cytotoxic effects of the ethanolic and methanolic extracts of tamarind seed and pulp from *Tamarindus indica* L. on two cancer cell lines A549 and HepG2 and a cell line RAW 264.7, as well as to discover whether apoptosis contributed to the death of cancer cells. The results revealed that tamarind seed and pulp extracts effectively inhibited the proliferation of cancer cells. Among 4 types of tamarind extracts, methanolic seed extract (MetOH_S) exerted the greatest inhibition on the cell viability. MeOH_S reduced the viability of A549 cells to 86% at 4 µg/mL ($p < 0.01$). Interestingly, the multinucleated morphology was dominant compared to the nuclear morphology of apoptosis in the A549 cells treated with 16 µg/mL and 256 µg/mL MetOH_S. Thus, MetOH_S was shown to have the strongest antineoplastic outcome, suggesting another mechanism: mitotic catastrophe leading to autophagy. Further studies are needed to purify compounds from methanolic extracts and clarify their anticancer effects.

Keywords: Apoptosis, cell cytotoxicity, *Tamarindus indica*, tamarind extract.

INTRODUCTION

In 2019, WHO (World Health Organization) estimated that cancer ranked in the top two leading causes of death for people under 70 years old in 55 of 183 countries, just after stroke and coronary heart disease. Cancer refers to a large group of diseases that can affect any part of the body. One of the key characteristics for defining cancer is the overgrowth of abnormal cells that can proliferate beyond their usual boundaries. The danger of these cells comes from their ability to take over the adjacent parts and spread out to the whole body at a later stage, in a process called metastasis (World Health Organization, 2021).

One important hallmark of cancer is its resistance to cell death (Hanahan and Weinberg, 2011). Hence, inducing programmed cell death (PCD) is a potential target for cancer therapy. Based on the changes in morphology, triggering signals, and which downstream caspase that it activates, PCD can be divided in three main subcategories: apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. In apoptosis, cells undergo morphological alterations including shrinkage, chromatin condensation and blebbing of plasma membrane. Eventually, this process leads to the formation of apoptotic bodies, which will be removed without causing inflammatory response. Meanwhile, autophagy is a conserved intracellular recycling system of various cytoplasmic components and a cellular self-degradation process that maintains metabolism and homeostasis. The last PCD is programmed necrosis, which occurs when there are errors in the apoptotic machinery, or when cells suffer from severe stress and cannot follow apoptotic process. In contrast to regular necrosis that involves swelling of organelles, cells in programmed necrosis die in an ordered and orchestrated manner (Mishra *et al.*, 2018).

Despite advances in medical technology, the treatment of many types of cancer still depends heavily on traditional methods, such as surgery, chemotherapy, radiotherapy, or a combination of these. Furthermore, in the later stages of cancer, chemotherapy is the most frequently used treatment (American Cancer Society, 2019). Although it results in cancer treatment, most chemotherapeutic agents have many adverse effects on patients, including anemia (Groopman and Itri, 1999), nausea, vomiting, diarrhea, constipation (Gibson, Keefe, 2006), organ damage (Thatishetty *et al.*, 2013), and hair loss (Yun, Kim, 2007). Moreover, the cancer cells seem to develop resistance against the old drugs that have been used for a long time, which is also the main cause of failure in the treatment of cancer with chemotherapeutic drugs (Liu, 2009). Hence, the demand for other substitutes with fewer side effects has become more urgent than ever. The natural compounds from plants appear to be promising candidates for improvement.

Tamarindus indica L., also known as tamarind, is a tropical plant found in many regions of the world. Its application in medicine is various. Any part of the tree can be used to treat diseases and conditions: tamarind fruit can be used as a laxative; bark, and root can be applied to relieve abdominal pain, pose anti-bacteria characteristics, aid in wound healing; seed extract has positive effects in the treatment of peptic ulcer, cancer and on nerve repair and cardiovascular system, as well as anti-oxidant and anti-diabetic properties; and leaves have been shown to protect the liver (Kuru, 2014). In the current study, anti-cancer effects of ethanolic and methanolic extracts of tamarind seeds and pulp on several cancer cell lines, including A549 (lung carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma) were investigated. At the same time, the cytotoxic effect of these extracts on macrophage cells was studied on the RAW 264.7 cell line. Furthermore, the possibility to induce apoptosis, as well as gene expression changes relating to apoptosis of these extracts, were also examined.

MATERIALS AND METHODS

Materials

A549, HepG2, and RAW 264.7 were purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). DMEM was purchased from Cytiva ((South Logan, Utah, USA). Penicillin/streptomycin, trypsin–EDTA, fetal bovine serum (FBS), thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98% (MTT powder) were purchased from Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 99.9%, Hoechst 33342 solution, DNA Gel Loading Dye (6X) were purchased from Thermo Fisher Scientific™ (Waltham, Mass, USA). Easy-RED™ Total RNA Extraction Kit, Maxime™ RT PreMix (Random Primer), RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution were purchased from iNtRON Biotechnology (Seongnam, Kyonggi-do, South Korea).

Preparation and extraction of tamarind pulp and seeds

Tamarinds were dried in 4 hours at 70°C and then cooled down to room temperature. The seeds and pulp of tamarind were manually separated from the peel. Pulp was continued to be dried in 3 hours at 60°C. Seeds were removed from the brown outer layer by hands. The pulp and seeds were then blended into fine powder and sieved through a 0.18 mm sieve. Tamarind pulp or seed powder was then dissolved in methanol or ethanol in falcon tubes. The mixtures were settled overnight at room temperature. Subsequently, the precipitated fraction at the bottom of the tube was removed. The final tamarind pulp and seed extracts (TSP and TSE) in methanol or ethanol were obtained by concentrating the leftover solution using a rotary evaporator.

Cell culture

Cells were transferred into petri dishes and cultured with fresh DMEM/F-12 medium containing 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% of penicillin-streptomycin. The cultured dishes were placed in an incubator at 37°C and 5% CO₂. The culture medium was replaced with fresh medium every three days. When cells reached almost confluence density, cells were counted and then seeded at a density of 2×10^4 cells/well in a 96-well plate.

MTT assay

Methanol and ethanol extracts of tamarind seeds and pulp were tested for their cytotoxic effect via MTT assay. After seeding the cells into a 96-well plate at a density of 2×10^4 cells/well, the cells were incubated in an incubator for 24 h. Next, cells were treated with the prepared extracts at different concentrations of 1, 4, 16, 64, 256 and 1024 µg/mL (repeated 3 times for each concentration), followed by another 1 or 3 days of incubation at 37°C in a humidified CO₂ incubator. After that, the old culture medium in each well was removed, and MTT working solution (5 mg/mL) was added. The cells were further incubated for 4 hours before the old medium was replaced with DMSO to dissolve formazan crystals. The plate was then placed on a microplate reader at 570 nm to record the absorbance of the samples. Cell viability was calculated using the following equation:

$$\text{Cell viability} = \frac{OD_{\text{treated sample}}}{OD_{\text{control (untreated)}}} \times 100\%$$

DNA (Hoechst) staining assay

Hoechst staining was used to determine the effect of the tamarind pulp and seed extracts on apoptotic cell death. Before staining, cells were washed with PBS two times and then fixed for 30 minutes. Hoechst dye stock solution was diluted at a ratio of 1:2000 in PBS to prepare Hoechst staining solution. After fixation, the cells were incubated with Hoechst staining solution for 15 minutes. Finally, the staining solution was removed and the cells were washed with PBS before being examined under a fluorescent microscope.

Statistical Analysis

The data are shown as the mean ± standard deviation (SD) for the MTT assay. Ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed in GraphPad Prism 8 software to analyze the differences between the control and the treated samples. p-values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Cytotoxic effect of ethanolic and methanolic extracts of tamarind pulp and seeds on cancer cell lines

The cytotoxic effect of ethanolic and methanolic extracts of tamarind pulp and seeds on A549 and HepG2 cell lines were examined by MTT assay. As indicated in Figure 1, on the A549 cell line, after 1 day of treatment, tamarind seed extracts (TSE) showed no significant difference between the control and treated group at concentrations lower than 64 $\mu\text{g/mL}$. However, at higher concentrations of 256 $\mu\text{g/mL}$ and 1024 $\mu\text{g/mL}$, both EtOH_S and MeOH_S remarkably decreased cell viability to approximately 70% and 30%, respectively. Nevertheless, tamarind pulp extracts (TPE) started showing an inhibition effect on A549 at a lower concentration of 4 $\mu\text{g/mL}$ for ethanolic extract and 16 $\mu\text{g/mL}$ for methanolic extract.

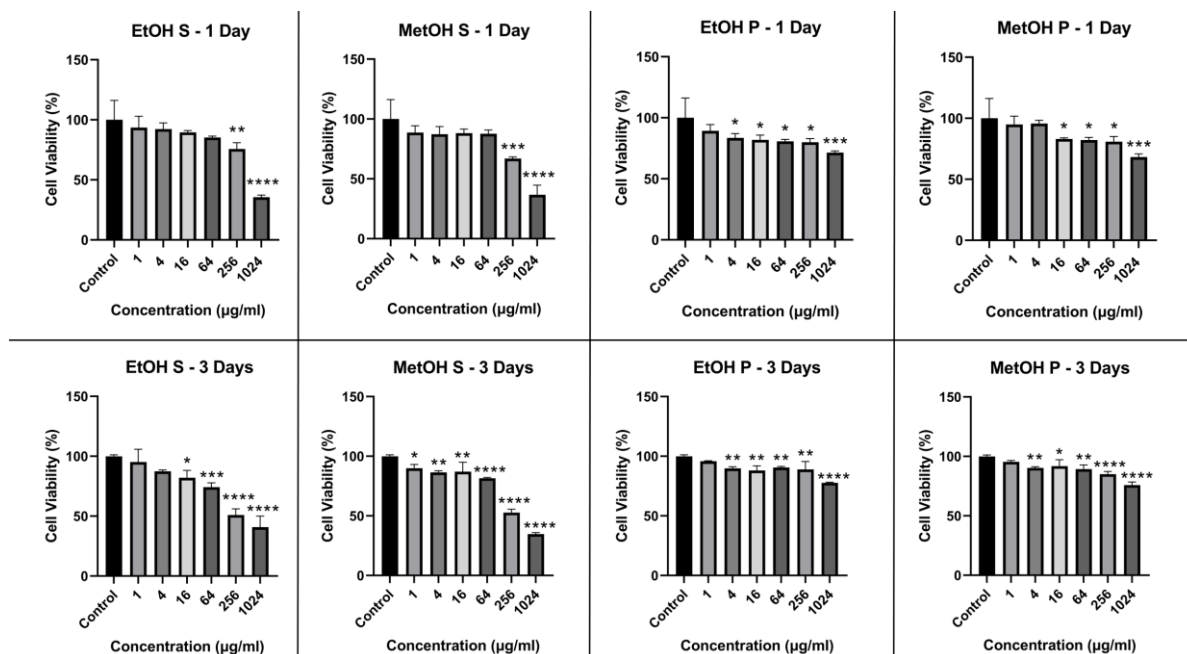


Figure 1. Cytotoxic effect of tamarind extracts on cell viability of A549 cell line after 1 day and 3 days of treatment

Cells were seeded onto a 96-well plate at density of 2×10^4 cells/well and treated with different concentrations of tamarind extracts ranging from 1 to 1024 $\mu\text{g/mL}$. Untreated cells served as control. Each bar was presented in form of means $\pm$ SD. EtOH_S: ethanol extract of tamarind seed; MetOH_S: methanol extract of tamarind seed; EtOH_P: ethanol extract of tamarind pulp; MetOH_P: methanol extract of tamarind pulp. Cell viability was determined by MTT assay. *: $p < 0.05$ vs. control; **: $p < 0.01$ vs. control; ***: $p < 0.001$ vs. control; ****: $p < 0.0001$ vs. control.

After three days of incubation, the toxicity of TSE was slightly enhanced. At a lower concentration of 16 $\mu\text{g/mL}$, EtOH_S significantly inhibited A549 cell viability by 82%, whereas MetOH_S reduced the viability of A549 cells to 86% at 4 $\mu\text{g/mL}$. In contrast, the toxic effect of TPE remained stable over 3 days. The 50% inhibition concentration (IC_{50}) of TSE by ethanol and methanol in A549 lung cancer cells were 791.2 $\mu\text{g/mL}$ and 599.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Table 1). It was clear that tamarind extracts lowered the proliferation of A549 in a dose-dependent manner.

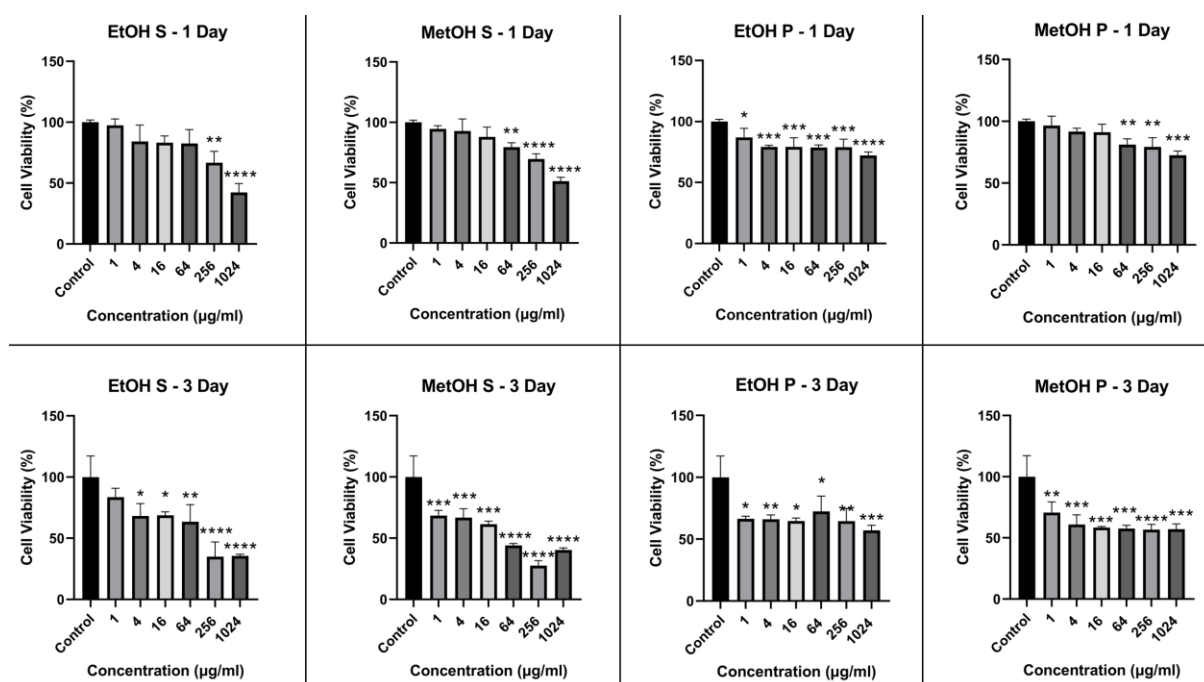


Figure 2. Cytotoxic effect of tamarind extracts on cell viability of HepG2 cell line after 1 day and 3 days of treatment

Cells were seeded onto a 96-well plate at a density of 2×10^4 cells/well and treated with different concentrations of tamarind extracts ranging from 1 to 1024 $\mu\text{g/mL}$. Untreated cells served as control. Each bar was presented in form of means $\pm$ SD. EtOH_S: ethanol extract of tamarind seed; MetOH_S: methanol extract of tamarind seed; EtOH_P: ethanol extract of tamarind pulp; MetOH_P: methanol extract of tamarind pulp. Cell viability was determined by MTT assay. *: $p < 0.05$ vs. control; **: $p < 0.01$ vs. control; ***: $p < 0.001$ vs. control; ****: $p < 0.0001$ vs. control.

The cytotoxic effects of the ethanolic and methanolic extracts of tamarind pulp and seeds on HepG2 cells are shown in Figure 2, with similar patterns as the A549 cancer cell line. After 24 h of treatment, a smaller dose of MetOH_S is required to markedly inhibit HepG2 cells' viability compared to EtOH_S, at a concentration of 64 $\mu\text{g/mL}$ and 256 $\mu\text{g/mL}$, respectively. For TPE, different concentrations from 1 $\mu\text{g/mL}$ to 1024 $\mu\text{g/mL}$ of EtOH_P significantly inhibited proliferation of HepG2 cells, whereas a minimum concentration of 64 $\mu\text{g/mL}$ MetOH_P was needed to significantly suppress cell viability of HepG2.

After 3 days of treatment, the cytotoxic effect of tamarind seed extracts on HepG2 was notably improved, especially at high concentrations of 256 $\mu\text{g/mL}$ and 1024 $\mu\text{g/mL}$. In particular, treating with EtOH_S and MetOH_S at a concentration of 256 $\mu\text{g/mL}$, cell survival rate dropped to $34.95\% \pm 11.98\%$ and $27.61\% \pm 4.07\%$, respectively. The TPE also witnessed the same trend. The IC_{50} of EtOH_S and MetOH_S in HepG2 liver cancer cells were 164.5 $\mu\text{g/mL}$ and 107.4 $\mu\text{g/mL}$ respectively, while IC_{50} of EtOH_P was 1007.2 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1).

Table 1. IC_{50} of tamarind extracts on 2 cancer cell lines A549, HepG2 after 3 days of treatment.

Samples	Cell line	IC_{50}	
		A549 ($\mu\text{g/mL}$)	HepG2 ($\mu\text{g/mL}$)
Ethanolic seed extract (EtOH_S)		791.2	164.5
Methanolic seed extract (MetOH_S)		599.5	107.4
Ethanolic pulp extract (EtOH_P)		N/A	1007.2
Methanolic pulp extract (MetOH_P)		N/A	N/A

The IC_{50} was graphed and calculated by Excel software. N/A: not available since treatment with samples in the chosen range concentrations were not able to decrease cell viability to less than 50%.

Cytotoxic effect of ethanolic and methanolic extracts of tamarind pulp and seeds on macrophage cell line

Both tamarind extracts showed no inhibitory effect on the viability of RAW 264.7 cells. Only at a very high concentration of 1024 $\mu\text{g/mL}$ of EtOH_S and EtOH_P, the proliferation of RAW 264.7 declined. In contrast, at a lower concentration of 256 $\mu\text{g/mL}$, MetOH_S started exhibiting a repressive effect on the survival rate of the RAW 264.7 cell line. Meanwhile, MetOH_P was not toxic to the cells in the range of concentrations tested.

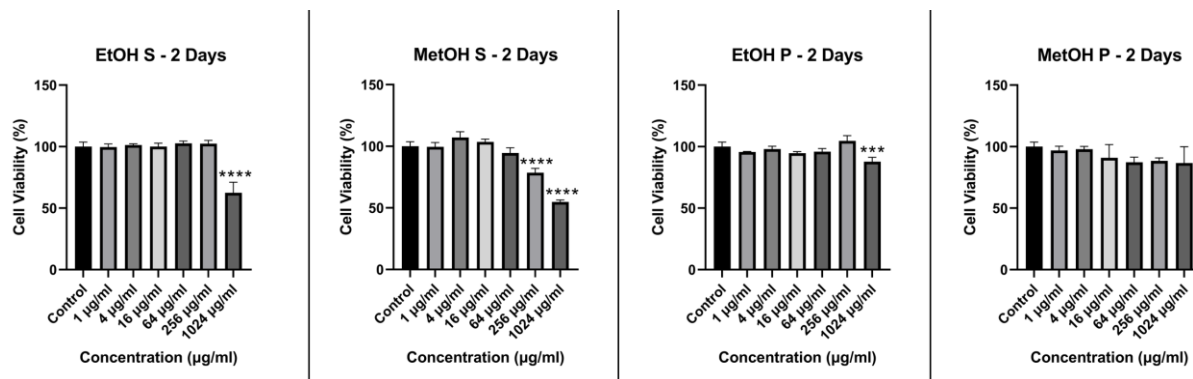


Figure 3. Cytotoxic effect of tamarind extracts on cell viability of RAW 264.7 cell line after 2 days of treatment

Cells were seeded onto a 96-well plate at density of 2×10^4 cells/well and treated with different concentrations of tamarind extracts ranging from 1 to 1024 µg/mL. Untreated cells served as control. Each bar was presented in form of means $\pm$ SD. EtOH_S: ethanol extract of tamarind seed; MetOH_S: methanol extract of tamarind seed; EtOH_P: ethanol extract of tamarind pulp; MetOH_P: methanol extract of tamarind pulp. Cell viability was determined by MTT assay. *: $p < 0.05$ vs. control; **: $p < 0.01$ vs. control; ***: $p < 0.001$ vs. control; ****: $p < 0.0001$ vs. control.

Methanolic tamarind seed extract (MetOH_S) induces nuclear damage in A549 cells

The results of the MTT assay revealed that MetOH_S was more effective in inhibiting the proliferation of cancer cells and less toxic to macrophages at low concentrations. Thus, MetOH_S at three concentrations: 1 µg/mL, 16 µg/mL, and 256 µg/mL was chosen to use in subsequent experiments. A549 cells were incubated with MetOH_S for 24 hours. After that, changes in the nuclei morphology of the cells were studied by staining with Hoechst reagent and examined under the fluorescent microscope.

To elucidate how cell viability decreased when being treated with MetOH_S, apoptosis was considered as a possible mechanism. Thus, identifying shrunken and fragmented nuclei was necessary for this step. As seen in Figure 4, there were no differences in the morphology of the nucleus between the control group and cells that were treated with 1 µg/mL of MetOH_S. As expected, at a concentration of 256 µg/mL, the nucleus was found to be fragmented into small apoptotic bodies (indicated in red arrow). Interestingly, the multinucleated cells (indicated in white arrows) prevailed at concentrations of 16 µg/mL and 256 µg/mL, not the nuclear morphology of apoptosis.

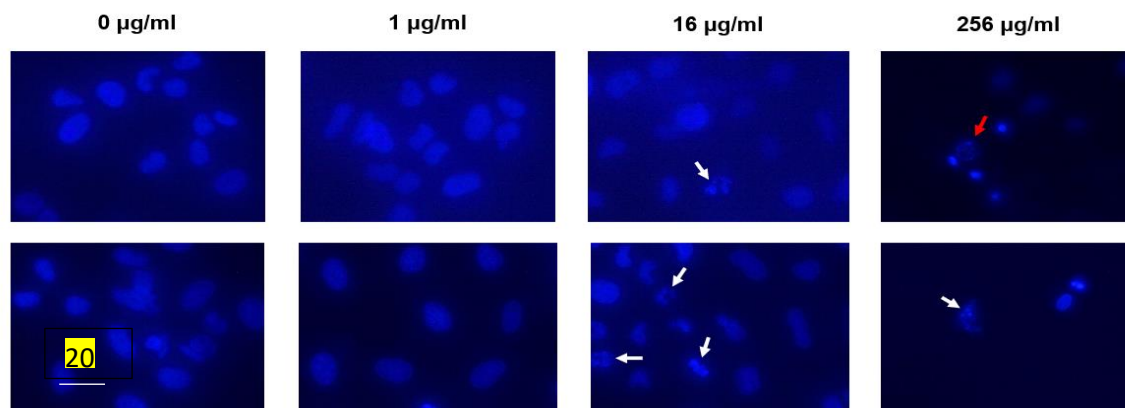


Figure 4. Effect of tamarind methanolic seed extracts (MetOH_S) on nuclear morphology of A549 cell line

Cells were treated with different concentrations of MetOH_S followed by 48 hour-incubation. Untreated cells (0 µg/mL) served as control. Cells were stained with Hoechst reagent and visualized under the fluorescent microscope. Red arrow indicated dwindled, fragmented nucleus; white arrows indicated the multinucleated. Scale bar: 20 µm.

DISCUSSION

In modern times, cancer remains one of the toughest obstacles that prevent the world population from increasing life expectancy. Besides traditional treatment of cancer such as surgery or radiation therapy, plant derivatives emerge as promising sources of drugs that can selectively target cancerous but not the macrophage cells. Thus, the side-effect of the old treatment can be minimized. From the MTT results of this study, tamarind seed and pulp

extracts were proven to have anti-cancer effect on 2 cancer cell lines: A549 and HepG2 as they could lower their cell viability to under 50% (Fig.1 and Fig.2). This is in accordance with published articles in which tamarind seed extracts were shown to inhibit the growth of Rhabdomyosarcoma cancer and Human Lymphoma cell line (Hussein *et al.*, 2017), while tamarind pulp extracts could effectively kill MCF-7 breast cancer cells (Durga *et al.*, 2020). Since the effect of MetOH_S on A549 was most significant after 24 hours of incubation, these conditions were chosen to further study the detailed mechanism.

Cancer is characterized by the unlimited proliferation of cells, which enables them to quickly invade the surrounding tissues and migrate to other parts of the body. The motivation behind this is the failure in regulating normal controls of the cells such as cell cycle arrest or programmed cell death. Thus, targeting these points has become a promising anti-cancer therapy recently (Sun and Peng, 2009). In this work, we closely examined if MetOH_S can eliminate cancer cells and whether it is related to the most popular programmed cell death pathway: apoptosis. Even though the result of nuclei staining with Hoechst reagent did show the morphology of apoptosis such as nuclear shrinkage and fragmentation, the number of the cells displaying multinucleated cells were predominant. This suggested cell underwent not only apoptosis but also mitotic catastrophe or autophagy (Figure 4).

Up to the present, many derivatives of tamarind plants have been demonstrated for cancer treatment. They are known to have different types of chemicals that can hinder cancer cell activities by inhibiting the proliferation of cancer cells or inducing apoptotic cell death (Greenwell and Rahman, 2015). Previous studies revealed that methanolic extract of tamarind seeds posed a strong anti-cancer effect on Rhabdomyosarcoma cancer and the Human Lymphoma cell line (Hussein *et al.*, 2017). In another experiment, polysaccharides extracted from tamarind seeds by petroleum ether were proved to have antitumor activity on human cancer cell lines A549, KB, MCF-7 (*in-vitro*), and murine cancer cell lines DLA and EAC (both *in-vitro* and *in-vivo*) (Aravind *et al.*, 2012). Not only seeds but also pulp of tamarind was shown to have a cytotoxic effect on cancer cells, and more specifically, on the MCF-7 cell line (Durga *et al.*, 2020). In the current study, we showed that tamarind pulp and seed extracts effectively inhibited the proliferation of A549 and HepG2 cancer cell lines while not being toxic for macrophage cells RAW 264.7. Among 4 types of extracts, MetOH_S exerted the greatest inhibition on the viability of cancer cells. All these results suggest that MetOH_S is a potential anti-cancer agent; however, further studies are needed for validation.

REFERENCES

- American Cancer Society (2019). Cancer treatment and survivorship facts and figures 2019-2021. *Am Cancer Soc*: 1-48.
- Aravind SR, Joseph MM, Varghese S, Balaram P, and Sreelekha TT (2012). Antitumor and immunopotentiating activity of polysaccharide PST001 isolated from the seed kernel of *Tamarindus indica*: An *in vivo* study in mice. *Sci World J*. 2012.
- Durga P, Malarkodi R, Sudha D, Afreen CS, Anooj ES (2020). Anticancer activity of *Tamarindus indica* fruit pulp and *Cassia auriculata* leaves extract against breast cancer cell line. *Plant archives*. 20: 7172–7174.
- Gibson RJ. and Keefe DMK (2006). Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer*. 14: 890–900.
- Greenwell M, Rahman PKSM (2015). Medicinal Plants: Their use in anticancer treatment. *Int J Pharm Sci Res*. 6: 4103.
- Groopman JE, Itri LM (1999). Chemotherapy-induced anemia in adults: Incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst*. 91: 1616-1634.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hussein SI, Yaseen NY, Jawad SQ, Abd ST (2017). Seeds of *Tamarindus indica* as anti-cancer in some cell lines. *IJABR*. 7: 360-362.
- Kuru P (2014). *Tamarindus indica* and its health related effects. *Asian Pac J Trop Biomed*. 4: 676-681.
- Liu FS (2009). Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 48: 239-244.
- Mishra AP, Salehi B, Sharifi-Rad M, Pezzani R, Kobarfard F, Sharifi-Rad J, Nigam M (2018). Programmed cell death, from a cancer perspective: An overview. *Mol Diagnosis Ther*. 22: 281–295.
- Yun SJ, Kim SJ (2007). Hair loss pattern due to chemotherapy-induced anagen effluvium: a cross-sectional observation. *Dermatology* 215: 36-40.
- Sun Y, Peng ZL (2009). Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J*. 85: 134-140.
- Thathishetty AV, Agresti N, O'Brien CB (2013). Chemotherapy-Induced Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*. 17: 671-686.
- World Health Organization (2021). *Cancer World Heal Organ*.

TÁC DỤNG CHỐNG UNG THƯ CỦA CHIẾT XUẤT HẠT VÀ CÙI ME (*Tamarindus indica* L.)

Minh Ngọc Không¹, Quang Khải Đoàn¹, Trần Ngọc Anh Nguyễn¹, Hoàng Long Lê¹,
Thị Trang Huyền Nguyễn¹, Thị Mai Phương Nguyễn², Thị Hồng Minh Nguyễn^{1*}

¹Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Mặc dù các phương pháp chẩn đoán và thuốc men đã được cải thiện đáng kể trong suốt những năm qua, ung thư vẫn là một trong những vấn đề liên quan đến sức khỏe đáng lo ngại nhất trên thế giới. So với các liệu pháp chống ung thư thông thường có nhiều tác dụng phụ, các dẫn xuất thực vật được ưa chuộng hơn vì chúng có thể giảm thiểu những nhược điểm này. Chiết xuất me trước đây đã được chứng minh là có tác dụng chống ung thư, tuy nhiên, cơ chế gây ra hiện tượng này vẫn chưa được hiểu rõ ràng. Do đó, nghiên cứu này nhằm đánh giá tác dụng gây độc tế bào của dịch chiết etanolic và metanol của hạt và cùi me trên hai dòng tế bào ung thư A549 và HepG2 và một dòng tế bào RAW 264.7, cũng như khám phá xem liệu apoptosis có góp phần vào quá trình tiêu diệt ung thư hay không. Kết quả cho thấy chiết xuất từ hạt và cùi me có hiệu quả ức chế sự phát triển của tế bào ung thư nhưng không ảnh hưởng đến tế bào RAW 264.7. Trong số 4 loại chiết xuất me, chiết xuất hạt metanic (MetOH_S) có tác dụng ức chế lớn nhất đối với khả năng sống sót của tế bào ung thư. MeOH_S làm giảm khả năng tồn tại của tế bào A549 xuống 86% ở mức 4 µg/mL ($p < 0,01$). Điều thú vị là, hình thái đa nhân được tìm thấy chủ yếu so với hình thái nhân của quá trình chết tế bào trong các tế bào A549 được xử lý với 16 µg/mL và 256 µg/mL MetOH_S. Do đó, MetOH_S đã được chứng minh là có kết quả chống ung thư mạnh nhất, gợi ý một cơ chế khác: phân bào dẫn đến bệnh tự thực. Tuy nhiên, cần nghiên cứu sâu hơn để tinh chế hợp chất từ chiết xuất metanol và làm rõ sâu sắc tác dụng chống ung thư của nó.

Từ khóa: Dịch chiết me, độc tính tế bào, sự chết tế bào theo chu trình, *Tamarindus indica*.

* Author for correspondence: Email: nguyen-thi-hong.minh@usth.edu.vn

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ KHÁNG TAMOXIFEN CỦA KHỐI TẾ BÀO UNG THƯ VÚ MCF-7 TRÊN KHUNG NÂNG ĐỖ GELATIN-ALGINATE

Nguyễn Thuần Nho*, Trần Lê Bảo Hà

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

Bộ môn Sinh lý học và Công nghệ Sinh học Động vật, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học

Phòng Thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh

TÓM TẮT

Hiện nay, nuôi cấy ba chiều (3D) trên khung nâng đỡ đã được sử dụng rất nhiều trong các nghiên cứu ung thư do mô tả tốt hơn các tương tác giữa các tế bào tương tự mô khối u *in vivo*. Hơn nữa, các mô hình thử thuốc hiện nay cũng cần mô hình *in vitro* đơn giản và giảm thí nghiệm trên mô hình động vật. Mô hình khung nâng đỡ Gelatin-Alginate đã được chứng minh giúp tế bào bám dính tăng sinh và tạo khối với dòng tế bào ung thư vú MCF-7 trong 21 ngày nuôi cấy. Tế bào tăng sinh tốt chứng tỏ mô hình này phù hợp cho sự phát triển của khối mô ung thư MCF-7. Hiệu quả kháng tamoxifen ở các nồng độ khác nhau đã được đánh giá đối với các dòng MCF-7 phát triển trên đĩa nuôi cấy hai chiều (2D) và trên khung 3D. Giá trị IC₅₀ (50% Inhibitor Concentration - nồng độ ức chế 50%) cho thấy khối trên khung hiệu quả kháng tamoxifen cao hơn so với mẫu trên đĩa nuôi cấy hai chiều. Điều này chứng minh mô hình này cải thiện đặc tính kháng thuốc tamoxifen của khối mô ung thư.

Từ khóa: Nuôi cấy ba chiều, khung nâng đỡ, Gelatin-Alginate, MCF-7, kháng tamoxifen.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, mô hình đang sử dụng trong các thử nghiệm tiền lâm sàng thường là nuôi cấy 2D và các thử nghiệm trên mô hình động vật *in vivo*. Tuy nhiên, các mô hình chưa mô tả chính xác tương tác tế bào với tế bào và tế bào với khung nền ngoại bào (ECM) ở mô hình 2D và tương tác giữa các tế bào đồng loài ở mô hình động vật nên chỉ khoảng 5% thuốc ung thư nhận được chứng nhận của Tổ chức kiểm định thuốc và thực phẩm Mỹ (FDA) (Kunnumakkara *et al.*, 2019). Ngoài ra, giả thuyết “seed and soil” khẳng định vì môi trường vật chủ (soil) phù hợp là điều kiện thuận lợi cho phát triển tối đa của tế bào ung thư (seed) (Paget, 1889). Vì thế, nuôi cấy 3D trên cơ sở sử dụng khung nâng đỡ và yếu tố tế bào đồng loài giúp giải quyết điểm yếu của các mô hình trước đây. Việc nuôi cấy 3D MCF-7 được sử dụng nhiều phương pháp như spheroid hay organ-on-the-chip... Tuy nhiên, tạo spheroid dù đơn giản nhưng khối không duy trì được lâu do thiếu oxy hoặc ngược lại, organ-on-the-chip mô tả được dòng chảy dòng khí trong cơ thể nhưng vấn đề kỹ thuật là điểm hạn chế (Huerta-Reyes, Aguilar-Rojas, 2021). Vì thế, Khung nâng đỡ không những giúp khối tế bào ung thư duy trì lâu hơn do tiếp xúc dinh dưỡng từ môi trường mà còn từ việc đơn giản trong chế tạo và đánh giá.

Khung nâng đỡ rất đa dạng từ những polymer gel đến cấu trúc khỉu bào. Bài báo sử dụng vật liệu sinh học từ polymer do phản ứng tương tự mô, tương thích sinh học và khả năng sinh miễn dịch thấp. Tuy nhiên, nhược điểm của vật liệu này là độ bền cơ tính thấp nên chúng thường được gia cường (cross-linking) bằng carbodiimide (EDC) (Spicer, 2020) Gelatin chứa nhiều đoạn phân tử protein arginine-glycine-aspartic (RGD), những protein này tạo thành ligand có khả năng gắn với các phân tử receptor bám dính, kích thích sự tăng sinh và biệt hóa tế bào gốc (Kim *et al.*, 2017). Alginate lại là vật liệu không gây đáp ứng miễn dịch, không bị phân hủy bởi các enzyme trong cơ thể và có thể gắn với các chuỗi peptide có thể liên kết với tế bào (chuỗi RGD) thông qua phản ứng gắn nhóm carboxyl của phân tử đường với nhóm amine để tạo liên kết peptide nên việc kết hợp này tạo khung Gelatin-Alginate bền vững trong thời gian dài. Khung nâng đỡ Gelatin-Alginate hỗ trợ tăng sinh cho dòng tế bào ung thư (Jiang *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018).

Tamoxifen là chất điều biến (modulator) chọn lọc của estrogen receptor (ER), giúp thuốc này có thể di chuyển vào trong nhân tác động đến nucleic acid đồng thời tác động đến các yếu tố tăng trưởng của tế bào. Vì thế dòng tế bào MCF-7 có biểu hiện dương tính với ER có thể điều trị bằng thuốc loại thuốc này (Dhiman *et al.*, 2005). Vì thế, để đánh giá khả năng khối kháng lại tamoxifen, MCF-7 sẽ được nuôi cấy tạo khối trong khung nâng đỡ Gelatin-Alginate (Nguyen *et al.*, 2023) và đánh giá tăng sinh qua khả năng giảm lượng đường trong môi trường nuôi cấy và đánh giá hiệu quả của tamoxifen trên mô hình tạo thành.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Dòng tế bào MCF-7, và thuốc tamoxifen do Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y Sinh cung cấp. Môi trường nuôi cấy DMEM, kháng sinh, FBS, Gelatin, Alginate (Sigma, Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Tạo khung nâng đỡ Gelatin-Alginate

Việc tạo khung GA đã được xây dựng theo quy trình của Yao với một số điều chỉnh (Yao *et al.*, 2019). Gelatin và Alginate được hòa tan hoàn toàn trong nước cất ở 50°C với tỷ lệ gelatin : alginate = 8:2 trong 3 giờ. Mẫu được đổ khuôn và đông lạnh ở tủ -86°C trong 24 giờ. Sau đó, mẫu đông lạnh được gia cường bằng EDC 0,3%. Sau 24 giờ, các khối GA được khử nước bằng máy đông khô. Sau đó, chiếu xạ 25kGy được sử dụng để khử trùng các mẫu GA đã đóng gói. Mẫu được nhuộm H&E để đánh giá cấu trúc và chụp SEM để quan sát bề mặt của片片 Gelatin-Alginate.

Nuôi cấy tế bào MCF-7

MCF-7 được nuôi trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, kháng sinh peniciline 1 U/mL-streptomycine 0,1 mg/mL ở 37°C, 5% CO₂. Môi trường được thay mới mỗi 4 ngày nuôi cấy.

Tạo khối tế bào MCF-7 trên khung nâng đỡ Gelatin-Alginate

Khi độ hợp dòng đạt 80%, MCF-7 được tách ra và cấy vào trong khung Gelatin-Alginate (3D) với mật độ 2×10^4 tế bào. Sau 4 ngày nuôi cấy tĩnh để ổn định tế bào trên khung nâng đỡ, phức hợp này được chuyển lên hệ thống bioreactor (Biotek, USA) và nuôi cấy trong 24 ngày.

Đánh giá tăng sinh

Sau mỗi 4 ngày nuôi cấy, mẫu được đánh giá tăng sinh bằng 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Mẫu được ủ với MTT để tạo tinh thể formazan và hòa tan tinh thể bằng DMSO/Ethanol để tạo màu xanh tím trong dung dịch. Dung dịch huyền phù được đo mật độ quang OD ở bước sóng 570 nm.

Đánh giá cấu trúc

Mẫu được cố định bằng paraformaldehyde 4 % trong 24 giờ ở 4°C. Sau đó, mẫu được gửi Phòng khám Đa khoa Đại Phước (TP Hồ Chí Minh) để đúc khối Paraffin và cắt ở kích thước 5-6 μ m để tiến hành nhuộm bằng Hematoxylin và Eosin. Mẫu ngâm paraformaldehyde 4% cũng được xử lý khử nước và đem đi chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (SEM- Jeol JSM-5300).

Thử thuốc tamoxifen

Các liều thuốc tamoxifen từ 10^{-3} đến 10^{-6} M được thử nghiệm để xác định nồng độ ức chế 50% đối với mẫu ngày 4 và mẫu ngày 14. Ngoài ra, hình ảnh nhuộm mô học cũng ghi nhận sự khác biệt giữa các mốc tác động khác nhau.

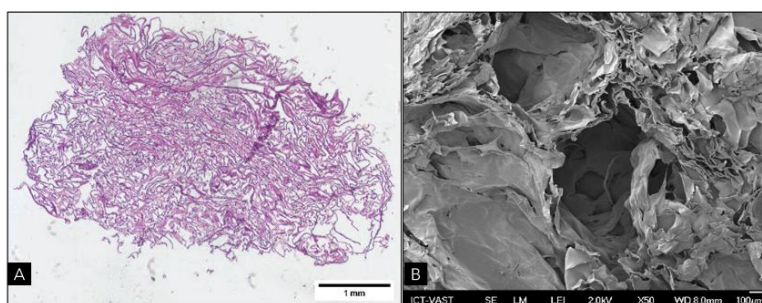
Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả sau khi thu nhận sẽ được phân tích bằng ANOVA one – way (Graphpad Prism 9). Các thí nghiệm được thực hiện được lặp 3 lần và kết quả được xem là có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khung nâng đỡ Gelatin-Alginate và tế bào MCF-7 tạo thành

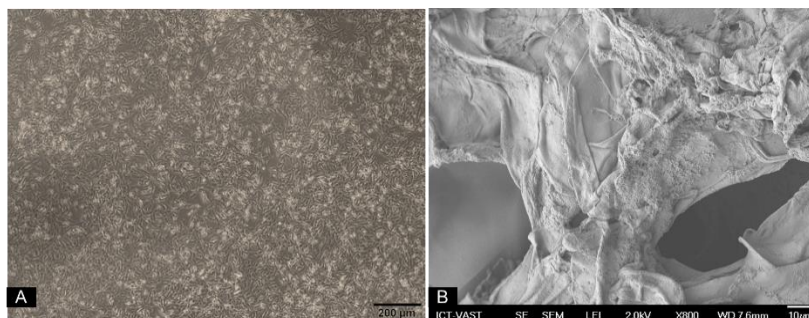
Theo kết quả nhuộm H&E, khung GA là một mạng lưới gồm các sợi màu tím liên kết với nhau với nhiều khoảng trống giữa chúng (Hình 1.A). Nhiều lớp dường như không liên quan có thể được nhìn thấy trong ảnh SEM (Hình 1.B). Kết quả là, miếng bọt biển GA bao gồm rất nhiều vi lỗ có đường kính từ 100 đến 300 μ m. Kích thước này cho phép các tế bào bám dính, nhân lên và phát triển; đồng thời, cung cấp đường cho chất dinh dưỡng và oxy đi vào GA xốp. Điều này đảm bảo sự tái phát triển của các động mạch máu cùng với mô mới.



Hình 1. Cấu trúc của khối Gelatin-Alginate

(A) Hình ảnh nhuộm Hematoxylin và Eosin với scale bar 1mm; (B) Hình ảnh chụp SEM với scale bar 100 μ m.

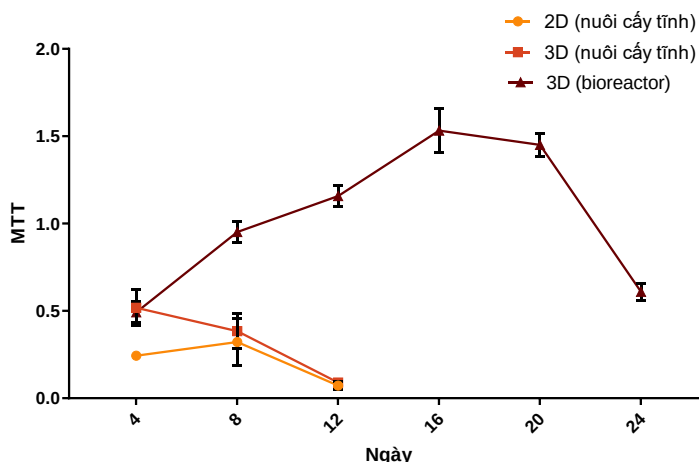
Tế bào MCF-7 có hình dáng dài với nhiều chân bám, điều này chứng tỏ tế bào có sinh trưởng tốt. Thời gian nhân đôi (doubling time) khoảng 48 giờ (Hình 2.A). Kết quả này là tương tự với kết quả của Osborne (Osborne *et al.*, 1987). Việc bám của MCF-7 lên khung GA (Hình 2.B) cũng cho thấy tế bào ung thư MCF-7 có khả năng bám dính trên khung GA.



Hình 2. Kết quả nuôi cấy tế bào MCF-7 đơn lớp trên T-25 (A) và lên khung GA (B) sau 48 giờ

Đánh giá tăng sinh của khối

Ở ngày 4 của quá trình nuôi cấy, mẫu nuôi cấy ba chiều cho thấy tăng sinh mạnh hơn so với mẫu nuôi cấy hai chiều (Hình 3). Wang cũng cho thấy sự tăng sinh tốt hơn ở mẫu 3 chiều (Wang *et al.*, 2017). Tuy nhiên, mẫu này có xu hướng giảm dần ở các ngày sau đó. Kết quả này tương tự với Dhiman với việc duy trì khối trong 5 ngày (Dhiman *et al.*, 2005; Lam-Huyen *et al.*, 2018). Tuy nhiên, khả năng tăng sinh giảm đột ngột ở những ngày sau chứng tỏ những khối MCF-7 không duy trì được lâu, điều kiện nuôi cấy chưa tốt để duy trì khối hoàn chỉnh. Hệ thống bioreactor dòng chảy giúp mô tả dòng chảy mạch máu, đưa chất dinh dưỡng vào sâu trong khối đồng thời loại bỏ chất thải một cách hiệu quả hơn. Rõ ràng, khi có yếu tố dòng chảy, mẫu tăng sinh đều đặn trong suốt 16 ngày. Sau đó, mẫu đạt trạng thái cân bằng trong 4 ngày trước khi nó giảm (Hình 3). Vì thế, việc nuôi bằng bioreactor giúp duy trì khối tốt hơn.

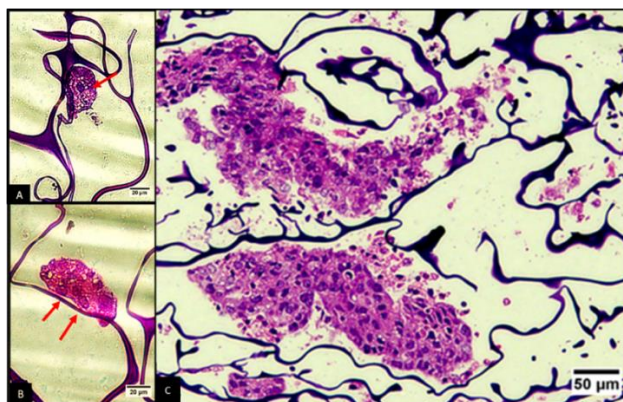


Hình 3. Hiệu quả tăng sinh của khối MCF-7 ở điều kiện nuôi cấy tĩnh và trên bioreactor (thí nghiệm đối chứng: 2D tĩnh)

Cấu trúc khối

Nhân của các tế bào ở mẫu ngày 4 ở điều kiện nuôi tĩnh vẫn đậm màu, màng nhân và hạch nhân rõ nét (Hình 4.A). Các tế bào cũng như các khối đa dạng về kích thước và kiểu hình. Tuy nhiên khi quan sát Hình 4.B, sự xuất hiện dấu hiệu của hiện tượng nhân nhạt màu dần, có những lỗ trống ở trong khối nên cần chuyển đổi sang nuôi cấy lắc hoặc bioreactor để các khối này chuyển lại trạng thái ban đầu. Điều này là hoàn toàn phù hợp với kết quả tăng sinh ở trên. Rõ ràng quan sát mẫu ở ngày 16 (Hình 4.C) cho thấy khối lan rất nhanh ở giữa cấu trúc sợi Gelatin-Alginate. Lúc này sợi GA vẫn còn giữ nguyên hình thái mặc dù có tác động từ việc lan của khối tế bào ung thư.

Khối sau 4 ngày nuôi tĩnh mới chuyển lên hệ thống bioreactor để giúp tế bào bám chắc vào khung GA trước khi khởi động hệ thống bioreactor. Sau đó, khối tăng sinh mạnh tới ngày 16 và duy trì đến ngày 20 trước khi giảm. Vì thế, thời điểm khối mới tăng sinh ngày 4 và thời điểm trước pha cân bằng 2 ngày (ngày 14) sẽ được chọn lựa để so sánh hiệu quả thử thuốc.



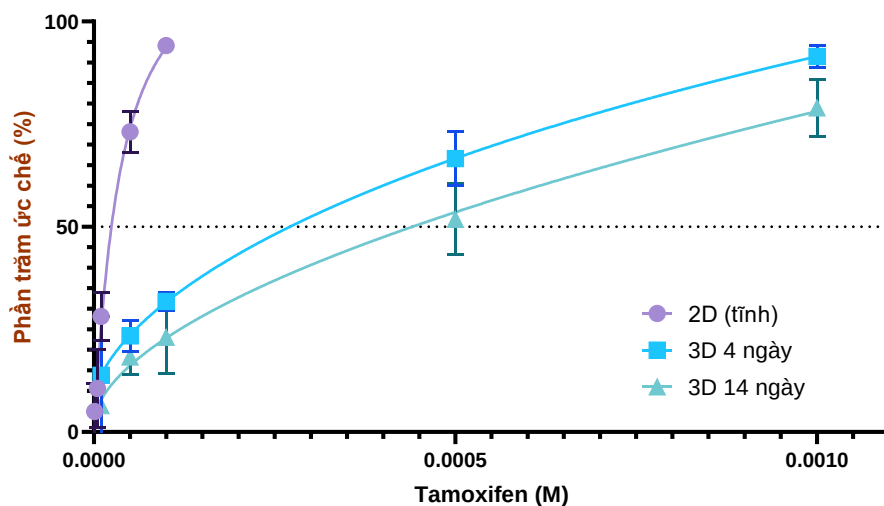
Hình 4. Cấu trúc khối MCF-7 trong khung nâng đỡ GA ở ngày 4 (A và B) và ngày 14 (C)

Kết quả thử thuốc tamoxifen

Nhằm đánh giá thời điểm để đưa thuốc, chúng tôi tiến hành thử nghiệm thuốc ở 2 thời điểm 4 ngày (thời điểm bắt đầu tăng sinh) và thời điểm 14 ngày (thời điểm đạt đỉnh sinh trưởng và chuẩn bị chuyển qua pha cân bằng) và nghiệm đối chứng 2D. IC₅₀ của mẫu 2D là khoảng 3×10^{-5} M trong khi đó mẫu 3D 4 ngày là khoảng 3×10^{-4} M và mẫu 14 ngày $4,5 \times 10^{-4}$ M (Bảng 1 và Hình 5). Từ bảng 1, nồng độ 10-3M gần như các tế bào mẫu 2D bị chết hoàn toàn trong khi đó con số này ở mẫu 3D chỉ khoảng 31% ở mẫu 4 ngày và 23% ở mẫu 14 ngày. Rõ ràng khối 3D có khả năng kháng tamoxifen tốt hơn mẫu 2D. Kết quả này tương tự với Dhiman với mẫu IC₅₀ của mẫu 3D gấp 10 lần so với mẫu 2D. Tuy nhiên nồng độ tamoxifen của Dhiman thấp hơn là do việc sử dụng tamoxifen thời gian dài hơn (Dhiman *et al.*, 2005).

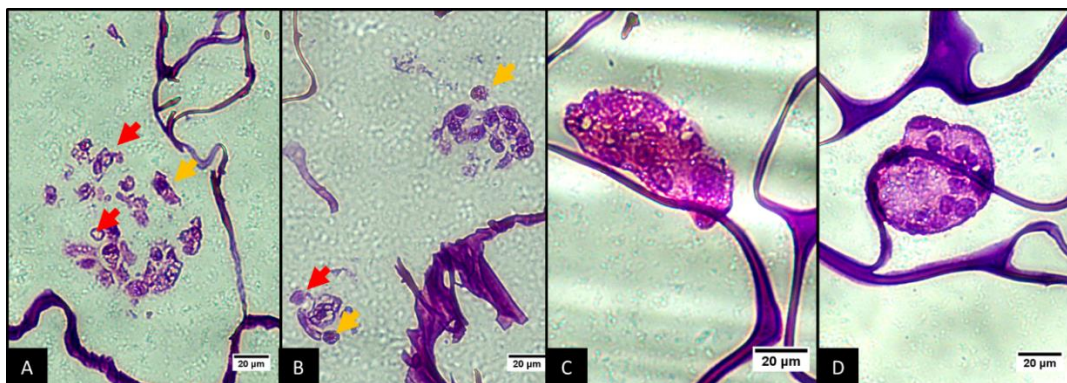
Bảng 1. Đánh giá hàm lượng ức chế IC₅₀ của mẫu MCF-7 2D, 3D 4 ngày và 3D 14 ngày

Tamoxifen	Mẫu 2D MCF-7		Mẫu 3D MCF-7 4 ngày		Mẫu 3D MCF-7 14 ngày		Khác biệt thống kê p<0.5 3D 4 và 14 ngày
Nồng độ (M)	Mean(%)	SD(%)	Mean(%)	SD(%)	Mean(%)	SD(%)	
0.001	100	0	91,51	2,19	78,97	5,68	0,0066 (**)
0.0005	100	0	66,60	5,46	51,80	7,05	0,0013 (**)
0.0001	94,13	0,61	31,79	1,83	23,11	7,17	0,0758 (ns)
0.00005	73,13	4,16	23,42	3,15	18,27	3,49	0,0859 (ns)
0.00001	28,14	4,81	17,97	7,50	8,40	4,34	0,0596 (ns)
0.000005	14,28	3,12	0	0	0	0	0
0.000001	6,65	4,49	0	0	0	0	0



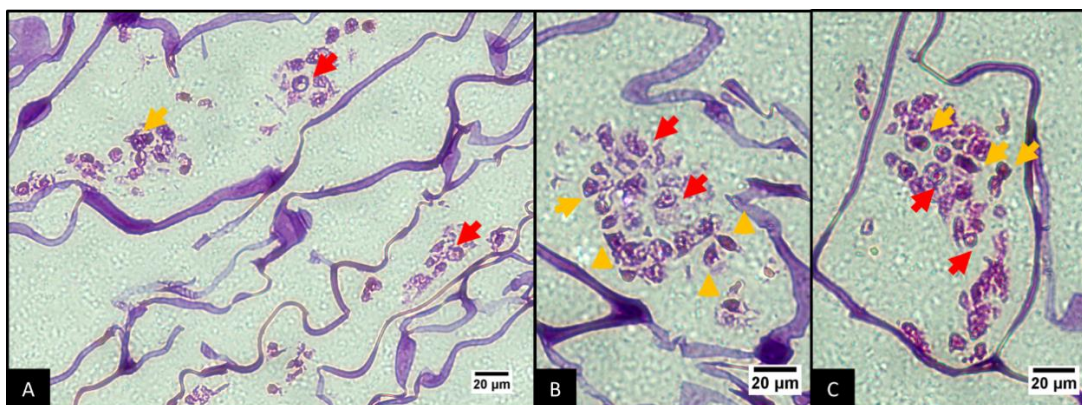
Hình 5. Biểu đồ đường cong ức chế với Tamoxifen ở mẫu ngày 4 và ngày 14

Mẫu nuôi cấy bioreactor ở ngày 14 cao hơn so với mẫu ngày 4. Taylor cho rằng tamoxifen ngăn sự tăng sinh của tế bào ở các pha sớm G_1 hoặc G_0-G_1 vì thế nếu khối có các tế bào ở giai đoạn tăng sinh thì tất nhiên nó sẽ ít bị tác động của thuốc hơn so với mẫu 4 ngày. Receptor ER của tế bào ở giai đoạn G_1 hoặc G_0-G_1 biểu hiện rất nhiều nên với lượng thuốc nhỏ nó sẽ bị tác động, trong khi đó khi ở giai đoạn tăng sinh và biến đổi, tế bào ung thư thay đổi đặc tính biểu hiện và biến đổi linh hoạt hơn phù hợp với điều kiện môi trường nên biểu hiện ER ít hơn nên ít bị tác động của tamoxifen (Taylor *et al.*, 1983).



Hình 6. Khối u khi thử thuốc ở ngày 4 với nồng độ tamoxifen 5×10^{-5} M

Hình A và B: Khối mô sau thử thuốc 48 giờ; Hình C và D: Khối mô không thử thuốc.



Hình 7. Hình ảnh khối u thử thuốc ngày 14 với nồng độ tamoxifen 5×10^{-5} M

Màu vàng: Các tế bào ung thư bình thường; Màu đỏ: Các tế bào ung thư bị chết.

Quan sát mẫu H&E ngày 4 và 14, các khối gần như bị vỡ ra rất nhiều so với mẫu đối chứng ở cùng thời điểm (Hình 6). Tamoxifen có tác dụng phá hủy gần như hoàn toàn khối u ở nồng độ $5 \cdot 10^{-5}$ M vì thể hiện tương kháng vẫn chưa quan sát thấy rõ. Vì thế, các thí nghiệm tiếp theo chúng tôi sẽ phân tích cấu trúc ở các mốc sử dụng liều thấp hơn để nhận định khả năng kháng thuốc tamoxifen của khối 1 cách rõ ràng hơn.

KẾT LUẬN

Tạo thành công khối cấu trúc ung thư MCF-7 trong khung Gelatin-Alginate duy trì bằng hệ thống bioreactor khoảng 24 ngày. Khối được thử thuốc Tamoxifen ở 2 mốc 4 và 14 ngày nuôi cấy và kết quả cho thấy mẫu có khả năng kháng thuốc cao hơn 10 lần so với mẫu 2D. Mẫu 14 ngày nuôi cấy có khả năng chống tamoxifen cao hơn các mẫu còn lại. Từ cơ sở đó, việc thử thuốc sẽ tiến hành đối với các mốc thời gian khác nhau nhằm đánh giá toàn diện hơn tác động của thuốc ở các thời điểm khác nhau của khối cũng như so sánh mô hình này với mô hình *in vivo* để đủ cơ sở tiệm cận với việc tương đương với khối mô ung thư *in vivo*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dhiman HK, Ray AR, Panda AK (2005) Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials* 26: (9) 979-986.
- Huerta-Reyes M, Aguilar-Rojas A (2021) Three-dimensional models to study breast cancer. *Inter J Oncol* 58: (3) 331-343.
- Jiang T, Munguia-Lopez JG, Flores-Torres S, Grant J, Vijayakumar S, Leon-Rodriguez AD, Kinsella JM (2017) Directing the self-assembly of tumour spheroids by bioprinting cellular heterogeneous models within alginate/gelatin hydrogels. *Sci Rep* 7: (1) 4575.

- Kim AY, Kim Y, Lee SH, Yoon Y, Kim W-H, Kweon O-K (2017) Effect of gelatin on osteogenic cell sheet formation using canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 26: (1) 115-123.
- Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Sailo BL, Roy NK, Thakur KK, Banik K, Shakibaei M, Gupta SC, Aggarwal BB (2019) Cancer drug development: The missing links. *Exper Biol Med* 244: (8) 663-689.
- Lam-Huyen NT, Truong NS, TP T (2018) Anti-cancer Effect of Xao Tam Phan Paramignya trimera Methanol Root Extract on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 in 3D Model. *Adv Exper Med Biol*.
- Nguyen NT, Doan VN, Tran HLB (2018) Generating *in vitro* solid tumor models on gelatin-alginate scaffolds. *Vietnam J Sci, Technol Engin* 60: (4) 25-30.
- Nguyen NT, Doan VN, Tran HLB (2023) Role of Co-culture with fibroblasts and dynamic culture systems in 3-dimensional MCF-7 tumor model maturation. *Trend Sci* 20: (2) 3892-3892.
- Osborne CK, Hobbs K, Trent JM (1987) Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* 9: 111-121.
- Page S (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133: (3421) 571-573.
- Spicer CD (2020) Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice. *Polymer Chem* 11: (2) 184-219.
- Taylor IW, Hodson PJ, Green MD, Sutherland RL (1983) Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 43: (9) 4007-4010.
- Wang H, Qian J, Zhang Y, Xu W, Xiao J, Suo A (2017) Growth of MCF-7 breast cancer cells and efficacy of anti-angiogenic agents in a hydroxyethyl chitosan/glycidyl methacrylate hydrogel. *Cancer Cell Inter* 17: (1) 55.
- Yao B, Hu T, Cui X, Song W, Fu X, Huang SJB (2019) Enzymatically degradable alginate/gelatin bioink promotes cellular behavior and degradation *in vitro* and *in vivo*. 11: (4) 045020.

EVALUATION OF TAMOXIFEN RESISTANCE OF MCF-7 BREAST CANCER CELLS ON GELATIN-ALGINATE SCAFFOLD

Nho Thuan Nguyen*, Ha Le Bao Tran

Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science-VNUHCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

Department of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science -VNUHCM, Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

SUMMARY

Currently, three-dimensional (3D) culture on scaffolds has been widely used in cancer research because it better describes the interactions between cells similar to *in vivo* tumor tissue. Furthermore, current drug testing models also need simple *in vitro* models and reduced experiments on animal models. The Gelatin-Alginate support model has been proven to help cells adhere, proliferate, and form aggregates with the MCF-7 breast cancer cell line in 21 days of culture. Good cell proliferation proves that this model is suitable for the development of MCF-7 cancer tissue. Tamoxifen resistance at different concentrations was evaluated for MCF-7 lines grown on culture plates (2D) and on 3D scaffolds. The IC₅₀ value (50% inhibition concentration) shows that the block on the frame has a higher tamoxifen resistance effect compared to the sample on the 2D culture plate. This proves that this model improves the drug-resistance properties of cancerous tissue.

Keywords: Three-dimensional culture, scaffold, Gelatin-Alginate, MCF-7, tamoxifen resistance.

* Author for correspondence: Tel: 0382908849; Email: ngtnho@hcmus.edu.vn

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA VI KHUẨN *Staphylococcus* COAGULASE ÂM TÍNH TRÊN DA NGƯỜI KHỎE MẠNH

Nguyễn Thị Châu Anh¹, Nguyễn Thị Minh Nga², Nguyễn Đức Huy², Dương Thị Ngọc Mai¹,
Nguyễn Thị Khánh Linh¹, Nguyễn Thị Tuyền¹, Đinh Thị Hải¹, Hoàng Thị Minh Ngọc¹, Trần Đình Bình¹

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

²Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Staphylococcus coagulase âm tính (CoNS) được xem là nhóm vi sinh vật không gây bệnh cư trú trên da người, có tác dụng ức chế nhóm vi sinh gây bệnh như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* kể cả nhóm kháng kháng sinh nhờ khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn bacteriocin. Trong nghiên cứu này, các *Staphylococcus coagulase* âm tính tiềm năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh được phân lập từ hệ vi sinh vật trên da người khỏe mạnh trong độ tuổi từ 18-65. Kết quả phân lập được 1 chủng tiềm năng được kí hiệu 128-XN2B 11.2 có khả năng sinh tổng hợp các chất đối kháng *E. coli* và *S. aureus*. Phân tích trình tự nucleotide vùng 16S rDNA cho thấy chủng 128-XN2B 11.2 tương đồng cao với *Staphylococcus hominis* là loài vi khuẩn tiềm năng trong việc tạo ra các bacteriocin và các chất kháng khuẩn đối kháng vi sinh vật gây hại ký sinh trên da người.

Từ khóa: *Staphylococcus hominis*, CoNS, đối kháng, da người khỏe mạnh.

MỞ ĐẦU

Hệ vi sinh vật ở con người là một yếu tố quan trọng và có tác động lớn đến sức khỏe cũng như cuộc sống của mỗi người. Trong các nhóm vi sinh vật trên cơ thể người thì các vi khuẩn chí là nhóm vi khuẩn rất đa dạng và có thể đem lại một số lợi ích cho sức khỏe. Chúng có khả năng sản sinh nhiều hoạt chất kháng khuẩn như lactic acid, bacteriocin tạo môi trường bất lợi, từ đó ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh. Trong số các vi khuẩn được tìm thấy trên da, các chủng tụ cầu chiếm đa số và đặc biệt là nhóm vi khuẩn tụ cầu không có khả năng sinh coagulase (Negative Coagulase *Staphylococcus*: CoNS). Những tụ cầu coagulase âm tính này được xem là các vi khuẩn không gây bệnh và được chứng minh là có thể tiết ra một số bacteriocin gọi là Staphylococcin có khả năng ức chế hiệu quả với nhiều vi khuẩn gây bệnh hay gặp như *Staphylococcus aureus*, thậm chí kể cả *S. aureus* kháng methicillin (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Nakatsuji et al., 2017).

Bacteriocin có bản chất là peptide kháng khuẩn sinh ra bởi vi khuẩn để chống lại vi khuẩn khác. Đại đa số các loài vi khuẩn đường như có thể sản xuất ít nhất một bacteriocin, hầu hết trong số đó chưa được biết. Bacteriocin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và cơ chế miễn dịch đặc hiệu đối với các chủng có quan hệ gần gũi với vi khuẩn sản xuất (Darbandi et al., 2022). Trong tình hình kháng thuốc đang trở thành nguy cơ nặng nề cho y học, việc xác định được các bacteriocin có hoạt độ kháng khuẩn cao từ các chủng vi khuẩn tụ cầu không gây bệnh trên da là cần thiết nhằm đưa ra giải pháp hữu hiệu thay thế kháng sinh trong điều trị nhiễm trùng. Vì vậy, hướng nghiên cứu tìm kiếm vi sinh vật không gây hại cho con người đồng thời sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng vi sinh vật gây hại là hướng đi tiềm năng tạo ra các sản phẩm hỗ trợ trong điều trị nhiễm trùng trong y học.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phân lập các chủng vi khuẩn coagulase âm tính trên da người

Lấy mẫu nghiệm phết trên da của 48 người khỏe mạnh từ 18-65 tuổi (gồm 41 nữ, 7 nam) tại Khoa Vi sinh - Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế, mẫu sau khi lấy đặt vào môi trường vận chuyển và được chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 12 giờ ở 4°C. Mẫu nghiệm phết trên da được lấy bằng cách sử dụng que tăm bông vô trùng có nhúng nước muối vô trùng, phết các vị trí trên da của mỗi người tham gia nghiên cứu gồm: vùng sau tai, vùng lòng bàn tay, kẽ ngón tay, đầu móng tay, đầu ngón tay, bên cánh mũi, nếp gấp cổ và vùng giữa các ngón chân. Mẫu nghiệm được tiến hành cấy lên đĩa môi trường thạch dinh dưỡng và ủ 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc được tiến hành nhuộm Gram nhằm xác định cầu khuẩn Gram dương. Sau đó, xét nghiệm catalase (+) được tiến hành để phát hiện *Staphylococcus* spp. Sau cùng, vi khuẩn CoNS cần tìm được xác định dựa vào xét nghiệm coagulase ống nghiệm (-) (Sadiya et al., 2019).

Khảo sát khả năng đối kháng từ các chủng coagulase âm tính phân lập

Các chủng CoNS phân lập được từ mẫu nghiệm phết trên da người khỏe mạnh sẽ được xác định khả năng đối kháng vi sinh vật gây bệnh thông qua các chủng chỉ thị bao gồm: *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và *E. coli* ATCC 25922 bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (O'Sullivan et al., 2019);

(Otto, 2010). Khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trên môi trường BHI (Merck, Đức), trong ống nghiệm với thể tích 5 mL trong 24 giờ ở 37°C. Sau đó, dịch nuôi cấy được thu hồi bằng ly tâm 10.000v/phút ở 10 phút và loại bỏ tế bào. Dịch nuôi cấy sau loại bỏ tế bào được điều chỉnh pH đến giá trị 6,9-7,2 bằng NaOH 1M và bảo quản lạnh ở 4°C. 50 µl dung dịch nuôi cấy đã loại bỏ tế bào được đưa vào mỗi giếng của đĩa thạch đã được cấy trải đồng vi khuẩn chỉ thị. Tiến hành ủ mẫu ở 4°C trong 1 giờ cho dung dịch trong giếng khuếch tán và tiếp tục ủ ở 37°C, 24 giờ. Quan sát và đo kích thước vòng vô khuẩn quanh giếng để đánh giá khả năng kháng khuẩn (O'Sullivan *et al.*, 2019); (Nakamura *et al.*, 1983).

Định danh phân tử các chủng phân lập

Các chủng vi khuẩn coagulase âm tính đối kháng vi khuẩn chỉ thị được nuôi cấy trong ống nghiệm chứa 5 mL môi trường Luria-Bertani và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24h. Sinh khối tế bào được thu nhận bằng ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. DNA tổng số được tách chiết bằng bộ KIT DNA Genomic ToPURE (ABT, Việt Nam) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự gen 16S rDNA của chủng vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng các đoạn mồi 27F: (5' AGATTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R: (5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3'). Thành phần phản ứng PCR bao gồm 30 µl 2× Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA), 2,5 µl DNA, 5 µl mỗi nồng độ 10 µM và 17,5 µl nước cất vô trùng. Chu trình PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau ở 95°C/ 10 phút, sau đó là 30 chu kỳ ở 94°C/ 1 phút, 53°C/ 30 giây và ở 72°C/ 1 phút và 1 chu kỳ ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm sau khuếch đại PCR được kiểm tra điện di trên gel agarose TAE 1% (w/v) và được nhuộm bằng thuốc nhuộm SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Canada). Các sản phẩm PCR được khuếch đại, gửi đến công ty dịch vụ giải trình tự (Firstbase, Malaysia) để giải trình tự.

Các trình tự nucleotide vùng 16s rDNA được xử lý bằng để thu nhận các trình đồng thuận cho từng phân đoạn bằng phần mềm BioEdit v7.0.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) (Hall, 1999). Trình tự nucleotide vùng 16S rDNA được so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI) bằng công cụ Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) để căn chỉnh bằng thuật toán MUSCLE bằng phần mềm MEGA 7.0. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa theo thuật toán Maximum Likelihood kết hợp phần mềm IQ - TREE v2.1.3 (Minh *et al.*, 2020) với giá trị bootstrap 1000 và xác suất hậu nghiệm aBayesian. Cây phát sinh loài được hiển thị bằng phần mềm Interactive Tree of Life (ITOL) v6 (Letunic, Bork, 2021).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập thư viện *Staphylococcus coagulase* âm tính

Từ kết quả nuôi cấy các mẫu nghiệm dịch phết da từ người khỏe mạnh thu thập được 126 chủng vi khuẩn *Staphylococcus coagulase* âm tính được phân lập dựa trên các đặc điểm hình thái (khuẩn lạc tròn, bờ trơn, màu trắng đục, Gram dương), đặc điểm hóa sinh (catalase và coagulase âm tính), cho thấy *Staphylococcus coagulase* âm tính chiếm tỷ lệ 97,14% trên tổng số vi sinh vật xuất hiện trên đĩa môi trường nuôi cấy (Bảng 1). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu phân lập *Staphylococcus coagulase* âm tính từ mẫu phết da của người khỏe mạnh (Otto, 2010; Goering *et al.*, 2019).

Bảng 1. Phân bố các nhóm vi khuẩn phân lập trên da

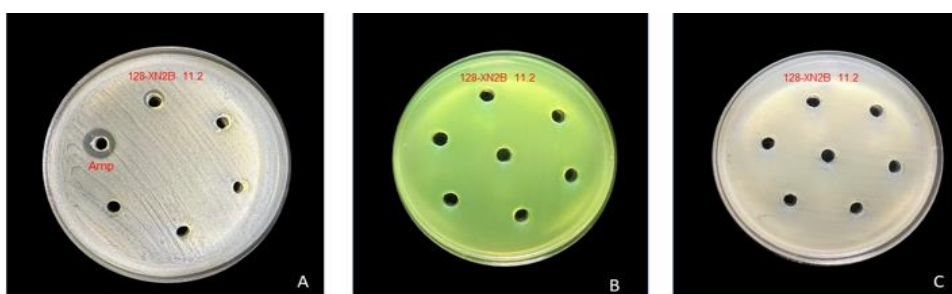
STT	Nhóm vi khuẩn	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	02	1,51%
2	<i>Staphylococcus coagulase</i> âm tính (CoNS)	126	95,46%
3	Trực khuẩn	03	2,27%
4	Nấm	01	0,76%
Tổng		132	100%

Xác định khả năng đối kháng từ thư viện *Staphylococcus coagulase* âm tính

Tất cả 126 chủng vi khuẩn *Staphylococcus coagulase* âm tính được kiểm tra khả năng đối kháng bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và được trình bày ở Bảng 2. Qua quan sát vòng kháng khuẩn xuất hiện trên đĩa thạch có 01 chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính ức chế *S. aureus*. Tuy nhiên, sự đối kháng với *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 không rõ ràng. Chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính được ký hiệu là 128-XN2B 11.2 tạo đường kính vòng vô khuẩn đối kháng *S. aureus* với kích thước là 8 mm (Bảng 2 và Hình 1).

Bảng 2. Tỷ lệ các chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính có hoạt tính đối kháng

STT	<i>Staphylococcus coagulase</i> âm tính	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Hoạt tính đối kháng	01	0,8 %
2	Không có hoạt tính đối kháng	125	99,2 %
Tổng cộng		126	100%



Hình 1. Khả năng đối kháng chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính

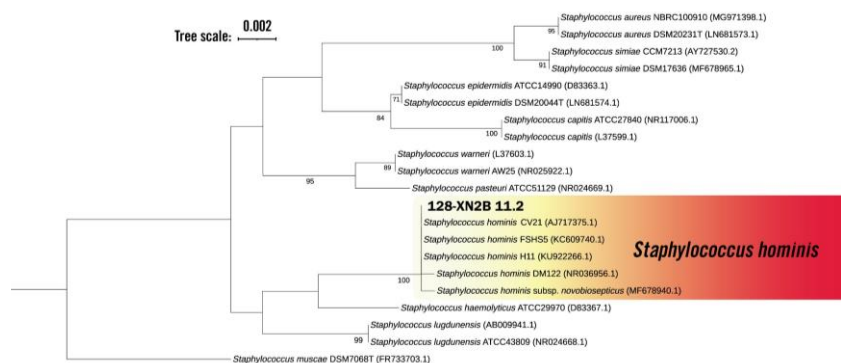
A. Sự đối kháng của chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính với *S. aureus* ATCC 25923, B. Sự đối kháng của chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính với *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, C. Sự đối kháng của chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính với *Escherichia coli* ATCC 25922

Định danh phân tử chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính

Chủng vi khuẩn 128-XN2B 11.2 được tách chiết DNA tổng số và khuếch đại trình tự nucleotide vùng 16S rDNA thu được sản phẩm PCR với kích thước khoảng 1,4 kb. Sau khi giải trình tự nucleotide sản phẩm PCR đã thu được đoạn DNA dài 1407 bp và sử dụng để so sánh với các trình tự nucleotide tham chiếu của các chủng chuẩn trên Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả so sánh cho thấy chủng 128-XN2B 11.2 tương đồng cao với chủng *Staphylococcus hominis* DM122 ATCC 27844 (NR036956) và chủng *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* ATCC 700236 (MF678940) với tỷ lệ tương đồng 99,79% và 99,92%. Bên cạnh đó chủng 128-XN2B 11.2 cũng tương đồng 100% với các chủng phân lập ở các nghiên cứu khác bao gồm: *St. hominis* CV21, *S. hominis* FSHS5, *S. hominis* H11 (Bảng 3).

Bảng 3. Mức độ tương đồng và bao phủ vùng 16S rDNA của chủng 128-XN2B 11.2 với chủng chuẩn trên Genbank

STT	Loài	Mã số Genbank	Kích thước vùng (bp)	Tỷ lệ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>S. hominis</i> CV21	AJ717375	1529	100	100
2	<i>S. hominis</i> FSHS5	KC609740	1474	100	100
3	<i>S. hominis</i> H11	KU922266	1426	99	100
4	<i>S. hominis</i> DM122	NR036956	1544	100	99,79
5	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	MF678940	1283	100	99,92



Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự nucleotide 16S rDNA của chủng phân lập và các chủng tham chiếu cho thấy vị trí của các chủng trong chi *Staphylococcus*.

Kết quả ở hình 2, cho thấy chủng 128-XN2B 11.2 tạo thành nhóm riêng biệt với các chủng thuộc loài *S. hominis* khi so sánh trình tự 16S rDNA. Như vậy, kết hợp với các đặc điểm hình thái, chủng 128-XN2B 11.2 được kết luận là *S. hominis*. Báo cáo của Becker và đồng tác giả (2014) mô tả *S. hominis* là tụ cầu khuẩn âm tính coagulase (loại CoNS) có trong hệ vi sinh vật ở da người khỏe mạnh (Becker *et al.*, 2014) (Kloos, Schleifer, 1975). Nghiên cứu của O'Sullivan và đồng tác giả (2019) ghi nhận về phân lập chủng *S. hominis* âm tính với coagulase từ da người khỏe mạnh đồng thời sinh tổng hợp chất kháng khuẩn từ đó ức chế vi khuẩn Gram dương như *Propionibacteria acnes* (hay *Cutibacteria acnes*), *Staphylococcus epidermidis* và *S. aureus* kháng methicillin (O'Sullivan *et al.*, 2019). Nghiên cứu của Nakatsuji và đồng tác giả (2017) cũng phát hiện *S. hominis* sinh tổng hợp các phân tử kháng khuẩn mạnh được gọi là lantibamel khi kết hợp với LL-37, một phân tử kháng khuẩn được tạo ra bởi hệ thống miễn dịch của con người sẽ ức chế tốt *S. aureus* (Nakatsuji *et al.*, 2017).

KẾT LUẬN

Từ thư viện 126 chủng vi khuẩn *Staphylococcus coagulase* âm tính phân lập trên da người khỏe mạnh đã chọn ra được chủng có khả năng đối kháng với *S. aureus*. Kết hợp dữ liệu định danh phân tử và đặc điểm hình thái, sinh hóa cho thấy chủng 128-XN2B 11.2 phân lập thuộc loài *S. hominis*. Chủng phân lập có tiềm năng trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định chính xác các hoạt chất kháng khuẩn, từ đó tạo cơ sở tạo ra các chế phẩm hỗ trợ chống nhiễm trùng do vi khuẩn *S. aureus*.

Lời cảm ơn: Đây là kết quả của Đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ mã số B2023-DHH-09, xin cảm ơn các thành viên nghiên cứu của đề tài và sự hỗ trợ của Ban khoa học công nghệ Đại học Huế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Becker K, Heilmann C, Peters G (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27: (4) 870-926.
- Darbandi A, Asadi A, Mahdizade AM, Ohadi E, Talebi M, Halaj ZM, Kakanj M (2022) Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J Clin Labo Anal* 36: (1).
- Goering R, Dockrell HM, Zuckerman M, Chiodini PL (2019) *Mims' Medical Microbiology and Immunology*. Elsevier.
- Hall TA (1999) BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Kloos WE, Schleifer KH (1975) Isolation and characterization of staphylococci from human skin. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Bacteriol* 25: 62-79.
- Letunic I, Bork P (2021) Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* 49 (1) 293-296.
- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R (2020) IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol* 37: (5) 1530-1534.
- Nakamura T, Yamazaki N, Taniguchi H, Fujimura S (1983) Production, purification, and properties of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* isolated from saliva. *Infect Imm* 39: (2) 609-614.
- Nakatsuji T, Chen TH, Narala S CK, Two AM, Yun T, Shafiq F, Kotol PF, Bouslimani A, Melnik AV, Latif H, Kim JN, Lockhart A, Artis K, David G, Taylor P, Streib J, Dorrestein PC, Grier A, Gill SR, Zengler K, Hata TR, Leung DY, Gallo RL (2017) Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci Transl Med* 9: (378).
- O'Sullivan JN, Rea MC, O'Connor PM, Hill C, Ross RP (2019) Human skin microbiota is a rich source of bacteriocin-producing staphylococci that kill human pathogens. *FEMS Microbiol Ecol* 95 (2) 1-10.
- Otto M (2010) *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol* 5: (2) 183-195.
- Sadiya MI, Ismail A, Sani MY, Muhammad A (2019) Isolation and characterization of *Staphylococcus species* from clinical samples obtained from some hospitals in Kano Metropolis, Nigeria. *ARC J Urol* 4: (3) 1-6.

STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVE STRAINS ON HEALTHY HUMAN SKIN

Nguyen Thi Chau Anh¹, Nguyen Thi Minh Nga², Nguyen Đức Huy², Dương Thị Ngọc Mai¹,
 Nguyen Thi Khanh Linh¹, Nguyen Thi Tuyen¹, Đinh Thị Hải¹, Hoàng Thị Minh Ngọc¹, Trần Đình Bình^{1*}

¹Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

²Institute of Biotechnology, Hue University

SUMMARY

Coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) are considered a group of non-pathogenic microorganisms that reside on human skin and have the ability to produce antibacterial substances (bacteriocin) to inhibit pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or antibiotic-resistant microorganisms. In this study, potential strain *Staphylococcus coagulase*-negative which against pathogenic bacteria were isolated from the skin microbiota of healthy human aged 18-65 years. The results showed that 126 strains of CoNS were isolated from healthy human skin in which it found a *S. aureus* antagonistic 128-XN2B 11.2 strain. Nucleotide sequence analysis of the 16S rDNA region showed that strain 128-XN2B 11.2 was highly similar to *Staphylococcus hominis*, a potential bacterial strain in producing bacteriocins and potent antibacterial substances.

Keywords: *Staphylococcus hominis*, CoNS, antagonistic, healthy human skin.

* Author for correspondence: Tel: 0913363930; Email: tdbinh@huemed-univ.edu.vn

XÂY DỰNG PHỨC HỢP TƯƠNG TÁC GIỮA GLYCOPROTEIN 2 CỦA NGƯỜI (hGP2) VÀ PEPTIDE GB1 BẰNG CÁC CÔNG CỤ SINH HỌC TÍNH TOÁN

Lý Cẩm Tú^{1,2,3}, Đinh Thuận Thiên^{1,2,3}, Trần Văn Hiếu^{1,2,3*}

¹Phòng thí nghiệm Cầm biến Sinh học; Bộ môn Công nghệ Sinh học phân tử - Môi trường, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

³Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Vaccine đường uống đã được phát triển và chứng minh là giải pháp tối ưu cho các bệnh nhiễm trùng đường ruột nhờ khả năng kích thích sản xuất kháng thể IgA dạng tiết, từ đó tăng cường các phản ứng miễn dịch niêm mạc. Tuy nhiên, các yếu tố vật lý khắc nghiệt của đường tiêu hóa như pH và enzyme tiêu hóa có thể dẫn đến sự phân hủy kháng nguyên. Hơn nữa, do diện tích bề mặt lớn của ruột và đặc tính dung nạp miễn dịch của các tế bào ruột, kháng nguyên thường bị phân tán và khó có thể gây ra phản ứng miễn dịch một cách hiệu quả. Đã có nhiều nghiên cứu vận dụng chiến lược nhắm mục tiêu tế bào M thông qua tương tác giữa phối tử và thụ thể biểu hiện bề mặt nhằm tăng cường hiệu quả hấp thu kháng nguyên của vaccine uống trong ruột. Trước đây, ba peptide liên kết GP2 (GP2-binding peptide - GbP) đã được đánh giá là có khả năng tương tác với GP2 và tăng cường sự hấp thu kháng nguyên của tế bào M, với Gb1 đem lại kết quả tương tác tốt nhất. Vì thế, trong nghiên cứu này, tương tác giữa ba peptide Gb và thụ thể hGP2 được đánh giá và phân tích thông qua một số phần mềm Tin sinh và công cụ Sinh học tính toán bao gồm mô phỏng cấu trúc và docking phân tử. Dựa vào công cụ mô phỏng, cấu trúc 3D của protein hGP2 và ba GbP đã được xây dựng với độ tin cậy cao. Kết quả docking cho thấy tương tác giữa peptide Gb1 và hGP2 được ổn định bằng sáu liên kết hydro. Các kết quả này là tiền đề để thiết kế thêm những peptide mới có ái lực cao hơn với hGP2 nhằm phục vụ cho quá trình phát triển vaccine uống sau này.

Từ khóa: Docking phân tử, Glycoprotein GP2, Gb1, mô phỏng cấu trúc, tin sinh học, vaccine uống.

GIỚI THIỆU

Vaccine đường uống được đề xuất là biện pháp hiệu quả để ngăn ngừa các bệnh xâm nhiễm đường tiêu hóa nhờ khả năng gây miễn dịch niêm mạc bằng cách kích thích hệ miễn dịch màng nhầy tạo ra kháng thể IgA dạng tiết (SIgA) cùng với khả năng miễn dịch toàn thân. SIgA hỗ trợ loại bỏ các kháng nguyên và mầm bệnh khỏi ruột bằng cách ngăn chặn sự tương tác của chúng với các thụ thể ở niêm mạc qua một quá trình được gọi là "loại trừ miễn dịch" (Mantis *et al.*, 2011). Tuy nhiên, vaccine đường uống phải đối mặt với những thách thức trong môi trường axit của đường tiêu hóa, nơi các kháng nguyên có thể bị phân hủy bởi các enzyme tiêu hóa; xu hướng dung nạp miễn dịch và khả năng phân tán kháng nguyên do diện tích rộng lớn của bề mặt lòng ruột đòi hỏi lượng kháng nguyên cao hơn trong vaccine uống để tạo ra phản ứng miễn dịch mạnh mẽ so với vaccine tiêm (Weiner *et al.*, 2011; Van der Weken *et al.*, 2020). Việc tăng cường lượng kháng nguyên sẽ gây ra phát sinh về chi phí đồng thời cũng sẽ gia tăng dung nạp miễn dịch; do vậy, một chiến lược đầy hứa hẹn để tăng cường hấp thu kháng nguyên và đáp ứng miễn dịch là tận dụng các tương tác phối tử-thụ thể nhằm nhắm trúng đích tế bào M trong biểu mô liên kết nang (FAE) của các mảng Peyer (Yamamoto *et al.*, 2012; Zafar *et al.*, 2023).

Các nghiên cứu trước đây đã xác định được các phối tử bao gồm lectin, kháng thể, peptide, protein, peptidoglycan và lipopolysaccharide cho thụ thể biểu hiện trên bề mặt tế bào M; trong đó, các phối tử protein hoặc peptide đặc biệt hứa hẹn để phát triển vaccine uống quy mô lớn do lợi ích của công nghệ protein tái tổ hợp và kỹ thuật lên men vừa đơn giản vừa tiết kiệm chi phí. GP2 là một glycoprotein neo glycosylphosphatidyl inositol (GPI), được biểu hiện trên bề mặt của tế bào M có liên quan đến sự hấp thụ của vi khuẩn FimH⁺ từ ruột (Hase *et al.*, 2009). Điều này cho thấy GP2 là một mục tiêu lý tưởng để đưa kháng nguyên (Ag) vào mô niêm mạc, giúp tăng hiệu quả của vaccine uống. Theo nghiên cứu của Inam Khan và đồng tác giả (2017), thông qua quá trình sàng lọc từ thư viện phage, Gb1 (peptide liên kết GP2) là một peptide với khả năng tăng cường sự hấp thu Ag của tế bào M thông qua thụ thể GP2, đồng thời tạo ra mức IgG huyết thanh và IgA niêm mạc cao đáng kể. Điều này còn đi kèm với sự tăng cường các tế bào tiết cytokine trong nhiều mô lymphoid, đặc biệt là các interleukin (IL)-4, IL-5, và IL-6, những yếu tố liên quan đến việc chuyển đổi isotype sang IgA dạng tiết. Sự tăng cường này cho thấy khả năng của Gb1 trong việc kích thích miễn dịch, và tiềm năng sử dụng nó như một tá dược cho vaccine uống (Khan *et al.*, 2017). Vì thế trong đề tài này, chúng tôi sử dụng tài liệu và công cụ tin sinh học để phân tích và đánh giá nhằm có cái nhìn sâu hơn về tương tác giữa peptide Gb1 với thụ thể GP2; từ đó đặt mục tiêu cải thiện khả năng nhắm trúng đích đến tế bào M của peptide này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mô hình hóa cấu trúc Glycoprotein 2 của người (human GP2 – hGP2) bằng phương pháp mô phỏng tương đồng

Cấu trúc đầy đủ của hGP2 (full-length hGP2) được xây dựng bằng phương pháp mô phỏng tương đồng với bộ công cụ Rosetta phiên bản 3.7.1 (Leman *et al.*, 2020). hGP2 bao gồm các miền (domain) quan trọng sau: (1) cấu trúc kẹp tóc β và D10C (amino acid (aa) 41-184); (2) giống EGF (aa 186-230); (3) zona pellucida (ZP – aa 228-484); trong đó, miền (1) được xây dựng dựa trên cấu trúc tinh thể hóa hGP2 dạng tan (PDB ID: 7P6R), hai miền còn lại được mô hình hóa dựa trên cấu trúc tương đồng nhất về mặt trình tự là Uromodulin của người (PDB ID: 6TQL) bằng công cụ RosettaCM. Đoạn nối giữa các miền được xây dựng lại bằng công cụ RosettaRemodel. Những vị trí đường hóa được mô phỏng bằng máy chủ CHARMM-GUI.

Phân tích đặc điểm của các peptide bám GP2 (GP2-binding peptide – GbP) và dự đoán cấu trúc 3D

Trình tự các peptide được thu nhận từ công bố của Khan và đồng tác giả (2017). Đặc điểm hóa lý của những peptide này được tính toán bằng máy chủ ProtParam. Sau đó, cấu trúc 3D của những peptide này được dự đoán bằng thuật toán AlphaFold 2 được tích hợp vào ColabFold cùng số lần tái dự đoán (*num_recycles*) là 48. Cấu trúc có hạng cao nhất được sử dụng cho bước docking tiếp theo.

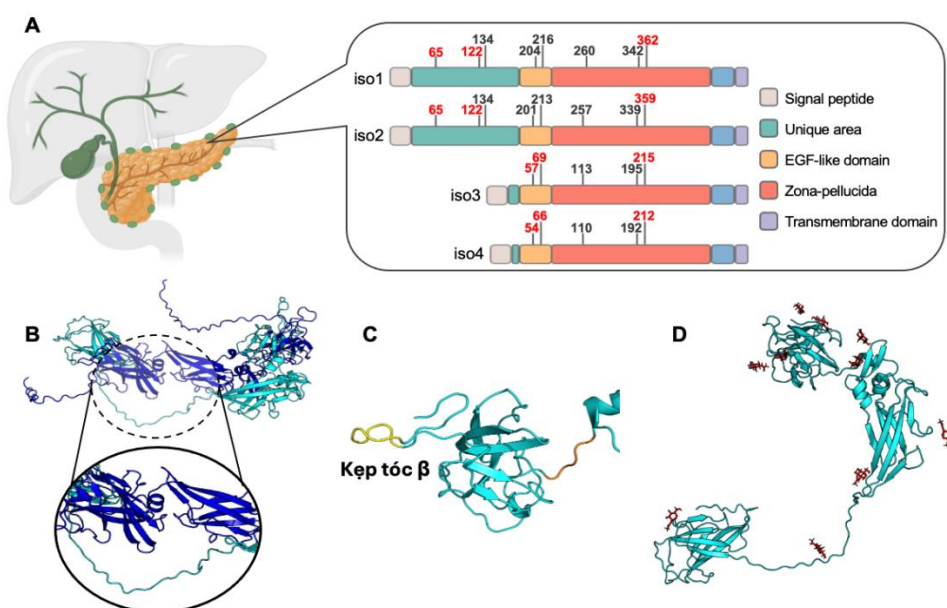
Xây dựng cấu trúc phức hợp GbP-hGP2 bằng phương pháp docking phân tử

Để giảm thiểu không gian tìm kiếm và thời gian docking, công cụ CASTp được sử dụng để dự đoán vị trí tương tác tiềm năng giữa GbP với hGP2. Máy chủ HADDOCK 2.4 được sử dụng cho quá trình docking giữa ba GbP và hGP2 kết hợp với thông tin vị trí tương tác của CASTp (van Zundert *et al.*, 2016). Phức hợp nằm ở cụm cấu trạng có điểm HADDOCK thấp nhất được chọn. Công cụ FlexPepDock được tích hợp trong Rosetta được sử dụng cho việc tối ưu hóa mạch chính và hướng gập của peptide đối với thụ thể. Tất cả các kết quả từ mô hình hóa cấu trúc hGP2, các GbP và phức hợp GbP-GP2 được biểu diễn và phân tích bằng phần mềm PyMOL.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mô hình hóa cấu trúc Glycoprotein 2 của người (human GP2 – hGP2) bằng phương pháp mô phỏng tương đồng

Protein hGP2 tồn tại trong tự nhiên ở bốn dạng isoform là 1, 2, 3 và 4; trong đó, dạng 1 tương đồng với 2 còn 3 tương đồng với 4 khi thiếu đi miền độc nhất (unique domain) dài 144 aa từ vị trí 42-185 (Hình 1A). Đây được xem là kết quả của quá trình phân cắt khi protein này được biểu hiện (Zhang *et al.*, 2024). Nghiên cứu của Khan và đồng tác giả (2017) đã cho thấy được rằng FimH⁺ bám vào GP2 ở isoform 1, dạng isoform dài nhất. Vì thế, chúng tôi chọn isoform 1 để mô hình hóa cấu trúc hGP2.



Hình 1. Cấu trúc protein hGP2

A. Các dạng isoform của protein hGP2 trong tự nhiên. B. Cấu trúc đầy đủ của protein hGP2 được mô phỏng với bộ công cụ Rosetta (cyan) và cấu trúc hGP2 được dự đoán thông qua công cụ AlphaFold 2 (xanh biển). C. Vùng kẹp tóc β của cấu trúc 7P6R (vàng) và đoạn nối giữa mô hình EGF-ZP và 7P6R (cam). D. Mô hình hGP2 đã bổ sung các gốc đường.

Cả hai protein hGP2 và Uromodulin đều là protein neo GPI và sở hữu miền ZP đóng vai trò như một cấu trúc polymer hóa bao gồm hai tiểu phần riêng biệt nhưng đều có cấu trúc dạng globulin miễn dịch, ZP-N và ZP-C, nối với nhau bằng một linker dài 24 aa (Bokhove, Jovine, 2018). Cấu trúc hGP2 đã được dự đoán thông qua công cụ AlphaFold 2 (AF2 ID: P55259); tuy nhiên, mô hình này lại không cho thấy được sự giãn ra của linker này để tạo điều kiện cho sự polymer hóa của nhiều phân tử hGP2 (Hình 1B). Vì thế, cấu trúc hGP2 từ aa 186 đến 484 bao gồm cả miền giống EGF và ZP (EGF-ZP) được mô hình hóa tương đồng dựa trên cấu trúc 6TQL. Mô hình này được chọn làm khuôn vì có độ bao phủ và tương đồng lần lượt là 0,98 và 53,4%, phù hợp cho tiêu chí của phương pháp mô phỏng tương đồng. So sánh giữa cấu trúc dự đoán với khuôn 6TQL cho thấy được độ tương đồng cao ở miền giống EGF, ZP-N và ZP-C; tuy nhiên, linker giữa hai tiểu phần ZP không tạo được cấu trúc bậc hai nào như so với hai phiến β nối tiếp của Uromodulin (Hình 1B). Điều này có thể ảnh hưởng đến tương tác tạo polymer của GP2. Cũng như những protein có chứa vùng ZP khác, vùng ZP giúp cho GP2 có thể polymer hóa tạo thành màng hạt tạo enzyme (zymogen granule membrane). Vùng kẹp tóc β của cấu trúc 7P6R và đoạn nối giữa mô hình EGF-ZP và 7P6R được tái cấu trúc bằng RosettaRemodel. Kết quả cho thấy các vùng này đã được nối lại thành công (Hình 1C). Trong thí nghiệm của Khan, GP2 được sử dụng là protein tái tổ hợp sản xuất từ tế bào côn trùng; vì thế, chúng tôi tiếp tục bổ sung thêm các gốc đường vào những vị trí ASN bao gồm 65, 88, 122, 134, 204, 216, 260, 291, 342, và 362 dựa trên thông tin từ UniProt (Hình 1D). Điều này hỗ trợ cho việc xác định vị trí bám của các GbP lên GP2 thông qua việc loại bỏ các vị trí đường hóa đó.

Phân tích đặc điểm của các peptide bám GP2 (GP2-binding peptide – GbP) và dự đoán cấu trúc 3D

Đặc điểm hóa lý của các peptide tính toán bằng ProtParam được liệt kê ở Bảng 1.

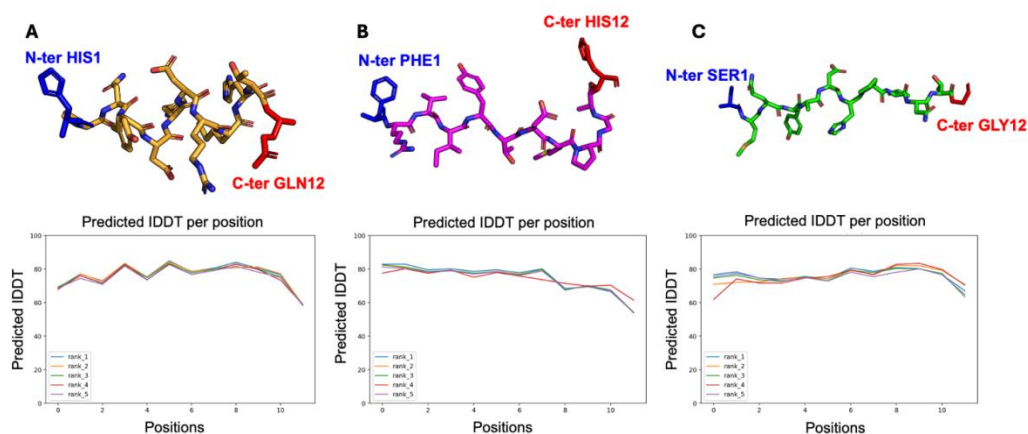
Bảng 1. Đặc điểm hóa lý của các peptide

	Trình tự	pI lý thuyết	Số aa phân cực	Chu kỳ bán rã (ĐVCV; nấm men; <i>E. coli</i>)	Chỉ số bất ổn định (Instability Index)
Gb1	HPNYDHDRMHTQ	6,26	3 (ASP5, ASP7, ARG8)	3,5 giờ; 10 phút; > 10 giờ	55,38 (kém bền)
Gb2	FRVIYTDMPGAH	6,74	2 (ARG2, ASP7)	1,1 giờ; 3 phút; 2 phút	24,56 (bền)
Gb3	SMQYADHPVNTG	5,06	1 (ASP6)	1,9 giờ; > 20 giờ; > 10 giờ	8,76 (bền)

ĐVCV: Động vật có vú.

Kết quả ProtParam cho thấy ba peptide đều có pI thấp hơn 7,4 nên đều có tính acid do sở hữu acid aspartic; trong đó, Gb3 có tính acid cao nhất với pI 5,06. Điều này có thể gợi ý rằng các peptide này sẽ bám vào vị trí tích điện âm nằm trên hGP2. Gb1 có nhiều aa phân cực nhất với hai aa ASP và một ARG, giúp cho peptide này có độ linh động cao và dễ tan trong dung môi phân cực hơn hai peptide còn lại. Tuy nhiên, cũng vì lý do đó mà peptide này có chỉ số bất ổn định cao nên được đánh giá là kém bền hơn. Ngoài ra, chu kỳ bán rã của ba peptide cũng được tính toán với Gb1 được xem là peptide có khả năng tồn tại lâu hơn Gb2 và Gb3 do HIS nằm ở đầu N. Đặc tính của amino acid nằm ở đầu N sẽ quyết định đến chu kỳ bán rã của số lượng peptide trong dịch tổng protein, với aa kém phân cực sẽ đem lại chu kỳ bán rã tương đối dài hơn so với các aa phân cực. Quy luật này khác nhau ở nhiều loài sinh vật như động vật có vú, nấm men, *E. coli*, hay lục lạp và được biết đến với cái tên luật đầu N (N-end rule) (Varshavsky, 1997). Các peptide này sau đó sẽ được dung hợp với kháng nguyên mục tiêu để tạo ra protein tái tổ hợp GbP-Ag, vừa có khả năng đem kháng nguyên tới chính xác thụ thể tiếp nhận, vừa kéo dài thời gian bán rã và tăng độ bền của peptide.

Cấu trúc 3D của các GbP được dự đoán bằng AlphaFold 2 tích hợp trong ColabFold. Gb2 với Gb3 không tạo cấu trúc bậc 2 nào cụ thể so với dạng xoắn α của Gb1. Điều này có thể giải thích được do trình tự Gb1 có ba aa phân cực xen kẽ với các aa không phân cực nên có xu hướng xoay các aa ASP và ARG ra tiếp xúc dung môi. Cả ba mô hình này đều được sử dụng cho docking với hGP2.

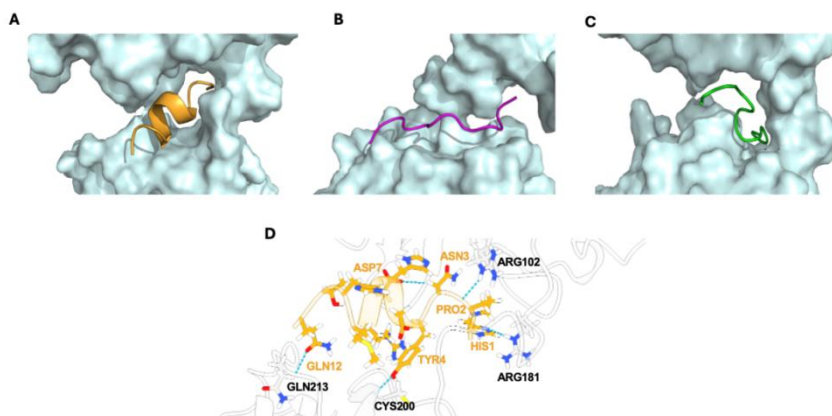


Hình 2. Cấu trúc dự đoán của các peptide bám GP2 (GbP), bên dưới là pLDDT của từng cấu trúc

A. Peptide Gb1. B. Peptide Gb2. C. Peptide Gb3.

Xây dựng cấu trúc phức hợp GbP-hGP2 bằng phương pháp docking phân tử

Máy chủ HADDOCK 2.4 được sử dụng để docking giữa ba GbP và hGP2. Trước hết, vị trí tương tác trên thụ thể hGP2 cần được xác định thông qua máy chủ CASTp. Kết quả từ CASTp tính toán với bán kính tìm kiếm là 1,4 Å và một hốc tương tác không chứa aa bị đường hóa, nằm ở miền giữa vùng D10C và vùng giống EGF. Đáng chú ý hơn, vùng này bao gồm đoạn epitope từ VAL154 đến THR169 có độ tương đồng cao với đoạn epitope 16 aa từ 154-169 của GP2 ở chuột, quan trọng cho sự nhận diện của kháng thể kháng GP2 (Stsiapanava *et al.*, 2022). Vì vậy, vị trí tương tác này đáng tin cậy cho quá trình docking. Quy trình docking bằng HADDOCK chủ yếu xoay quanh khái niệm “Giới hạn tương tác nhập nhằng (Ambiguous Interface Restraints – AIR)”; trong đó, các aa trực tiếp tham gia vào tương tác sẽ được chọn là “active” còn những aa lân cận sẽ được gán là “passive”. Vì thế, quá trình docking sẽ diễn ra chính xác hơn so với docking toàn cục (global docking) và có thể lọc ra những phức hợp không thỏa mãn thông tin thực nghiệm. Kết quả trả về từ HADDOCK cho ra phức hợp tốt nhất của ba peptide Gb1, Gb2, Gb3 có số điểm HADDOCK lần lượt là $-117,7 \pm 3,3$, $-114,7 \pm 3,5$, $-89,6 \pm 2,6$. Qua đó, chúng ta có thể nhận xét rằng Gb1 tương tác với hGP2 tốt hơn so với Gb2 và Gb3, phù hợp với kết quả thực nghiệm của Khan và đồng tác giả (2017). Điểm HADDOCK thấp đáng kể của Gb3 có thể được giải thích do cấu trúc kém phân cực, ít những gốc aa trao nhận hydro.



Hình 3. Mô hình tương tác giữa các peptide Gb và protein hGP2 từ HADDOCK

A. Phức hợp Gb1-hGP2. B. Phức hợp Gb2-hGP2.

C. Phức hợp Gb3-hGP2. D. Trực quan hoá liên kết hydro giữa Gb1 và hGP2.

Vị trí tương tác giữa ba peptide cũng khác nhau đáng kể khi chỉ có Gb1 và Gb3 bám hGP2 trực tiếp vào hốc tương tác từ CASTp, còn Gb2 thì trải dài tương tác ở ngoài bề mặt nhiều hơn (Hình 3A-C). Ba phức hợp này tiếp tục tối ưu hóa mạch chính và chuỗi bên bằng công cụ FlexPepDock và đánh giá bằng thông số *total_score*. Phức hợp GbP-hGP2 sau khi tối ưu thể hiện được sự gắn kết sát hơn của peptide vào thụ thể thông qua sự gia tăng các liên kết hydro với GP2. Điểm số của ba peptide lần lượt là -544,670, -482,920, và -531,310 đơn vị năng lượng Rosetta (Rosetta Energy Unit – REU), qua đó giải thích được lý do Gb1 cho kết quả tương tác thực nghiệm tốt hơn so với hai peptide còn lại (Hình 3D). Ngoài ra, tương tác này không ảnh hưởng nhiều đến cấu

trúc tổng thể của GP2 do Gb1 chỉ “bám” chứ không kích hoạt GP2 chuyển đổi trạng thái. Sâu hơn vào tương tác của Gb1 với thụ thể, peptide này tạo sáu liên kết hydro với hGP2 được trình bày ở Bảng 2. Nhờ vào hai aa ở hai đầu N và C là HIS và GLN đều tạo liên kết hydro với hGP2 lần lượt tại ARG181 và GLN213 với độ dài < 3 Å (2,39 và 1,79), peptide Gb1 được cố định ở hốc tương tác, tránh được sự ảnh hưởng của dung môi trong quá trình bám lên thụ thể.

Bảng 2. Phân tích liên kết Hydro giữa hGP2 và peptide Gb1

hGP2		Peptide Gb1		Loại tương tác	Khoảng cách (Å)
Nguyên tử	Amino acid	Nguyên tử	Amino acid		
NE	R102	O	P2	Liên kết hydro	2,95
O	G159	NH2	R8		2,91
N	Y161	OD2	D7		3,31
NZ	K189	OD2	D5		2,99
N	C200	OH	Y4		2,62
N	Q213	OE1	Q12		2,71
N	D214	OE1	Q12		3,17

KẾT LUẬN

Từ những kết quả *in silico* trên, chúng tôi đã xây dựng thành công cấu trúc đầy đủ của hGP2 được đường hóa, một thụ thể biểu hiện đặc trưng trên bề mặt tế bào M với công cụ Rosetta và CHARMM-GUI. Các peptide được phát hiện thông qua sàng lọc phage là Gb1, Gb2, và Gb3 cũng được dự đoán cấu trúc và kết hợp với hGP2 để tạo ra phức hợp GbP-hGP2 bằng phương pháp docking phân tử với HADDOCK. Kết quả tính toán này cho thấy sự tương thích với kết quả thực nghiệm của Khan và đồng tác giả (2017) khi Gb1 thể hiện khả năng bám hGP2 tốt hơn so với hai peptide còn lại, thông qua khả năng tạo liên kết hydro nhờ vào những aa phân cực của mình. Thông qua kết quả này, việc tối ưu hóa trình tự peptide nhằm tăng ái lực của Gb1 với hGP2 có thể được thực hiện, hỗ trợ cho những hướng đi mới trong tương lai của công cuộc phát triển vaccine uống nhắm trúng đích tế bào M.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả chân thành cảm ơn PTN. Các hệ thống thông minh, Khoa Công nghệ thông tin, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên đã hỗ trợ nhóm tiếp cận tài nguyên máy tính hiệu năng cao trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bokhove M, Jovine L (2018) Structure of Zona Pellucida Module Proteins. *Curr Top Dev Biol* 130: 413-442.
- Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S (2009) Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462: (7270) 226-230.
- Khan IU, Huang J, Liu R, Wang J, Xie J, Zhu N (2017) Phage Display-Derived Ligand for Mucosal Transcytotic Receptor GP-2 Promotes Antigen Delivery to M Cells and Induces Antigen-Specific Immune Response. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D* 22: (7) 879-886.
- Leman JK, Weitzner BD, Lewis SM, Adolf-Bryfogle J, Alam N, Alford RF, Aprahamian M, Baker D, Barlow KA, Barth P, Basanta B, Bender BJ, Blacklock K, et al. (2020) Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks. *Nat Methods* 17: (7) 665-680.
- Mantis NJ, Rol N, Corthésy B (2011) Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal immunology* 4: (6) 603-611.
- Stsiapanava A, Xu C, Nishio S, Han L, Yamakawa N, Carroni M, Tunnyasuvunakool K, Jumper J, de Sanctis D, Wu B, Jovine L (2022) Structure of the decoy module of human glycoprotein 2 and uromodulin and its interaction with bacterial adhesin FimH. *Nat Struct Mol Biol* 29: (3) 190-193.
- Van der Weken H, Cox E, Devriendt B (2020) Advances in oral subunit vaccine design. *Vaccines* 9: (1) 1.
- van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, Melquiond ASJ, van Dijk M, de Vries SJ, Bonvin AMJJ (2016) The HADDOCK 2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *Journal of Molecular Biology* 428: (4) 720-725.
- Varshavsky A (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes to Cells* 2: (1) 13-28.
- Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H (2011) Oral tolerance. *Immunological reviews* 241: (1) 241-259.
- Yamamoto M, Pascual D, Kiyono H (2012) M cell-targeted mucosal vaccine strategies. *Mucosal Vaccines: Modern Concepts, Strategies, and Challenges* 39-52.
- Zafar A, Arshad R, Ur. Rehman A, Ahmed N, Akhtar H (2023) Recent Developments in Oral Delivery of Vaccines Using Nanocarriers. *Vaccines* 11: (2) 490.
- Zhang Z, Tanaka I, Nakahashi-Ouchida R, Ernst PB, Kiyono H, Kurashima Y (2024) Glycoprotein 2 as a gut gate keeper for mucosal equilibrium between inflammation and immunity. *Seminars in Immunopathology* 45: (4) 493-507.

CONSTRUCTION OF THE INTERACTIVE COMPLEX BETWEEN HUMAN GLYCOPROTEIN 2 (hGP2) AND PEPTIDE GB1 USING COMPUTATIONAL TOOLS

Cam-Tu Ly^{1,2,3}, Thuan-Thien Dinh^{1,2,3}, Hieu Tran-Van^{1,2,3*}

¹Laboratory of Biosensors; Department of Molecular and Environmental Biotechnology, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

²Laboratory of Molecular Biotechnology, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

³Vietnam National University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

The oral vaccine has been developed and proven to be an optimal solution for gastrointestinal infections due to its ability to stimulate the secretion of secretory IgA antibodies, thereby enhancing mucosal immune responses. However, harsh environments in the digestive tract such as pH and digestive enzymes can lead to antigen degradation. Moreover, due to the large surface area of the intestines and the immune tolerance characteristics of intestinal cells, antigens are often dispersed and may not effectively induce immune responses. Therefore, strategies focusing on targeting M cells through ligand-receptor interactions on their surface have been developed to enhance the antigen absorption efficiency of oral vaccines in the intestine. Previously, three GP2-binding peptides (Gbps) were evaluated for their ability to interact with GP2 and enhance antigen uptake by M cells, with Gb1 showing the best interaction results. In this study, the interaction between the three Gb peptides and the hGP2 receptor was evaluated and analyzed through a series of computational processes, including structure modeling and molecular docking. Based on simulation tools, high-reliable 3D structures of hGP2 protein and the three Gbps were constructed. Docking results demonstrated that the interaction between Gb1 peptide and hGP2 was stabilized by six hydrogen bonds. This study provided a basis for designing new peptides with higher affinity for hGP2 to support the future development of oral vaccines.

Keywords: Bioinformatics, Glycoprotein GP2, Gb1, Molecular docking, Oral vaccine, Structure modeling.

* Author for correspondence: Tel: 0983260781; Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

XÂY DỰNG MÔ HÌNH CHUỘT NHIỄM ĐỘC CẤP TÍNH CADMIUM QUA ĐƯỜNG UỐNG VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG LÊN DẠ DÀY

Trương Huy Bửu, Lâm Thị Khánh Phương, Nguyễn Thị Thương Huyền*

Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Cadmium, một kim loại nặng độc hại, đã được chứng minh là gây ra nhiều vấn đề sức khỏe nghiêm trọng, đặc biệt là đối với hệ tiêu hóa. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu xây dựng một mô hình chuột nhiễm độc cấp tính cadmium qua đường uống để mô phỏng các tác động của cadmium lên cơ thể động vật. Chuột thí nghiệm được uống các liều cadmium khác nhau (330, 165, 80, và 70 mg/kg thể trọng (b.w)) từ $CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$. Sau 24-48 giờ, các biểu hiện hành vi và mức độ tổn thương dạ dày của chuột được đánh giá. Kết quả cho thấy Cd gây ra các biểu hiện bất thường về hành vi bao gồm mất đen, di chuyển không vững, bỏ ăn và ở nồng độ gây nhiễm cao có hiện tượng dạ dày trương nước và đầy khí. Đối với cấu trúc mô học, Cd gây tổn thương nghiêm trọng dạ dày chuột bao gồm bong tróc, hoại tử tế bào, giảm độ dày cơ. Liều gây chết 50% (LD₅₀) đã được xác định là 70 mg/kg b.w. Như vậy, nghiên cứu đã xây dựng thành công mô hình chuột nhiễm độc cấp tính cadmium qua đường uống với LD₅₀ là 70 mg/kg b.w. Cadmium gây ra các bất thường hành vi và tổn thương nghiêm trọng ở dạ dày chuột. Nghiên cứu này góp phần làm rõ cơ chế gây độc của cadmium và mở ra hướng nghiên cứu mới về các phương pháp phòng ngừa và điều trị ngộ độc cadmium.

Từ khóa: Cadmium, chuột nhắt trắng, dạ dày, độc cấp tính, mô học.

GIỚI THIỆU

Cadmium (Cd) là chất gây ô nhiễm nguy hiểm, ngày càng được thải vào môi trường với số lượng lớn do sự phát triển nhanh chóng của các ngành công nghiệp và công nghệ hiện đại (Genchi *et al.*, 2020). Nhiều loại như giáp xác, nhuyễn thể hai mảnh vỏ, hàu, động vật chân đầu và cua có hàm lượng Cd cao. Ngoài ra, Cd còn có thể được tìm thấy trong các nội tạng động vật như gan và thận, một số loại hạt như hạt đậu và hạt ca cao và một số loại nấm dại (Satarug, 2018). Cd được hấp thu chủ yếu qua đường hô hấp, một phần qua hệ tiêu hóa từ thức ăn, nguồn nước bị ô nhiễm, đặc biệt qua các hạt bụi được nuốt vào cùng với nước bọt (Charkiewicz *et al.*, 2023). Nguyên tố này tích tụ thường xuyên nhất ở phổi, gan, thận, tuyến tụy, tinh hoàn, cơ, mô mỡ và da (Charkiewicz *et al.*, 2023). Người ta ước tính rằng khoảng 13-19% Cd được hấp thụ vào phổi từ không khí và khoảng 10-44% qua đường tiêu hóa, chủ yếu vào ruột non (Charkiewicz *et al.*, 2023). Tiếp xúc với Cd đã được chứng minh là dẫn đến nhiều vấn đề sức khỏe nghiêm trọng, từ viêm phổi đến rối loạn chuyển hóa canxi, loãng xương, nhuyễn xương và thậm chí là ung thư phổi (Nordberg *et al.*, 2015). Đặc biệt, khi Cd xâm nhập vào cơ thể bằng con đường uống, nó gây ra những tổn thương nghiêm trọng cho hệ tiêu hóa, bao gồm cả dạ dày. Một nghiên cứu cho thấy chuột Wistar được nhiễm Cd qua đường uống dẫn đến sự hình thành các tổn thương loét sản ở niêm mạc dạ dày, cho thấy việc nuốt phải Cd là yếu tố ảnh hưởng đến ung thư dạ dày. Ngoài ra, niêm mạc dạ dày, khác với biểu mô thực quản và biểu mô vảy, là mô tuyến dễ bị tổn thương do tiếp xúc trực tiếp với Cd (Nai *et al.*, 2015). Nhiễm Cd cũng có thể gây tổn thương niêm mạc dạ dày, tổn thương lông nhung của ruột non và sự xâm nhập của các tế bào viêm vào lớp đệm (Tarasub *et al.*, 2009).

Trước tình hình này, nghiên cứu nhằm mục tiêu xây dựng một mô hình chuột nhiễm độc cấp tính Cd qua đường uống để làm rõ cơ chế gây tổn thương dạ dày ở cấp độ mô học. Mô hình này sẽ là nền tảng quan trọng để đánh giá hiệu quả của các phương pháp điều trị và phòng ngừa ngộ độc Cd; nghiên cứu phát triển các loại hợp chất tự nhiên để điều trị và ngăn ngừa các bệnh liên quan đến nhiễm độc Cd; đồng thời, góp phần vào việc phát triển các chiến lược bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất

$CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ (Sigma, Hoa Kỳ), Formaldehyde (Xilong Trung Quốc), KH_2PO_4 và Na_2HPO_4 (Scharlau, Tây Ban Nha).

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng đực 4 tuần tuổi được Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp. Chuột được nuôi ổn định ở phòng nuôi động vật trong 2 tuần với chu kỳ 10 giờ sáng-14 giờ tối, nhiệt độ phòng 26-28°C, độ ẩm 76 – 80% được ghi nhận bởi máy đo nhiệt kế điện tử. Chuột được ăn thức ăn của chuột là dạng viên tổng hợp vào vào 07 giờ và 17 giờ, nước uống là nước máy tại phòng thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Giải phẫu-Sinh lí người và động vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu dạ dày được nhuộm H&E tại Khoa Giải phẫu bệnh của Phòng khám Đa khoa Đại Phước, Quận 11, Thành phố Hồ Chí Minh.

Bố trí thí nghiệm

Dựa trên thông tin từ nhà sản xuất (Sigma-Aldrich, 2021), liều gây độc cấp tính của Cd qua đường uống đối với chuột là 330 mg/kg thể trọng (b.w). Thí nghiệm được tiến hành với 6 chuột (19-21 g) uống một liều duy nhất Cd từ $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ với liều 330 mg/kg b.w. Nếu 100% chuột chết trong vòng 24-48 giờ, liều sẽ giảm xuống còn 165 mg/kg b.w và tiếp tục thăm dò trên 6 chuột khác. Nếu cả 6 chuột ở liều 165 mg/kg b.w đều chết, thí nghiệm sẽ tiếp tục với liều 80 mg/kg b.w. Nếu chuột sống, liều sẽ được tăng dần cho đến khi xác định được liều gây chết 50% (LD_{50}). Các chuột chết sẽ được đánh giá cấu trúc đại thể và mô học của dạ dày; và chuột sống đến 48 giờ cũng sẽ được mổ và đánh giá tương tự. Trong nghiên cứu này, các liều Cd khảo sát là 330, 165, 80, 70 mg/kg b.w và nghiệm thức đối chứng (không uống Cd). Thí nghiệm được thông qua Hội đồng đạo đức động vật, mã số 1211/KHTN-ACUCUS ngày 11/12/2023.

Phương pháp gây nhiễm cadmium cho chuột: chuẩn bị dung dịch Cd từ $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ theo các liều khảo sát. Chuột được cho uống dung dịch Cd bằng cách bơm dung dịch Cd tương ứng với liều cần khảo sát bởi kim tiêm 1 mL gắn với đầu kim tròn chuyên dụng xuống thực quản. Theo dõi và ghi nhận các biểu hiện của chuột trong 48 giờ.

Phương pháp thu nhận dạ dày: đối với chuột chết do độc cấp tính hoặc chưa chết sau 48 giờ sẽ được cho chết nhân đạo. Giải phẫu khoang bụng để thu nhận dạ dày, xác định các biểu hiện đại thể độ căng (độ dày), thức ăn có trong dạ dày,... sau đó cố định trong dung dịch formalin 10%.

Phương pháp chụp ảnh dạ dày chuột ở mức đại thể: đặt mẫu lên bàn phẳng có đệm lót cao su; đặt thước kẻ dọc bên cạnh mẫu với vạch 0 cm ở đầu trên của mẫu; sử dụng giá đỡ, điều chỉnh cao khoảng 20-35 cm, cách mẫu 20 cm; chụp hình mẫu, đảm bảo mẫu nằm giữa khung hình và lấy nét tốt.

Phương pháp nhuộm, chụp ảnh dạ dày chuột ở mức vi thể, đo kích thước độ dày cơ dạ dày: mẫu dạ dày chuột sau khi chụp hình đại thể được cố định trong dung dịch formalin 10% bổ sung KH_2PO_4 (4 g/1000 mL) và Na_2HPO_4 (6,5 g/1000 mL). Mẫu được chuyển đến Khoa giải phẫu bệnh-PPhòng khám đa khoa Đại Phước, Quận 11 để nhuộm H&E. Mỗi nghiệm thức chọn 3 chuột, mỗi chuột thực hiện 3 lát cắt mô. Đánh giá mức độ tổn thương của mô tại 3 vùng thượng vị, thân vị và môn vị dưới kính hiển vi đảo ngược (TiU) có gắn camera. Kích thước độ dày cơ ở các vùng thượng vị, thân vị và hạ vị của các nghiệm thức được xác định bằng phần mềm S-EYE.

KẾT QUẢ

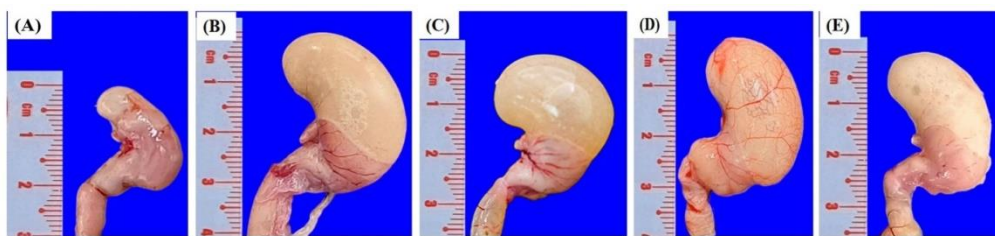
Các biểu hiện hành vi bất thường và ảnh hưởng của Cadmium lên cấu trúc đại thể dạ dày ở các liều gây nhiễm

Sau 48 giờ gây nhiễm Cd, các biểu hiện hành vi bất thường của chuột thể hiện gồm: chết nhanh, mắt đen, tím tái ở miệng và mũi, di chuyển không vững, bỏ ăn, uống nước nhiều, dạ dày trương nước và đầy khí (Bảng 1 và Hình 1), đặc biệt ở hai liều cao, thời gian chuột tử vong nhanh (chưa đầy 24 giờ). Ở liều 80 và 70 mg/kg b.w, dù có một số chuột sống lâu hơn 24 giờ nhưng vẫn biểu hiện rõ các dấu hiệu ngộ độc. Như vậy, LD_{50} của Cd đối với chuột nhất trắng được xác định là 70 mg/kg b.w. trong 48 giờ gây nhiễm.

Bảng 1. Kết quả ảnh hưởng của độc cấp tính Cadmium lên chuột nhắt trắng

Các biểu hiện	Các nồng độ Cd khảo sát (mg/kg b.w)				
	0 (Đối chứng)	330	165	80	70
Chuột chết (%)	00%	100%	100%	66,67%	50%
Mắt đen	-	+	+	+	+
Miệng mũi tím tái	-	+	+	+	+
Di chuyển không vững	-	+	+	-	-
Bỏ ăn	-	+	+	+	-
Uống nước nhiều	-	+	+	-	-
Dạ dày trương nước và đầy khí	-	+	+	-	-

“+”: Có biểu hiện; “-”: Không biểu hiện.

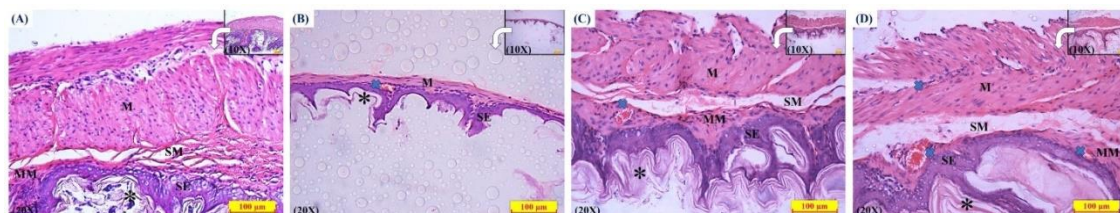


Hình 1. Cấu trúc đại thể của dạ dày chuột ở các liều Cadmium khảo sát độc cấp tính

A (đối chứng): Dạ dày bình thường; B (Cd 330 mg/kg b.w) và C (Cd 165 mg/kg b.w): Dạ dày trương nước, đầy khí, mạch máu phình to và đậm màu; D (Cd 80 mg/kg b.w) và E (Cd 70 mg/kg b.w): Dạ dày phình, tích nước, khí nhưng ít hơn so với 2 nồng độ cao hơn.

Ảnh hưởng của Cadmium lên cấu trúc vi thể dạ dày

Ở kết quả về cấu trúc mô học của dạ dày chuột, chúng tôi không nhuộm nghiệm thức ở liều 80 mg/kg b.w. Kết quả được thể hiện ở Hình 2-4.



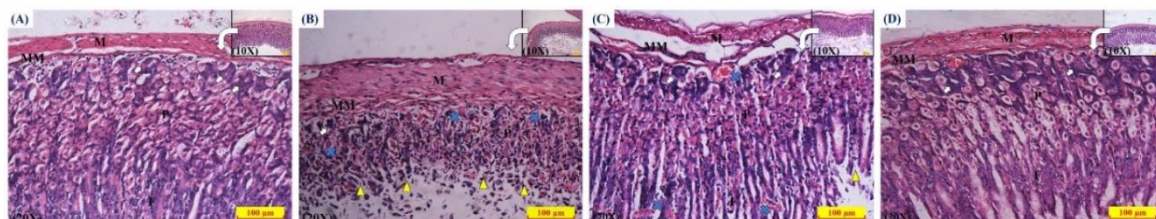
Hình 2. Cấu trúc mô học vùng thượng vị (forestomach)

A: Đối chứng; B: Cd 330 mg/kg b.w; C: Cd 165 mg/kg b.w; D: Cd 70 mg/kg b.w.

Dấu hoa thị: Lớp sừng; SE (Squamous epithelium): biểu mô vảy; MM (muscularis mucosae): Lớp cơ niêm mạc; SM (submucosa): Lớp dưới niêm mạc; M (muscularis): Lớp cơ; dấu nhân: Mạch máu phình to; scale bar: 100 μ m.

Kết quả nhuộm H&E cấu trúc mô học dạ dày chuột ở Hình 2 cho thấy vùng thượng vị có sự ảnh hưởng của Cd ở các nghiệm thức. Ở nhóm đối chứng (Hình 2A) có đầy đủ các phần: lớp cơ (M) gồm 2 lớp là lớp cơ vòng ở trong và lớp dọc ở ngoài; lớp dưới niêm mạc (SM); lớp cơ niêm mạc (MM); biểu mô vảy (SE) và lớp sừng phân tầng (dấu hoa thị). Nhóm uống 330 mg/kg b.w (Hình 2B) có sự tổn thương nghiêm trọng: lớp cơ bị phá hủy, lớp cơ dưới niêm mạc bị bào mòn và teo lại; lớp biểu mô vảy bị hoại tử. Nhóm uống 165 mg/kg b.w (Hình 2C) và 70 mg/kg b.w (Hình 2D) cũng bị ảnh hưởng của Cd, nhưng nhẹ hơn, với hiện tượng phù nề lan rộng và thâm nhiễm bạch cầu ở lớp dưới niêm mạc, lớp cơ niêm mạc có hiện tượng mạch máu phình to và tụ máu (dấu nhân). Như vậy, Cd đã ảnh hưởng mạnh đến lớp cơ và lớp dưới niêm mạc dạ dày, mức độ ảnh hưởng giảm dần theo sự giảm liều khảo sát.

Kết quả nhuộm H&E cấu trúc mô học dạ dày chuột ở Hình 3 cho thấy vùng thân vị có những ảnh hưởng của Cd ở các nghiệm thức. Ở nhóm đối chứng (Hình 3A), cấu trúc mô học bình thường với lớp cơ (M), lớp cơ niêm mạc (MM); các tế bào thành (P) có nhiệm vụ tiết HCl chiếm ưu thế; các tế bào chính (mũi tên) phân bố rải rác có vai trò tiết pepsinogen và vùng tế bào cổ tuyến (F) tiết chất nhầy bảo vệ niêm mạc. Ở nhóm 330 mg/kg b.w (Hình 3B), lớp niêm mạc dạ dày bị mất tính toàn vẹn với các tế bào bị bong tróc mạnh (hình tam giác), tế bào bị hoại tử nhiều, số lượng các tế bào giảm mạnh, mạch máu phình to, tụ máu (dấu nhân). Ảnh hưởng của Cd giảm dần ở liều 165 mg/kg b.w (Hình 3C) và 70 mg/kg b.w (Hình 3D). Ở liều 165 g/kg b.w, Cd ảnh hưởng mạnh lên lớp cơ dạ dày (M), làm bong tróc và teo lớp cơ, mạch máu phình to và tụ máu. Tuy nhiên, mức độ hoại tử ở vùng tế bào cổ tuyến giảm hơn so với nhóm uống liều 330 mg/kg b.w. Điều này cho thấy rằng trong phạm vi khảo sát, sự ảnh hưởng của Cd lên dạ dày có sự giảm dần theo sự giảm liều khảo sát.

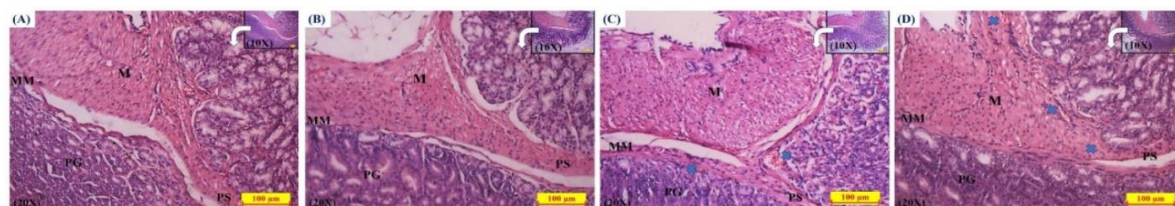


Hình 3. Cấu trúc mô học vùng thân vị (corpus)

A: Đối chứng; B: Cd 330 mg/kg b.w; C: Cd 165 mg/kg b.w; D: Cd 70 mg/kg b.w

MM (muscularis mucosae): Lớp cơ niêm mạc; SM (submucosa): Lớp dưới niêm mạc; M (muscularis): Lớp cơ; dấu nhân: Mạch máu phình to; P (parietal cells): Tế bào thành; F (foveolar cells): Tế bào cổ tuyến; mũi tên: tế bào chính; hình tam giác: Vùng tế bào bị bong tróc; scale bar: 100 μ m.

Kết quả nhuộm H&E cấu trúc mô học vùng hạ vị dạ dày chuột ở Hình 4 cho thấy ở nhóm đối chứng (Hình 4A) có cấu trúc mô học bình thường. Sau khi gây nhiễm Cd ở liều 330 mg/kg b.w (Hình 4B), lớp cơ (M) có sự bong tróc mạnh và kết cấu lớp cơ trở nên lỏng lẻo; lớp cơ dưới niêm mạc (MM) bị mỏng hơn so với đối chứng. Ngoài ra, các tuyến môn vị (PG) có nhân bị teo lại, hoại tử và số lượng tế bào giảm. Lớp cơ vòng môn vị (PS) cũng có xu hướng teo nhỏ hơn so với đối chứng. Tình trạng này cũng xuất hiện ở nhóm chuột uống Cd với liều 165 mg/kg b.w (Hình 4C) và 70 mg/kg b.w (Hình 4D), nhưng mức độ này nhẹ hơn. Ngoài ra, ở hai nồng độ này, có sự phình to của mạch máu (dấu nhân) và tích tụ máu ở lớp cơ môn vị. Như vậy, các nồng độ Cd khảo sát đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến vùng môn vị như gây teo lớp cơ vòng, giảm số lượng các tế bào trong tuyến môn vị,... và các ảnh hưởng này giảm dần theo sự giảm các liều Cd được gây nhiễm.

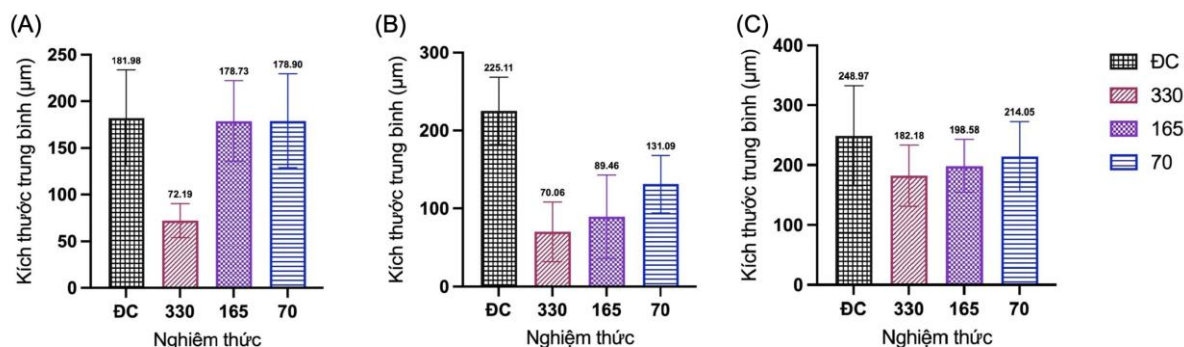


Hình 4. Cấu trúc mô học vùng hạ vị (antrum)

A: Đối chứng; B: Cd 330 mg/kg b.w; C: Cd 165 mg/kg b.w; D: Cd 70 mg/kg b.w

MM (muscularis mucosae): Lớp cơ niêm mạc; SM (submucosa): lớp dưới niêm mạc; M (muscularis): Lớp cơ; dấu nhân: Mạch máu phình to; P (parietal cells): Tế bào thành; PG (pyloric gland): Tuyến môn vị; PS (pyloric sphincter): Cơ vòng môn vị; scale bar: 100 µm.

Ảnh hưởng của Cadmium lên kích thước độ dày cơ dạ dày



Hình 5. Biểu đồ thể hiện kích thước độ dày cơ ở ba vùng dạ dày chuột ở các nghiệm thức

A: Vùng thượng vị; B: Vùng thân vị; C: Vùng hạ vị.

Kết quả nghiên cứu Hình 5 cho thấy Cd gây giảm đáng kể độ dày cơ của các vùng thượng vị, thân vị và hạ vị dạ dày chuột. Sự giảm này có mối tương quan rõ rệt với nồng độ Cd cadmium, đặc biệt ở vùng thân vị (Hình 5B) và môn vị (Hình 5C). Nghiệm thức gây độc cấp tính với nồng độ Cd cao nhất (330 mg/kg b.w) gây ảnh hưởng mạnh nhất, làm giảm đáng kể độ dày cơ so với nhóm đối chứng và các nhóm xử lí khác ($p < 0,001$). Kết quả này cho thấy Cd có tác động độc hại rõ rệt lên cấu trúc dạ dày của chuột và mức độ tổn thương tăng theo liều lượng.

Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy Cd gây tổn thương nghiêm trọng đến cấu trúc mô học của dạ dày chuột, đặc biệt là các lớp cơ và niêm mạc. Mức độ tổn thương tăng theo liều lượng Cd, với các biểu hiện như bong tróc, hoại tử tế bào và phình to mạch máu, giảm độ dày cơ.

BÀN LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã xác định rõ ràng tác động của Cd lên hệ tiêu hóa, đặc biệt là dạ dày, ở các liều khác nhau. Ở liều cao (330 và 165 mg/kg b.w), Cd ức chế quá trình hô hấp tế bào, dẫn đến thiếu oxy cho cơ quan, đặc biệt là não bộ, gây rối loạn cân bằng điện giải, ảnh hưởng đến hoạt động thần kinh cơ, gây tổn thương gan, thận, dẫn đến suy đa cơ quan, gây co giật và tử vong ở chuột. Còn ở liều thấp hơn (80 và 70 mg/kg b.w), Cd tích tụ trong cơ thể theo thời gian, gây tổn thương dần các cơ quan, gây rối loạn chuyển hóa, ảnh hưởng đến chức năng gan, thận (Genchi *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2022). Chính các điều này làm cho chuột bị co giật và tử vong hoặc mệt mỏi, lười vận động, mất ăn, ít. Mặt khác, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy Cd làm tăng tính thấm của mao mạch, dẫn đến phù nề, làm cho tích khí trong dạ dày, làm cho dạ dày căng phồng. Chính điều này gây rối loạn chức năng co bóp của dạ dày. Bên cạnh đó, Cd gây chết tế bào, ức chế tái tạo tế bào, rối loạn chức năng

tiết dịch, tiêu hóa (Genchi *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2022). Những tổn thương này xảy ra ở các vùng quan trọng của dạ dày như thượng vị, thân vị và môn vị. Thượng vị điều chỉnh chế độ tiêu hóa thức ăn (Gärtner, 2002), vùng thân vị có chức năng tiết ra acid HCl và vùng môn vị kiểm soát lượng nhũ trấp đi xuống ruột non (Treuting *et al.*, 2018). Kết quả nghiên cứu cho thấy Cd có tác động rất lớn tới dạ dày. Mức độ tổn thương dạ dày tăng tỉ lệ thuận với liều Cd gây nhiễm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Alanazi và cộng sự, trong đó đã chứng minh rằng việc tiếp xúc với Cd làm trầm trọng thêm các hành vi và lặp đi lặp lại ở chuột BTBR. Cơ chế này có thể liên quan đến việc điều hòa tín hiệu Th17, làm tăng các chất trung gian gây viêm (Alanazi *et al.*, 2023). Ngoài ra kết quả nghiên cứu về mức độ tổn thương dạ dày của chúng tôi cũng tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố trước đó, cụ thể sau 48 và 96 giờ gây nhiễm Cd (3 mg/kg b.w), ở dạ dày có hệ cơ giảm đáng kể, lớp cơ dọc và cơ vòng bị teo; các khối mô dưới niêm mạc và niêm mạc bị phân hủy; các khối mô hiện diện không đều, không có tế bào chết và nhân khi (Mohapatra *et al.*, 2009). Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng việc uống Cd đã gây sưng tấy dạ dày chuột, với sự xuất hiện đáng kể các không bào trong tế bào mô tuyến dạ dày, gây tổn thương cho các tuyến này. Hơn nữa, nghiên cứu cũng cho thấy sự xâm nhập của bạch cầu trung tính trong lớp đệm niêm mạc dạ dày (Tarasub *et al.*, 2009). Nguyên nhân gây ra những tổn thương này, có thể do việc nhiễm Cd làm giảm biểu hiện của Bcl-2 chống apoptosis trong dạ dày chuột. Với tỉ lệ Bax/Bcl-2 tăng lên, có khả năng quá trình chết theo chương trình do Cd gây ra trong dạ dày chuột phụ thuộc vào con đường ti thể. Bcl-2 có thể là yếu tố quyết định chính trong việc giải phóng các yếu tố gây chết tế bào từ ti thể vào bào tương (Alaei *et al.*, 2018) dẫn đến thoái hóa và hoại tử các tế bào dạ dày khi nhiễm Cd ở liều cao. Ngoài ra, Cd có khả năng gây tổn thương dạ dày ở chuột thông qua nhiều cơ chế phức tạp, bao gồm: stress oxy hóa, rối loạn cân bằng ion, tổn thương DNA, viêm nhiễm và apoptosis. Cd kích thích sản sinh các gốc tự do, làm tổn hại màng tế bào và DNA, đồng thời ức chế các enzyme chống oxy hóa. Bên cạnh đó, Cd cạnh tranh với các ion thiết yếu như Ca^{2+} và Zn^{2+} , gây rối loạn chức năng tế bào. Các quá trình này dẫn đến viêm nhiễm mãn tính, tổn thương mô và giảm độ dày cơ dạ dày (Qu, Zheng, 2024).

Mặc dù độc tính của Cd đã được một số nhà khoa học nghiên cứu, việc phát triển một mô hình chuột để nghiên cứu tác động cấp tính qua đường uống lên hệ tiêu hóa, đặc biệt là dạ dày, là một đóng góp mới. Trong khi nhiều nghiên cứu trước đây tập trung vào các con đường phơi nhiễm khác (tiêm hoặc tác động lên các cơ quan khác), đề tài này cụ thể hóa tác động lên dạ dày, xác định liều LD₅₀ là 70 mg/kg b.w và chi tiết các tổn thương mô học như bong tróc, hoại tử tế bào và giảm độ dày cơ. Ngoài ra, nghiên cứu còn ghi nhận các biểu hiện hành vi bất thường, kết hợp với tổn thương mô học để cung cấp góc nhìn toàn diện về tác động của Cd. Đây là mô hình nền tảng để thực hiện các nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên trong việc ngăn ngừa và giảm thiểu độc tính của Cd.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công mô hình chuột nhiễm độc cấp tính Cd qua đường uống với LD₅₀ là 70 mg/kg b.w sau 48 giờ. Cadmium gây ra các bất thường về hành vi bao gồm mất đen, di chuyển không vững, bỏ ăn và ở nồng độ gây nhiễm cao có hiện tượng dạ dày trương nước và khí) và tổn thương nghiêm trọng ở dạ dày, bao gồm bong tróc, hoại tử tế bào và giảm độ dày cơ. Những kết quả này không chỉ đóng góp vào việc hiểu rõ hơn cơ chế gây tổn thương của Cd mà còn cung cấp nền tảng vững chắc cho các nghiên cứu tiếp theo về việc sử dụng các hợp chất tự nhiên trong việc ngăn ngừa và giảm thiểu độc tính của kim loại này.

Lời cảm ơn: Cảm ơn Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh; Phòng Khoa học Công nghệ và Môi trường – Tạp chí Khoa học; Phòng khám đa khoa Đại Phước, Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện cho nhóm chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alaei P, Khodarahmi P, Salehipour M (2018) Effect of repeated injection of cadmium on Bax/Bcl-2 mRNA Level in stomach of rats. *Int J Med Labo* 5(2): 133-140.
- Alanazi MM, Ansari MA, Nadeem A, Attia SM, Bakheet SA, Al-Mazroua HA, Aldossari AA, Almutairi MM, Albekairi TH, Hussein MH, Al-Hamamah MA, Ahmad SF (2023) Cadmium Exposure Is Associated with Behavioral Deficits and Neuroimmune Dysfunction in BTBR T(+) Itpr3tf/J Mice. *Int J Mol Sci* 24(7).
- Charkiewicz AE, Omeljaniuk WJ, Nowak K, Garley M, Niklinski J (2023) Cadmium Toxicity and Health Effects-A Brief Summary. *Molecules* 28(18).
- Gärtner K (2002) The forestomach of rats and mice, an effective device supporting digestive metabolism in muridae. *Journal of Exper Animal Sci* 42(1): 1-20.
- Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A (2020) The Effects of Cadmium Toxicity. *Int J Environ Res Public Health* 17(11).
- Ma Y, Su Q, Yue C, Zou H, Zhu J, Zhao H, Song R, Liu Z (2022) The Effect of Oxidative Stress-Induced Autophagy by Cadmium Exposure in Kidney, Liver, and Bone Damage, and Neurotoxicity. *Int J Mol Sci* 23(21).
- Mohapatra AK, Kumari P, Datta S (2009) Cadmium induced histopathological changes in the stomach and small intestine of Swiss albino mice *Mus musculus*. *J Appl Nat Sci* 1(2): 253-257.
- Nai GA, Filho MAG, Estrella MPS, Teixeira LDS (2015) Study of the influence of the pH of water in the initiation of digestive tract injury in cadmium poisoning in rats. *Toxicol Rep* 2: 1033-1038.
- Nordberg G, Nogawa K, Nordberg M (2015) Cadmium (Chapter 32). *Handbook on the Toxicology of Metals* 2: 667-716.

- Qu F, Zheng W (2024) Cadmium Exposure: Mechanisms and Pathways of Toxicity and Implications for Human Health. *Toxics* 12(6).
- Satarug S (2018) Dietary Cadmium Intake and Its Effects on Kidneys. *Toxics* 6(1).
- Tarasub N, Tarasub C, Ayutthaya W (2009) Histological changes of spleen, stomach and small intestine induced by cadmium in rats and the protective effect of curcumin. *TMJ* 9: 213-224.
- Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS (2018) Comparative anatomy and histology a mouse, rat and human atlas: Academic Press.

ESTABLISHMENT OF AN ACUTE CADMIUM TOXICITY MODEL IN ALBINO MICE VIA ORAL ADMINISTRATION AND EVALUATION OF ITS EFFECTS ON THE STOMACH

Truong Huy Buu, Lam Thi Khanh Phuong, Nguyen Thi Thuong Huyen*

Ho Chi Minh City University of Education

ABSTRACT

Cadmium, a highly toxic heavy metal, has been shown to cause severe health issues, especially affecting the digestive system. This study aimed to establish a mouse model of acute cadmium toxicity through oral administration to simulate the effects of cadmium on animal bodies. Mice were exposed to various cadmium doses (330, 165, 80, and 70 mg/kg) and their behavioral changes and gastric damage were evaluated after 24-48 hours. The results showed that Cd induced abnormal behaviors such as blackened eyes, unsteady movement, loss of appetite, and at higher exposure levels, a swollen and gas-filled stomach. Histological examination revealed severe gastric damage, including cell shedding, necrosis, and reduced muscle thickness. The median lethal dose (LD₅₀) was identified as 70 mg/kg b.w. This study successfully created an acute cadmium poisoning mouse model, demonstrating cadmium's significant impact on behavior and gastric health. These findings contribute to a better understanding of cadmium's toxic mechanisms and pave the way for exploring prevention and treatment strategies for cadmium poisoning.

Keywords: Cadmium, albino mice, stomach, acute toxic, histopathological.

* Author for correspondence: Tel: 0335355204– Email: huyenntth@hcmue.edu.vn

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA VỎ THÂN CÂY BÌNH BÁT NƯỚC (*ANNONA GLABRA* L.) TẠI TIỀN GIANG

Lê Thu Thủy, Võ Phát Thịnh, Lữ Hữu Thịnh

Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

TÓM TẮT

Bình bát nước (*Annona glabra* L.) khá phổ biến ở Việt Nam. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã thể hiện các bộ phận như lá, quả, hạt có hoạt tính ức chế sự phát triển của một số loại tế bào ung thư, vi khuẩn. Tuy nhiên loài này thường hay nhầm với loài Lục bát (*Annona reticulata* L.) hay còn gọi là Bình bát. Do đó nghiên cứu về đặc điểm thực vật và hoạt tính kháng khuẩn của vỏ thân Bình bát (*Annona glabra* L.) được thực hiện. Kết quả của nghiên cứu sẽ cung cấp thêm dữ liệu về đặc điểm thực vật và đóng góp thêm vào mục tiêu tìm kiếm nguồn dược liệu mới có được tính. Các cơ quan rễ, thân, lá, hoa, quả, hạt được thu nhận, quan sát đặc điểm thực vật học; Định tính thành phần hóa học trong cao chiết và xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch. Kết quả, đặc điểm thực vật học của Bình bát nước có những đặc điểm đặc trưng của chi *Annona*. Trong cao chiết cồn của vỏ thân có chứa alkaloid, flavonoid, serquiterpen, và tannin. Cao chiết ức chế sự phát triển của Methicilin sensitive *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*.

Từ khóa: Bình bát nước, *Annona glabra*, đặc điểm thực vật Nê biển, hoạt tính kháng khuẩn, thành phần hóa học..

MỞ ĐẦU

Các loài trong chi *Annona* rất phổ biến ở các vùng nhiệt đới. Trong y học cổ truyền, các bộ phận lá, quả, hạt, vỏ thân, rễ đều được sử dụng. Các dạng sắc, ngâm từ lá, rễ, vỏ thân, hạt, và cả nước ép từ quả các loài trong chi này từng được sử dụng để điều trị sốt, tiêu chảy, kiết lỵ, viêm niệu đạo, hen suyễn, các bệnh về ký sinh trùng và gan, đồng thời cũng có tác dụng chống co thắt, nhuận tràng, chống nôn, chống tiết mồ hôi, chống ho, tác dụng chống cảm lạnh và chống trầm cảm. Những hợp chất alkaloid, phenolic, cyclopeptides, acetogenins, acid béo, và tinh dầu đều có hoạt tính sinh học trong các thí nghiệm *in vivo* và *in vitro* (Luis *et al.*, 2020).

Bình bát nước (*Annona glabra* L.) thuộc chi *Annona*, còn được gọi là Nê hay Na biển. Cây được trồng khá phổ biến ở Việt Nam. Dịch chiết ethyl acetat từ quả Bình bát có hoạt tính ức chế *Pseudomonas aeruginosa*. Theo Hong và cộng sự, cao chiết từ lá của Bình bát có thể bảo vệ tế bào thần kinh của chuột khỏi quá trình apoptotic (Hongru *et al.*, 2018). Nano bạc cao chiết quả Bình bát nước có khả năng ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư cổ tử cung người (HeLa), ung thư tuyến tiền liệt (PC3) và ung thư buồng trứng (SKOV3), kháng *Ps. aeruginosa* và *E. coli* (Mokhtar, 2022). Theo Soleman, cao n-hexan toàn cây của Bình bát nước có hoạt tính ức chế virus HSV1, HAV thông qua mô hình docking (Soleman, 2023). Ở Việt Nam, những nghiên cứu trên Bình bát nước chủ yếu là phân lập các hợp chất diterpenoid và flavonoid từ lá (Phạm Thị Nhật Trinh *et al.*, 2014). Lá Bình bát nước có khả năng làm giảm bệnh hoại tử gan trên tôm (Nguyễn Thị Trúc Linh *et al.*, 2024). Những nghiên cứu về các hoạt tính sinh học trên loài Bình bát nước được trồng tại Tiền Giang chưa nhiều. Đồng thời, cây Bình bát nước (*Annona glabra* L.) thường hay nhầm lẫn với cây Lục bát-cũng được gọi là Bình bát (*Annona reticulata* L.). Do đó nghiên cứu về đặc điểm thực vật và hoạt tính kháng khuẩn của vỏ thân Bình bát (*Annona glabra* L.) tại Tiền Giang được thực hiện. Kết quả của nghiên cứu sẽ cung cấp thêm dữ liệu về đặc điểm thực vật và đóng góp thêm vào mục tiêu tìm kiếm nguồn dược liệu mới có được tính.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phương pháp khảo sát đặc điểm thực vật

Cơ quan sinh dưỡng (rễ, thân, lá) và cơ quan sinh sản (hoa, quả, hạt) của cây Bình bát nước được thu nhận vào tháng 7 năm 2022 tại tỉnh Tiền Giang. Hình thái của cơ quan sinh dưỡng và cơ quan sinh sản được quan sát bằng mắt và kính lúp, đo bằng thước, mô tả đặc điểm và ghi nhận hình ảnh bằng máy chụp hình cầm tay.

Rễ, thân, lá và cuống lá được cắt ngang bằng dao lam và nhuộm kép với thuốc nhuộm đỏ son phenen lục iod. Sau đó các lát cắt ngang được quan sát trên kính hiển vi, mô tả và ghi nhận hình ảnh bằng máy chụp hình cầm tay.

Kiểm nghiệm bột dược liệu

Vỏ thân Bình bát nước được thu nhận vào tháng 7 năm 2022 tại tỉnh Tiền Giang. Vỏ thân được sấy khô, xay thành bột mịn và lọc qua rây số 32. Bột mịn được làm tiêu bản giọt ép và quan sát cấu tử bằng kính hiển vi ở vật kính 40X.

Thu nhận cao chiết

Vỏ thân được sấy khô và xay thành bột mịn, độ ẩm dưới 12%. 50 g bột vỏ thân được ngâm trong 400 ml cồn 96 ° trong 24 giờ, ở nhiệt độ phòng, lọc và thu dịch chiết. Phần bã được liệu tiếp tục được ngâm cồn và thu dịch chiết thêm 2 lần. Toàn bộ dịch chiết được thu hồi dung môi bằng máy cô quay ở nhiệt độ 55 °C thu nhận cao có độ ẩm dưới 20%.

Phương pháp khảo sát thành phần hóa học trong cao chiết vỏ thân cây Bình bát nước

Xác định sự hiện diện của các nhóm hợp chất trong cao chiết có độ ẩm dưới 20% theo phương pháp của Nguyễn Kim Phi Phụng (2007).

Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết vỏ thân cây Bình bát nước

Cao chiết có độ ẩm dưới 20% được pha trong DMSO 10% để đạt nồng độ 200 mg/ml. Vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) ATCC 33591 và MSSA (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) ATCC 29213 được cung cấp và lưu giữ tại bộ môn Vi sinh, khoa Dược, trường Đại học Nguyễn Tất Thành. Vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường TSA và pha trong nước muối sinh lý 0,85% để đạt độ đục 0,5 MC Farland.

Đĩa thạch môi trường MHA được cấy trải 100 µL dịch vi khuẩn, sau đó đục 2 giếng có đường kính 6 mm. Mỗi giếng được bổ sung 50 µL dịch lần lượt gồm dịch cao chiết nồng độ 200 mg/ml và DMSO 10%, đĩa giấy đường kính 6 mm được tẩm kháng sinh kanamycin với nồng độ 10 pg được đặt trên đĩa thạch vi khuẩn. Các đĩa thạch sau đó được ủ ở 37°C. Sau 24 giờ đo đường kính vòng vô khuẩn và xác định hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm thực vật học của Bình bát nước

Đặc điểm hình thái

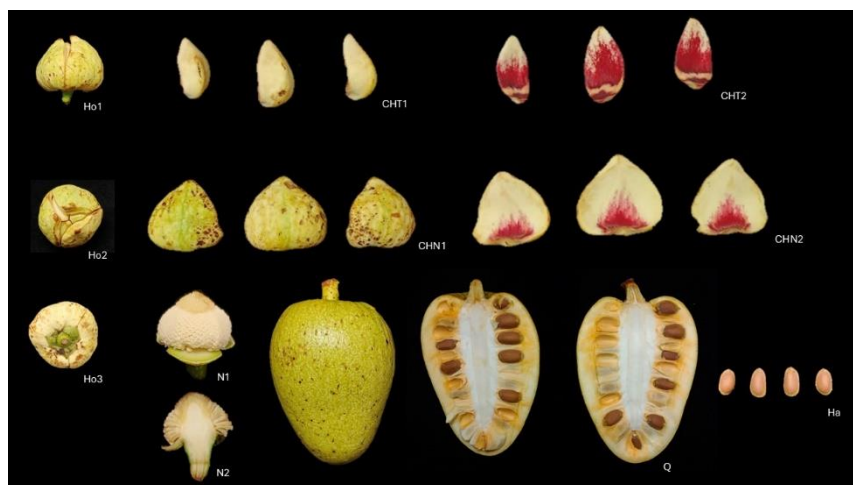
Cây thân gỗ cao 12-15 mét, thường xanh, phân nhiều nhánh, có các nốt sần hình tròn, vỏ thân non màu xanh lục đậm, vỏ thân già màu nâu tím.

Cuống lá hình tròn, màu đỏ, mặt trên hơi lõm xuống dạng hình lòng máng nông, dài 0,8 đến 2,5 cm. Lá đơn, mọc cách xếp thành 2 dãy. Phiến lá hình trứng, thuôn, dài từ 6 đến 20 cm, ngang từ 3 đến 8 cm. Lá có màu xanh lục, mặt trên có màu sậm hơn, bóng láng, gân lá kiểu lông chim nổi rõ ở mặt dưới, có 7 đến 12 cặp gân phụ mỗi bên, có lông che chở đa bào một dãy mọc theo các gân phụ ở mặt dưới lá, lỗ khí hỗn bào. Cuống lá lõm hình lòng máng, màu đỏ, dài từ 1,7-2,0 cm (Hình 1A – Hình 1C).



Hình 1: Đặc điểm của lá Bình bát nước *Annona glabra* L.

A. Cách mọc của lá; B. Mặt trên lá; C. Mặt dưới lá; D. Lát cắt ngang qua cuống lá (MDG – Mô dày góc; MM – Mô mềm; MC – Mô cứng; LB1 – Libe 1; G1 – Gỗ 1); E. Lát cắt ngang qua phiến lá (MDG – Mô dày góc; MMV – Mô mềm vỏ; STB – Sợi trụ bì; LB1 – Libe 1; G1 – Gỗ 1; MMT – Mô mềm tủy; MMGi – Mô mềm giậu; MMK – Mô mềm khuyết).



Hình 2. Cơ quan sinh sản của Bình bát nước *Annona glabra* L.

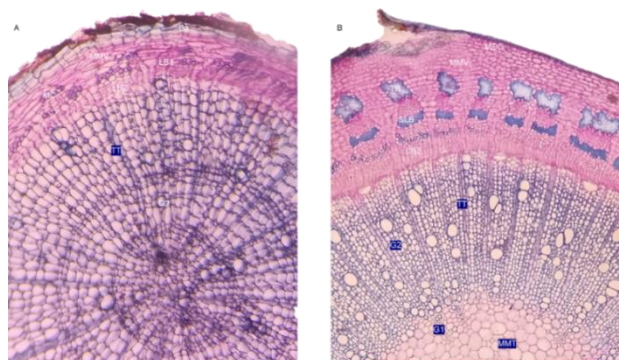
Ho1 – Ho3. Hoa; CHT1 – CHT2. Mặt ngoài và mặt trong cánh hoa vòng trong; CHN1-CHN2. Mặt ngoài và mặt trong cánh hoa ở vòng ngoài; N1 – N2. Nhị và nhụy; Q. Quả; Ha. Hạt.

Lá bắc giống lá thường, tồn tại. Cuống hoa dài 1,0-1,2 cm, hình trụ, màu xanh lục. Hoa riêng lẻ, mọc ở nách lá, đều lưỡng tính mẫu 3. Lá đài gồm 3 phiến nhỏ, hình tam giác, ròi, màu xanh lục, mặt ngoài nhám, kích thước 0,6-0,7 cm x 0,3-0,4 cm, tiền khai van. Cánh hoa gồm 6 phiến xếp trên 2 vòng, hình tam giác, ròi, tiền khai van, cánh hoa dày và mềm; Vòng ngoài gồm 3 phiến, mặt ngoài mặt xanh hơi ngả vàng, nhám, mặt trong màu trắng ngà, gốc cánh hoa có màu đỏ khoảng 1/2 phía dưới cánh hoa, kích thước 1,9-2,1 cm x 2,1-2,2 cm; Vòng trong gồm 3 phiến, mặt ngoài màu trắng ngà, mặt trong phớt đỏ gần hết cánh hoa, kích thước 0,8-1,1 cm x 1,8-2,1 cm. Nhị nhiều, ròi, đỉnh xoắn ốc trên đế hoa lồi, chỉ nhị rất ngắn, bao phấn 2 ô, nứt dọc. Nhụy nhiều, ròi, đỉnh xoắn ốc trên đế hoa lồi; Bầu noãn 1 ô, chứa 1 noãn (Hình 2).

Quả tụ, hình trứng ngược, vỏ quả màu vàng xanh, khi chín có màu vàng, láng, kích thước 6,5 x 9,8 cm. Thịt quả nạc, màu vàng nhạt. Hạt láng, màu nâu, kích thước 0,6-0,8 x 0,7-0,9 cm (Hình 2).

Đặc điểm cấu tạo giải phẫu

Rễ: Vi phẫu rễ có dạng hình tròn, vùng vỏ chiếm 1/10 bán kính vi phẫu, phần trung trụ chiếm 9/10 bán kính vi phẫu. Bần gồm 3-5 lớp tế bào hình chữ nhật, vách uốn lượn tẩm chất bần, xếp thành vòng đồng tâm và dây xuyên tâm. Mô mềm vỏ kiểu mô mềm đạo gồm 2-3 lớp tế bào, hình đa giác hơi dài, vách cellulose. Cụm mô cứng gồm 1-2 lớp tế bào xếp lộn xộn khít nhau, vách tẩm chất gỗ, khoang hẹp. Libe 1 gồm 1 nhóm tế bào hình đa giác xếp lộn xộn, kích thước nhỏ không đều nhau, bị ép dẹp. Libe 2 gồm 5-7 lớp tế bào, vách cellulose, xếp thành dây xuyên tâm, có sợi libe 2 gồm 2-4 lớp tế bào vách tẩm chất gỗ. Gỗ 2 chiếm tâm. Mô mềm gỗ vách tẩm chất gỗ, xếp thành dây xuyên tâm. Mạch gỗ 2 có kích thước tương đương mô mềm gỗ 2, hình đa giác gần tròn, vách tẩm chất gỗ, xếp lộn xộn. Tia tủy 1-2 dãy từ tâm vi phẫu xuyên qua vùng gỗ và libe (Hình 3A).



Hình 3. Lát cắt ngang qua rễ và thân của Bình bát nước *Annona glabra* L.

A. Rễ (Ba – Bần; MMV – Mô mềm vỏ; MC – Mô cứng; LB1 – Libe 1; LB2 – Libe 2; G2 – Gỗ 2);
B. Thân (MDG – Mô dày góc; MMV – Mô mềm vỏ; TB – Trụ bì; SLB – Sợi libe; LB2 – Libe 2; G2 – Gỗ 2;
TT – Tia tủy; G1 – Gỗ 1; MMT – Mô mềm tủy)

Thân: Vi phẫu thân hình gần tròn, vùng vỏ chiếm 1/3 bán kính vi phẫu, phần trung trụ chiếm 2/3 bán kính vi phẫu. Bần ở thân già gồm 3-5 lớp tế bào xếp thành dây xuyên tâm, vách tẩm chất bần. Mô dày góc gồm 5-7 lớp tế bào, không liên tục, xếp lộn xộn, vách bằng cellulose. Mô mềm vỏ kiểu mô mềm đạo gồm 2-3 lớp tế bào, vách

bằng cellulose. Trụ bì hóa mô cứng gồm 8-11 lớp tế bào hình đa giác, vách dày tấm chất gỗ, khoang tế bào hẹp, xếp lộn xộn thành cụm. Mô dẫn có kiểu hậu thể liên tục và có chùy libe. Mỗi chùy libe có libe 2 kết tầng gồm libe 1 có 3-4 lớp tế bào hình đa giác, xếp lộn xộn, vách bằng cellulose, gần như bị ép dẹp; Libe 2 gồm 6-8 lớp tế bào hình chữ nhật, kích thước gần đều xếp thành dãy xuyên tâm, xen kẽ với 3-5 lớp sợi libe vách tấm chất gỗ, khoang hẹp, xếp lộn xộn. Mạch gỗ 2 hình bầu dục, vách tấm chất gỗ, kích thước khá đều, xếp lộn xộn nằm trong vùng mô mềm gỗ 2, vách tấm chất gỗ, xếp thành dãy xuyên tâm. Mỗi bó gỗ 1 có 3-5 mạch gỗ 1 hình tròn, vách tấm chất gỗ, xếp lộn xộn, phân hóa ly tâm; Mô mềm gỗ 1 tế bào hình đa giác, xếp lộn xộn, vách bằng cellulose. Giữa các bó dẫn là tia tùy gồm 2-3 dãy tế bào hình đa giác, xếp thành dãy, vách tấm chất gỗ ở vùng gỗ, vách cellulose vàloe rộng ở vùng libe. Mô mềm tùy vách cellulose, xếp lộn xộn theo kiểu mô mềm đạo (Hình 3B).

Cuống lá: Vi phẫu có mặt dưới tròn, mặt trên bằng hay hơi lõm xuống thành hình lòng máng nông. Biểu bì 1 lớp, vách cellulose, vách ngoài phủ cutin. Mô dày góc 2-3 lớp tế bào, vách cellulose. Mô mềm vỏ đạo nhiều lớp tế bào vách cellulose, rải rác các sợi mô cứng và cụm tế bào mô cứng vách tấm chất gỗ. Bó dẫn có 3 bó rời xếp thành hình cung, gỗ ở trên, libe ở dưới. Mỗi bó gỗ từ 10-14 dãy, mỗi bó từ 5-7 mạch gỗ, vách tấm chất gỗ, nằm trong mô mềm gỗ vách cellulose. Libe 1 xếp thành từng cụm bên dưới gỗ 1, vách cellulose. Mô mềm tùy đạo vách bằng cellulose, rải rác các tinh thể calci oxalat (Hình 1D).

Phiến lá: Gân giữa có mặt dưới lõm tròn, mặt trên lõm hình chữ V. Tỷ lệ gân giữa giày gấp 5 lần phiến lá chính thức. Gân giữa gồm các mô: Biểu bì trên và biểu bì dưới 1 lớp tế bào, vách cellulose, vách ngoài phủ cutin. Mô dày góc trên và dưới 2-4 lớp tế bào, vách cellulose, xếp lộn xộn. Mô mềm đạo nhiều lớp tế bào vách cellulose, xếp lộn xộn, rải rác có các tế bào tiết. Sợi trụ bì từ 4-6 lớp tế bào bên ngoài libe 1, vách dày tấm chất gỗ. Bó dẫn xếp hình cung có gỗ ở trên libe ở dưới. Mạch gỗ xếp thành dãy 3-5 mạch, vách tấm chất gỗ xen kẽ với mô mềm gỗ vách tấm chất gỗ, xếp lộn xộn. Libe gồm 8-10 lớp tế bào, xếp thành cụm, vách cellulose. Tia tùy 1-2 dãy tế bào hẹp. Phiến lá chính thức gồm: Biểu bì trên và biểu bì dưới 1 lớp tế bào hình chữ nhật, biểu bì trên kích thước lớn hơn biểu bì dưới, có phủ cutin, lỗ khí ở biểu bì dưới. Thịt lá có cấu tạo dị thể bất đối xứng, trong vùng thịt lá có các bó dẫn phụ bị cắt xéo. Mô mềm giậu 1 lớp tế bào, hình đa giác thuôn dài, có diệp lục, vách cellulose, kích thước không đều. Mô mềm đạo 6-10 lớp tế bào, hơi đa gần giác, kích thước không đều, vách bằng cellulose (Hình 1E).

Khi so sánh đặc điểm hình thái của Bình bát nước với mô tả của Phạm Hoàng Hộ trong Cây cỏ Việt Nam, có một số điểm khác biệt như rải rác có lông che chở đa bào ở gân phụ, mặt dưới của lá; Số lượng cặp gân phụ nhiều hơn 7-12 cặp (Cây cỏ Việt Nam là 7-8 cặp); Phần thịt quả có màu vàng nhạt (mô tả của Phạm Hoàng Hộ (2013) là màu trắng). Nhưng so sánh với mô tả của Ganeshaiah, các đặc điểm của Bình bát nước thu tại Kiên Giang có đặc điểm tương tự (Ganeshaiah, 2024). Những đặc điểm về hoa, quả và hạt khá tương đồng so với mô tả của Phạm Hoàng Hộ và một số tác giả khác về điểm đặc trưng cho họ Annonaceae như hoa mẫu 3, vòng ngoài là 3 lá dài có kích thước nhỏ, 2 vòng trong mỗi vòng 3 cánh hóa to dày, mềm, tiền khai van; Nhị và nhụy rời, nhiều; Quả tụ (Trần Thị Xuân Lộc *et al.*, 2024).

Về cấu tạo giải phẫu. Khi so sánh với nghiên cứu trên cây Dẻ trầu (*Melodorum fruticosum* Lour.) thuộc họ Annonaceae có một số điểm khác như không có chùy libe và libe 2 kết tầng ở vi phẫu thân. Tuy nhiên một số đặc điểm cấu tạo giải phẫu đặc trưng ở họ Annonaceae như kiểu mô dẫn hình cung ở lá, có trụ bì hóa mô cứng bên ngoài libe 1, có tế bào tiết tinh dầu trong vùng mô mềm của thân và lá (Trần Thị Xuân Lộc *et al.*, 2024).

Khi so sánh những đặc điểm về hình thái đối với loài Na (*Annona squamosa* L.), và loài Mãng cầu xiêm (*Annona muricata* L.) có khá nhiều điểm giống nhau như có lông che chở đa bào một dãy trên biểu bì của lá; Lỗ khí kiểu hỗn bào. Về cấu tạo giải phẫu. Đối với thân có những đặc điểm như chùy libe, libe 2 kết tầng, tế bào tiết trong vùng mô mềm; Ở lá, bó dẫn kiểu vòng cung với trụ bì hóa mô cứng, vách tấm chất gỗ dày và nhiều lớp tế bào, có tế bào tiết và tinh thể calci oxalat trong vùng mô mềm; Cuống lá có các bó dẫn rời nhưng xếp thành hình cung với gỗ chồng libe, cụm mô cứng rải rác trong vùng mô mềm. Tuy nhiên ở cuống lá của loài Mãng cầu xiêm (*Annona muricata* L.), số lớp tế bào trong một cụm mô cứng nhiều hơn so với loài Bình bát (*Annona glabra*) (Trương Thị Đẹp, 2010; Huỳnh Thị Mỹ Duyên, Lê Hoàng Vũ, 2021). Có thể đây là những đặc điểm đặc trưng của chi *Annona*.

Đặc điểm bột dược liệu vỏ thân Bình bát nước

Bột vỏ thân có độ ẩm 7,80%, có màu vàng nâu, mùi thơm nhẹ, vị đắng, bột thô có xơ. Cấu tử của bột dược liệu gồm: mảnh mô mềm hình đa giác gần tròn hay hình bầu dục, xếp lộn xộn; Các loại tinh thể calci oxalat: hình khối lập phương, hình lăng trụ, hình kim (có thể riêng lẻ hoặc tập hợp thành bó); Sợi mô cứng với vách dày; Tế bào mô cứng có vách dày, ống trao đổi, hình đa giác; Mảnh bản (Hình 4).



Hình 4. Cấu tử của bột vỏ thân Bình bát nước *Annona glabra* L.

A. Mảnh bản; B. Tế bào mô cứng; C. Sợi mô cứng; D. Mảnh mô mềm; E, F. Tinh thể calci oxalate hình kim; G. Tinh thể calci oxalate hình khối

Đặc điểm cao chiết

Bột vỏ thân Bình bát nước có độ ẩm 7,80%. Với 50 g bột thô, sau khi chiết thu được 14,70 g cao có độ ẩm 12,28%.

Thành phần hóa học trong cao chiết

Dựa vào các phản ứng với thuốc thử đặc trưng, để định tính nhóm hợp chất có trong cao chiết cồn của vỏ thân cây Bình bát nước.

Bảng 1. Kết quả định tính thành phần hóa thực vật trong cao chiết cây Bình bát nước (*Annona glabra* L.)

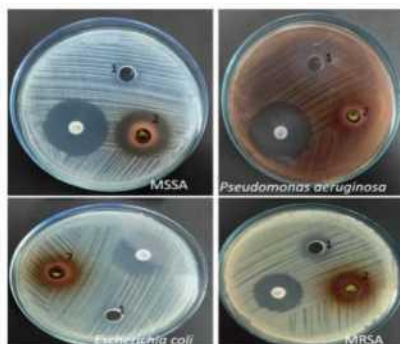
Nhóm hợp chất	Thuốc thử	Phản ứng dương tính	Kết quả định tính	Kết quả định tính chung
Alkaloid	Dragendorff	Tủa màu đỏ cam đến nâu đỏ	+++	Có
	Mayer	Tủa trắng đến vàng nhạt	+++	Có
	Hager	Tủa vàng cam	++	Có
	Wagner	Tủa đỏ nâu	++	Có
Flavonoid	Mg/HCl	Dung dịch có màu từ cam đến đỏ	++	Có
	NaOH 10%	Dung dịch màu xanh rêu	-	không
	NaOH 1%/ EtOH	Dung dịch màu từ vàng, cam, đỏ tím	-	Không có
	AlCl ₃ 1%/ EtOH	Dung dịch có màu từ xanh lục đến xanh đen	-	Không có
Serquiterpen lacton	Baljet	Dung dịch màu vàng cam đến đỏ đậm	+	Có
	Tollens	Có lớp bạc tủa bám lên thành ống nghiệm	+	Có
Iridoid Aglycon	Trim-Hill	Đùn nhẹ xuất hiện màu xanh dương	-	Không có
Phản đường	Molisch	Xuất hiện vòng nhẫn màu đỏ hay tím ở mặt phân cách 2 lớp dung dịch	+	Có
	Keller-Kiliani	Dung dịch có màu xanh lục sau 2-3 phút	-	Không có
Tanin	Gelatin muối	Tủa màu vàng nhạt, để lâu hóa nâu	+	Có
	Stiany	Xuất hiện tủa đỏ	-	Không có

(-): Không, (+): Có, số lượng dấu (+) thể hiện mức độ dương tính của thí nghiệm.

Trong cao chiết của vỏ thân Bình bát nước có sự hiện diện của các nhóm chất alkaloid, flavonoid, serquiterpen, đường và tannin. Trong đó hàm lượng alkaloid và flavonoid nhiều hơn so với các hợp chất còn lại. Chang và đồng tác giả (2000) đã công bố ly trích được 20 hợp chất trong đó có 1 hợp chất thuộc nhóm alkaloid. Theo Phạm Nhật Trinh và đồng tác giả (2014) trên lá Bình bát nước cũng có flavonoid, ngoài ra còn có diterpenoid. Đối với các bộ phận khác của Bình bát nước, ở thịt trái có chứa các hợp chất thuộc nhóm steroid, alkaloid; Hạt và lá có acetogenin (Luis et al., 2020).

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết

Khi bổ sung 50 μ L DMSO 10% vào giếng 1 của các đĩa thạch, tất cả các đĩa thạch có chứa vi khuẩn MSSA, MRSA và *Ps. aeruginosa* đều xuất hiện vòng vô khuẩn ngoại trừ đĩa có *E. coli*. Khi bổ sung 50 μ L dịch cao chiết ở nồng độ 200 mg/mL vào giếng 2 của mỗi đĩa thạch, ở các đĩa thạch đều xuất hiện vòng vô khuẩn với bán kính lần lượt 16; 13; 14 và 11 mm (Bảng 3) đối với các đĩa vi khuẩn MSSA, MRSA, *Ps. aeruginosa* và *E. coli*. Vi khuẩn MSSA, MRSA, *Ps. aeruginosa* và *E. coli* và đều bị kháng sinh kanamycin ức chế sự phát triển (Hình 2).



Hình 5. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết Bình bát nước (*Annona glabra* L.) 1. DMSO 10%, 2. Dịch cao chiết

Đường kính vòng kháng khuẩn được tính bằng cách lấy đường kính vòng vô khuẩn của cao chiết trừ cho đường kính vòng vô khuẩn của DMSO 10%, đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết đối với MSSA là 6 mm, *E. coli* là 11 mm, đối với vi khuẩn MRSA và *Ps. Aeruginosa* không có vòng kháng khuẩn.

Bảng 2. Đường kính vòng ức chế sự phát triển một số khuẩn của cao chiết vỏ thân Bình bát nước (*Annona glabra* L.) L.

	MSSA	MRSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
DMSO 10% (mm) (1)	10	14	14	0
Dịch cao chiết (mm) (2)	16	13	14	11
Kanamycin (mm)	20	17	22	19
Đường kính vòng kháng khuẩn (2-1) (mm)	6	0	0	11

Như vậy, cao chiết cùi từ vỏ thân Bình bát nước có khả năng kháng vi khuẩn MSSA và *E. coli*. Đây là những chủng vi khuẩn thường xuyên gây các bệnh như nhiễm khuẩn huyết, nhiễm trùng da, đường ruột và thường gây nhiễm trùng bệnh viện. Kháng sinh kanamycin là một loại kháng sinh có tác dụng diệt khuẩn. Thuốc ức chế sự tổng hợp protein của các vi khuẩn nhạy cảm bởi liên kết không thuận nghịch với tiểu đơn vị 30S ribosom của tụ cầu vàng và các trực khuẩn gram âm (Bộ Y tế, 2015). Theo kết quả định tính, trong cao vỏ thân Bình bát có nhiều alkaloid và flavonoid. Đây là các hợp chất có thể ức chế sự phát triển của một số vi khuẩn (Galvão *et al.*, 2016). Theo nghiên cứu của Padmaja và cộng sự (1995), cao chiết n-hexan có thể ức chế các vi khuẩn *Staphylococcus pyogenes*, *Pseudomonas pyocyaneae*, *Proteus vulgaris*. Ngoài ra, cao n-hexan còn có hoạt tính kháng kí sinh trùng *Haemonchus* (Padmaja *et al.*, 1995). Cao chiết từ vỏ thân Bình bát nước có thể là nguồn tham khảo trong việc tìm kiếm nguồn kháng sinh mới có nguồn gốc từ thực vật.

KẾT LUẬN

Những đặc điểm thực vật học của cây Bình bát nước đã bổ sung thêm vào nguồn dữ liệu thực vật ở Việt Nam, cung cấp cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu về phân loại học. Sự hiện diện của các nhóm hợp chất alkaloid, flavonoid, serquiterpen, đường và tannin đóng vai trò trong việc ức chế sự phát triển của một số vi khuẩn. Kết quả này là nguồn tham khảo trong việc tìm kiếm nguồn thực vật có dược tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chang FR, Chen CY, Hsieh TJ, Cho CP and Wu YC (2000). Chemical Constituents from *Annona Glabra* III. *JCCS*, 47(4B), 913-920
- Trương Thị Đẹp (2010). Cây thuốc. Retrieved from <http://uphcm.edu.vn/caythuoc/index.php?q=book/export/html/325>
- Galvão SSL, Monteiro AS, Siqueira EP, Bomfim MRQ, Dias-Souza MV, Ferreira GF, Denadai AML, Santos ARC, Santos VL, Souza-Fagundes EM, Fernandes ES and Neto VM, (2016). *Annona glabra* Flavonoids Act As Antimicrobials by Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Cell Walls. *Front Microbiol*, 7.

- Ganeshaiah NK (2024, 8 3). Retrieved from India Biodiversity Portal: <https://indiabiodiversity.org/species/show/228725#associations>
- Phạm Hoàng Hộ (2003). Cây cỏ Việt Nam. Hồ Chí Minh: Nhà xuất bản Trẻ.
- Ma HR, Jianfeng Han JF, Qinchuan Dong QC (2018). Neuroprotective effect of *Annona glabra* extract against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in neonatal rats. *J Photochem Photobiol B* 181, 106-114.
- Huỳnh Thị Mỹ Duyên và Lê Hoàng Vũ. (2021). Xác định đặc điểm thực vật học của Mãng cầu xiêm (*Annona muricata* L. Annonaceae). *Tạp chí Y dược học Cần Thơ*, 40, 53-61.
- Anaya-Esparza LM, García-Magaña ML, Domínguez-Ávila JA, Yahia EM, Norma J. Salazar-López NJ, González-Aguilar GA and Montalvo-González E (2020). Annonas: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. *Food Res Int*, 138.
- Mokhtar FA, Selim NM, Elhawary SS, Soha RAH, Mona HH, Marzough AA, Ali AS, Mohammad YA, Serag E IE, Lamiaa IF and Rana MI (2022). Green Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Annona glabra* and *Annona squamosa* Extracts with Antimicrobial, Anticancer, Apoptosis Potentials, Assisted by *in silico* Modeling, and Metabolic Profiling. *Pharmaceuticals* (Basel).
- Nguyễn Thị Thu Hiền và cộng sự. (2015). Các hợp chất diterpenoit phân lập từ quả cây Na biển (*Annona glabra*) (phần 1). *Tạp chí Hóa học*, 53(3), 390-393.
- Linh NTT, Ha PTH, Day PV, Hai LTT, Vu SH, Nghĩa NT, Dung TT, Phu TQ, Hong Mong Huyen HM, Hyung KD, Luan NT (2024). Efficacy of *Annona glabra* extract against acute hepatopancreatic necrosis disease in white-leg shrimp (*Penaeus vannamei*). *J Invertebr Pathol*.
- Padmaja V, Thankamany V, Hara N, Fujimoto Y, Hisham A (1995). Biological activities of *Annona glabra*. *J Ethnopharmacology*, 48(1995), 21-24.
- Phạm Thị Nhật Trinh, Le Tien Dung và Đặng Thị Cẩm Nhung (2014). Hợp chất diterpenoid và flavonoid từ lá Bình bát nước *Annona glabra* L. (Annonaceae). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 32(2014), 125-127.
- Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. HCM.
- Soleman DM (2023). GC/MS Analysis, Cytotoxicity, and Antiviral Activities of *Annona glabra* Hexane Extract Supported by *In Silico* Study. *Molecules*.
- Bộ Y tế (2015). Dược thư Quốc gia Việt Nam. Hà Nội: Khoa học và Kỹ thuật.
- Trần Thị Xuân Lộc và cộng sự. (2024). Nghiên cứu đặc điểm hình thái và vi phẫu của cây Dẻ trầu. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Duy Tân*, 2(63), 55-62.

SURVEY OF BOTANY CHARACTERISTICS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF STEM BARK *ANNONA GLABRA* L.

Le Thu Thuy*, Vo Phat Thinh, Lu Hu Thinh

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

SUMMARY

Pond Apple (*Annona glabra* L.) is quite popular in Vietnam. Many studies around the world have shown that leaves, fruits, and seeds have the ability to inhibit the growth of some types of cancer cells and bacteria. However, this species is often confused with *Annona reticulata* L. Therefore, research on the morphology, anatomy and antibacterial activity of the stem bark of *Annona glabra* L. was carried out. The results of the study will provide more data on plant characteristics and further contribute to the goal of finding new medicinal sources with medicinal properties. Root, stem, leaf, flower, fruit, and seed organs were collected, and botanical characteristics were observed. Qualitative chemical composition in extract and determination of antibacterial activity by well diffusion method. As a result, the botanical characteristics of the *Annona glabra* have typical characteristics of the genus *Annona*, The ethanol extract of the stem bark contains alkaloids, flavonoids, sesquiterpenes, and tannins. The extract inhibits the growth of Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: Pond Apple, *Annona glabra*, antibacterial activity, botany characteristics, chemical composition, Swamp Apple.

* Author for correspondence: Tel: 0389994035; Email: letthuy@ntt.edu.vn

HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA, KHÁNG KHUẨN VÀ KHÁNG VIÊM CỦA CAO CHIẾT CÂY XƯƠNG KHỈ (*Clinacanthus nutans* L.)

Huỳnh Như Ý¹, Đỗ Thị Thảo³, Nguyễn Trọng Nghĩa¹, Phan Hoàng Duy², Chế Thị Cẩm Hà^{1*}

¹Trường Đại học Khoa học-Đại học Huế

²Bệnh viện Trung ương Huế

³Viện Công nghệ ADN và Phân tích di truyền, Hà Nội

TÓM TẮT

Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn của cao chiết cây Xương khỉ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.)) Lindau thu tại tỉnh Quảng Ngãi. Chúng tôi nhận thấy chiết xuất từ *C. nutans* chứa các hợp chất (stigmastrol, lupeol, vitexin, isovitexin, orientin, schaftoside) có hoạt tính chống viêm và điều hòa miễn dịch. Cao chiết có khả năng kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), khả năng chống oxy hóa tốt DPPH với IC₅₀ 40,02 ± 1,13 µg /mL và ABTS với IC₅₀ 39,58 ± 1,03 µg/mL. Dòng tế bào RAW264.7 đã được lựa chọn để nghiên cứu độc tính miễn dịch của cao chiết *Clinacanthus nutans*. Kết quả cho thấy, khi nồng độ cao chiết *C. nutans* tăng, khả năng sống của tế bào RAW264.7 có xu hướng giảm dần từ nồng độ 100 µg/mL đến 1000 µg/mL. Cao chiết *C. nutans* ức chế NO hiệu quả, hiệu quả nhất là nồng độ 100 µg/mL, có giá trị IC₅₀ 12,85 ± 3,41 µg/mL.

Từ khóa: *Clinacanthus nutans*, đại thực bào RAW264.7, chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm.

MỞ ĐẦU

Tình trạng kháng kháng sinh tại Việt Nam ngày càng gia tăng, là mối lo ngại đáng báo động của nhiều loại bệnh khác nhau vì làm ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị. Việc sử dụng các loại thuốc kháng viêm, kháng sinh trong thời gian dài làm giảm sự đề kháng, rối loạn tiêu hóa, nguy cơ suy thận, biến chứng tim mạch và có thể gây ra tình trạng kháng kháng sinh (Harirforoosh, 2014; Currie, 2013). Cây Xương khỉ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.)) Lindau là cây thuốc nổi tiếng trong y học cổ truyền ở Đông Nam Á, là thuốc điều hoà miễn dịch, chữa bỏng, tiểu đường,... (Khoo, 2018) do chứa một loạt các hợp chất có hoạt tính sinh học như stigmastrol, lupeol, *b*-sitosterol, belutin, myricyl, vitexin, isovitexin, orientin, schaftoside, isoorientincerebrosid (Ho, 2013). Các hợp chất này được chứng minh giúp ức chế các cytokine viêm, điều trị các bệnh liên quan đến stress oxy hóa ở cấp độ phân tử và tế bào để mô tả sự kích hoạt hoặc ức chế đối với các con đường truyền tín hiệu phụ thuộc vào hoạt tính chống oxy hóa (Borghini, 2013).

Việt Nam đã công bố về đánh giá hoạt tính sinh học của *C. nutans* ở tỉnh An Giang và Ninh Thuận (Dan, 2014). Tuy nhiên chưa có những công bố liên quan của loài cây này ở tỉnh Quảng Ngãi, nhằm đánh giá các hoạt tính kháng viêm, kháng khuẩn của cây *C. nutans* ở Quảng Ngãi đồng thời tìm kiếm những bằng chứng khoa học đáng tin cậy rõ ràng hơn về tác dụng của cây *C. nutans* tại Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Bộ phận trên mặt đất của cây Xương khỉ (*Clinacanthus nutans*) tại huyện Mộ Đức, tỉnh Quảng Ngãi được thu hái từ tháng 5-7/2023. Mẫu đã được ThS. Nguyễn Việt Thắng định danh và lưu tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Các chủng vi khuẩn kiểm định có nguồn gốc từ Bệnh viện TW Huế: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853),

Dòng tế bào RAW264.7 nuôi cấy trong DMEM, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1,0 mM sodium pyruvate, 10% FBS (Gibco). Sau 3-5 ngày, cấy chuyển với tỉ lệ (1:3) và nuôi 37°C, 5% CO₂.

Dòng tế bào RAW264.7 được cung cấp bởi hãng InvivoGen, Toulouse, France.



Hình 1. Thân lá cây Xương khỉ (*Clinacanthus nutans*)

Phương pháp

Tạo cao chiết: phần thân lá cây được rửa sạch và tráng với nước cất. Để ráo và sấy ở 37°C từ 2-3 ngày đến khi độ ẩm đạt 6-7%, nghiền nhỏ bằng máy nghiền IKA, tốc độ máy 34.000 vòng/phút, cho đến kích thước mắt lưới 0,25 mm. Sau đó, cho một lượng mẫu đã được nghiền ủ với dung môi ethanol 70% theo tỉ lệ 1:10 vào chai thủy tinh có nắp kín, ủ 3 ngày ở nhiệt độ phòng. Quá trình này lặp lại 3 lần để tách được hoàn toàn có trong mẫu thử. Lọc mẫu bằng giấy Whatman No.1; dịch lọc được cô cạn bằng thiết bị cô quay chân không ở 60°C cho đến khi cặn chiết màu nâu đen (độ ẩm 4,7%). Bảo quản mẫu cao chiết ở 4°C.

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa bằng thử nghiệm DPPH và ABTS

Đánh giá khả năng bắt gốc DPPH: Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua khả năng làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng 517 nm. Pha DPPH nồng độ 100 µM trong methanol. Hỗn hợp phản ứng có thể tích 3 mL, gồm 1,5 mL mẫu khảo sát ở các nồng độ 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 5 µg/mL và dung dịch DPPH nồng độ 100 µM. Các hỗn hợp phản ứng được lắc trong 1 phút và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, đo quang ở bước sóng 517 nm. Mẫu trắng được tiến hành tương tự mẫu thử nhưng thay 1,5 mL DPPH bằng 1,5 mL methanol. Tác dụng bắt gốc tự do DPPH được đánh giá qua giá trị IC₅₀ (TCVN 11939:2017).

Đánh giá khả năng bắt gốc ABTS: Gốc ABTS được tạo ra bằng phản ứng giữa ABTS (7 mM) với K₂S₂O₈ (2,45 mM) trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Lấy 0,1 mL dung dịch mẫu với các nồng độ khác nhau (từ 5 đến 100 µg/mL) trộn với 3,9 mL dung dịch gốc ABTS tạo ra ở trên. Ủ 7 phút hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ quang của dung dịch sau phản ứng được đo ở bước sóng 734 nm. Ascorbic acid làm chất đối chứng dương (Re, 1999).

Tính toán: Hoạt tính kháng oxi hóa (HTKO) được xác định bởi công thức HTKO (%) = [(OD_m – OD_t)/OD_m] × 100 (trong đó OD_m, OD_t lần lượt là mật độ quang mẫu trắng và mẫu thử). Xây dựng đường biểu diễn sự tương quan giữa HTKO (%) và nồng độ mẫu thử, từ đó suy ra giá trị IC₅₀ là nồng độ ức chế 50% gốc tự do DPPH/ABTS.

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Luria Bertani broth đến khi đạt được mật độ tế bào khoảng 1-5×10⁶ CFU/mL. Lấy 0,1 mL dịch vi khuẩn và trải đều trên đĩa petri có chứa môi trường Tryptic Soy Agar. Các đĩa giấy thấm vô trùng (đường kính 6mm) chứa 20µL cao chiết đã pha loãng bằng DMSO 5% ở các nồng độ 100 mg/mL, 75 mg/mL, 50 mg/mL và 25 mg/mL được đặt lên bề mặt đĩa đã dàn đều vi khuẩn. Sau đó, các đĩa Petri đặt ở 4°C trong 6 giờ cho cao chiết thấm vào môi trường thạch và nuôi ở 35°C trong 24 giờ. Đĩa giấy kháng sinh Ampicilin được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm là DMSO 5%. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết đối với các chủng vi khuẩn được đo bằng đường kính vòng vô khuẩn sau 24 giờ nuôi (Celikel, 2008).

Phương pháp xác định khả năng gây độc tế bào: Dòng tế bào RAW264.7 lưu giữ trong nitơ lỏng được hoạt hóa và duy trì trong môi trường DMEM (Invitrogen) và 10% FBS cùng các thành phần thiết yếu khác, nuôi sơ cấp tế bào trong chai nuôi T75 cm², 2 ngày thay môi trường/lần, nuôi ở 5% CO₂, độ ẩm 98%, 37°C. Tế bào phát triển ở pha log đạt hợp dòng 70-80% sử dụng thử nghiệm độc tính. Khảo sát khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của cao chiết thông qua khả năng sống sót của tế bào RAW 264,7 trong điều kiện nuôi có bổ sung cao chiết ở 3 nồng độ thử nghiệm: 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL và đối chứng âm là DMSO 5%. Tiến hành nuôi và đánh giá với mật độ 2 × 10⁵ tế bào/cm² trên đĩa 96 giếng, lặp lại 3 lần. Những giếng không ủ mẫu cao chiết *C. nutans* được xem là đối chứng. Sau 24 giờ tiến hành thay môi trường có bổ sung 3 nồng độ cao chiết 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, khả năng sống của tế bào được đếm sau khi nhuộm trypan blue sau 72h.

Phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7: dòng tế bào RAW 264.7 nuôi ở đĩa 96 giếng với 2 × 10⁵ tb/giếng, 37°C, 5% CO₂ trong 24h. Sau 24h, môi trường nuôi được loại bỏ, thay bằng DMEM (Invitrogen) không có FBS trong 3h. Tế bào sau đó được ủ cao chiết *C. nutans* ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (10 µg/mL) trong 24h. Đối chứng âm là những giếng không ủ mẫu cao chiết *C. nutans* và chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu. Đối chứng dương là Dexanethasone (Sigma) ở các nồng độ 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125 µM. Nitrite (NO²⁻) là chỉ thị cho việc tạo NO, được xác định nhờ bộ kit Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). 100 µL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và thêm 100 µL Griess reagent: 50 µL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) phosphoric acid và 50 µL 0,1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước. Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite được đo bằng microplate reader, bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank). Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO₂ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS). Đĩa nuôi tế bào thử nghiệm sự biểu hiện NO, sau khi thu dịch nổi xác định hàm lượng NO sẽ được thêm vào mỗi giếng 90 µL môi trường nuôi tế bào và 10 µL MTT (nồng độ cuối cùng là 5 mg/mL). Sau 4h, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 µL DMSO 100%. Khả năng ức chế sản sinh NO tương ứng của mẫu được xác định nhờ công thức :

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] * 100$$

Các phân tích được thực hiện ba lần lặp lại, kết quả là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý bằng chương trình MS. Excel 2016 (Đặng Văn Giáp, 2000).

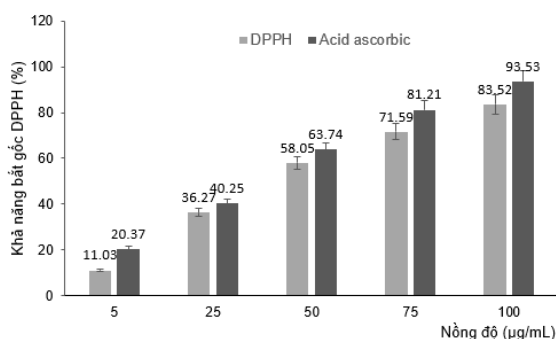
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết Xương khỉ trên thử nghiệm DPPH và ABTS

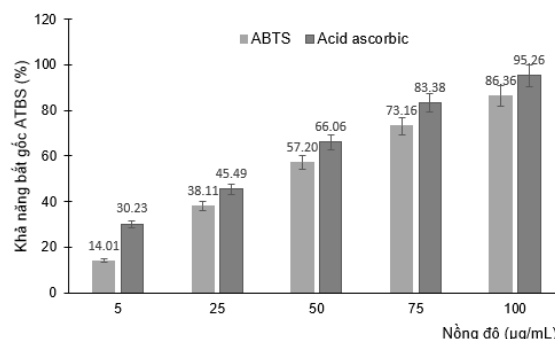
Việc thu dọn các gốc tự do là một trong các cơ chế ức chế quá trình oxy hóa lipid, thường được sử dụng để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu. Các chất kháng oxy hóa có khả năng trung hòa gốc DPPH tự do tạo thành sản phẩm khử DPPH-H, dung dịch phản ứng sẽ chuyển từ màu tím sang màu vàng cam. Trong khi đó, Cation ABTS⁺⁺ là một chất phát quang màu xanh, khi cho chất chống oxy hóa vào dung dịch chứa ABTS⁺⁺, các chất chống oxy hóa sẽ khử ion này thành ABTS làm đổi màu. Như vậy, khả năng thu dọn gốc ABTS và gốc tự do DPPH là các phương pháp hữu hiệu để xác định hoạt tính chống oxy hóa của các chất trong mẫu nghiên cứu theo khả năng cho nguyên tử hydro hoặc cho electron, dựa trên sự giảm màu của gốc ABTS và DPPH. Khả năng thu dọn gốc tự do DPPH và ABTS của cao chiết giảm dần theo nồng độ từ 100 µg/mL đến 5 µg/mL được trình bày trong (Hình 1) và (Hình 2). Kết quả, được phân tích bởi phần mềm TableCurve 2Dv4 để đưa ra tác động thu nhận các gốc tự do của cao chiết đối với các gốc DPPH và ABTS thông qua giá trị nồng độ ức chế nửa tối đa (IC₅₀).

Bảng 1. Giá trị IC₅₀ về khả năng bắt gốc DPPH và ABTS của cao chiết

Thí nghiệm	Khả năng bắt gốc DPPH (IC ₅₀ µg/mL)		Khả năng bắt gốc ABTS (IC ₅₀ µg/mL)	
	Cao chiết	Ascorbic	Cao chiết	Ascorbic
1	39,17	38,43	37,42	26,04
2	41,78	32,06	40,06	30,45
3	39,65	31,15	41,26	29,67
IC ₅₀ ± SEM (µg/mL)	40,2 ± 1,13	33,88 ± 3,24	39,58 ± 1,60	28,72 ± 1,92



Hình 1. Khả năng thu dọn gốc tự do DPPH của cao chiết so với acid Ascorbic



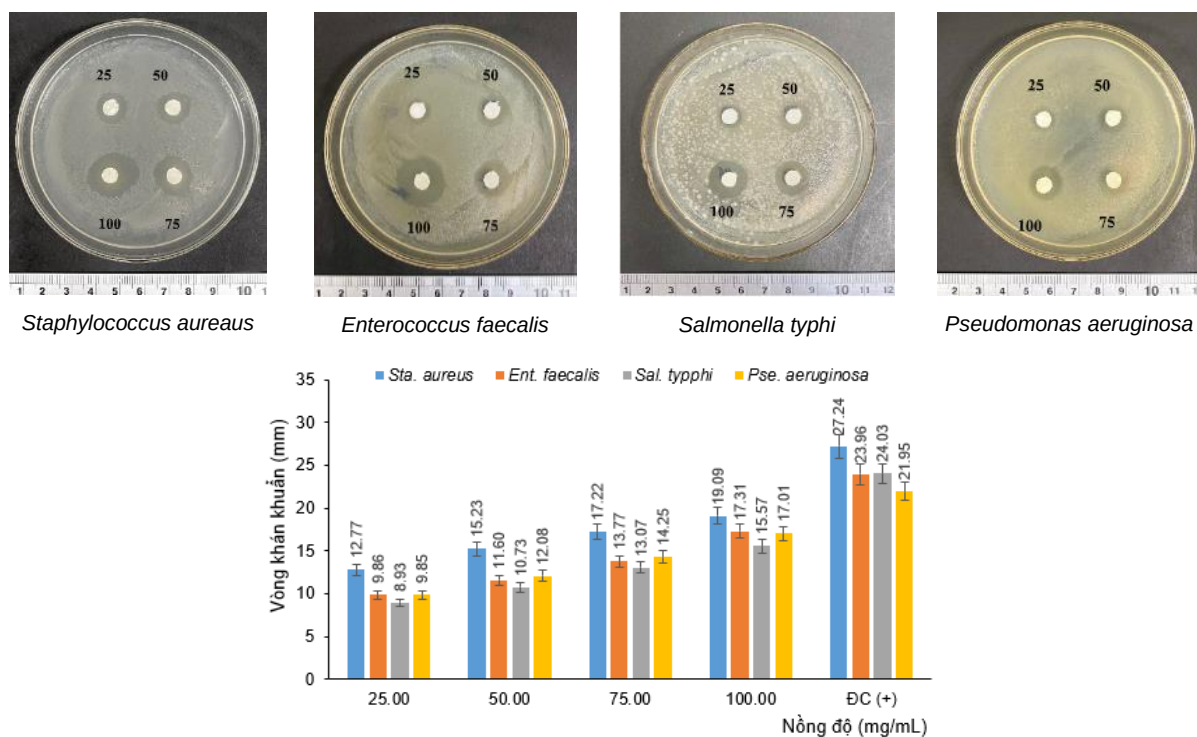
Hình 2. Khả năng thu dọn gốc tự do ABTS của cao chiết so với acid Ascorbic.

Kết quả cho thấy khả năng chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu cao hơn so với đối chứng dương thông qua các giá trị IC₅₀ thấp. Đối với khả năng thu dọn gốc DPPH giá trị IC₅₀ của cao chiết là 40,02 ± 1,13 µg/mL. Tương tự, giá trị IC₅₀ của cao chiết đối với khả năng thu dọn gốc ABTS lần lượt là 39,58 ± 1,03 µg/mL. Ở nồng độ 100 µg/mL, khả năng thu dọn gốc DPPH và ABTS của mẫu nghiên cứu đạt trên 80%, tuy nhiên hoạt tính của cao chiết đều thấp hơn so với chất đối chứng dương ở cùng nồng độ (acid Ascorbic).

Theo nghiên cứu của Tran Dinh Dieu Tinh (2014), chiết xuất methanol của cây *C.nutans* ở dãy nồng độ 0 đến 100 µg/mL có khả năng thu dọn gốc tự do DPPH với giá trị IC₅₀ là 114,50 µg/mL. Theo kết quả nghiên cứu của Pannangpetch (2007), chiết xuất ethanol của cây *C.nutans* cho thấy hiệu quả thu dọn gốc tự do DPPH cao nhất khoảng 68% (khoảng 0,08 lần so với hoạt động của acid ascorbic) với giá trị IC₅₀ = 110 µg/mL (Pannangpetch *et al.*, 2007). Với giá trị IC₅₀ thấp hơn, kết quả cho thấy hoạt động thu dọn gốc tự do DPPH trong nghiên cứu này tốt hơn so với nghiên cứu trước đây của Pannangpetch và đồng tác giả (2007) và Tran Dinh Dieu Tinh (2014). Điều này chứng minh rằng cao chiết từ cây Xương khỉ được thu hái ở Quảng Ngãi có khả năng chống oxy hóa tốt.

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết ở 4 nồng độ 100 mg/mL, 75 mg/mL, 50 mg/mL và 25 mg/mL trên 4 chủng *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* đều cho thấy khả năng kháng khuẩn của cao chiết. Chứng dương ampicillin ở nồng độ 50 µg/ml có đường kính vòng kháng khuẩn từ 21,95-27,24 mm, chứng âm (DMSO 5%) không có tác dụng kháng khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết đối với các chủng vi khuẩn được thể hiện ở (Hình 3).



Hình 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết so với đối chứng

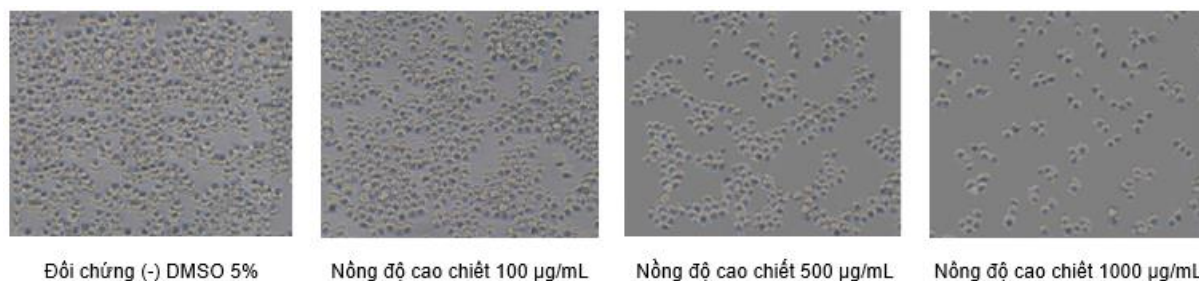
Cao chiết ở các nồng độ đều cho thấy khả năng kháng khuẩn, mạnh nhất đối với chủng *S. aureus* và yếu nhất đối với chủng *S. typhi*. Hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất ở nồng độ 100 mg/ml, đường kính vòng kháng khuẩn từ 15,55-19,09 mm. Ở nồng độ 25mg/mL cho thấy khả năng kháng khuẩn tương đối yếu với đường kính từ 8,93-12,77 mm và thấp hơn đối chứng dương.

Kết quả nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của chúng tôi là tương đồng với nghiên cứu của Sekar và đồng tác giả (2016) về hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết methanol *C. nutans* ở các nồng độ 25; 50 và 100 mg/mL đối với chủng *P. aeruginosa* có đường kính vòng kháng khuẩn trung bình từ $9,33 \pm 2,08$ đến $13,00 \pm 1,00$ mm, đối với chủng *S. aureus* có đường kính vòng kháng khuẩn trung bình từ $23,00 \pm 2,65$ đến $26,67 \pm 3,51$ mm.

Đánh giá khả năng gây độc tế bào RAW 264.7 của cao chiết

Theo dõi tế bào RAW 264.7 liên tục trong 72 giờ cho thấy dòng tế bào này phát triển theo xu hướng tồn tại dạng tế bào bám dính và một số ít tồn tại dạng tế bào không bám dính. Tính chất đa hình và khả năng thích ứng của điều kiện nuôi *in vitro* cho thấy tế bào RAW 264.7 thuận lợi cho việc thử nghiệm gây độc tế bào dưới tác động của cao chiết *C. nutans* ở các nồng độ pha loãng khác nhau lên khả năng sống sót của tế bào. Từ kết quả này, chúng tôi tiến hành thí nghiệm gây độc dòng tế bào RAW 264.7 ở 3 nồng độ 100 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1000 μ g/mL tương ứng với mật độ 2×10^5 tế bào/cm².

Kết quả nghiên cứu khả năng gây độc tế bào của cao chiết *C. nutans* thể hiện ở hình 5 cho thấy ở nồng độ 500 - 1000 μ g/mL cao chiết *C. nutans* gây ra độc tính miễn dịch lên dòng tế bào RAW264.7 thông qua việc giảm khả năng sống sót của tế bào sau 72h thí nghiệm. Trong khi đó, ở nồng độ 100 μ g/mL, không cho thấy khả năng gây độc tế bào so với đối chứng âm (DMSO 5%).



Hình 5. Khả năng gây độc dòng tế bào RAW 264.7 của cao chiết *C. nutans*. (x40)

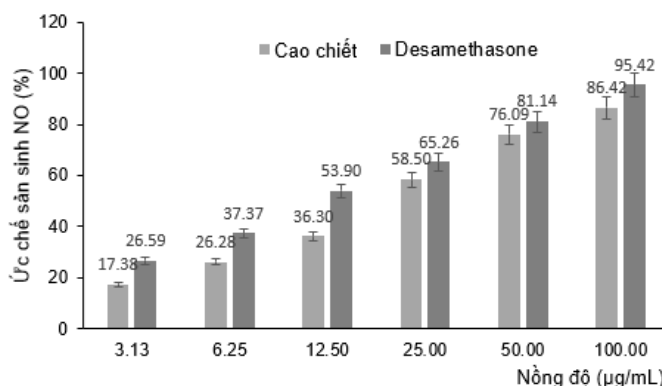
Khi so sánh với các nghiên cứu trước đây về tác động gây độc tế bào của *C.nutans*, các nghiên cứu chủ yếu được tiến hành trên các dòng tế bào ung thư và các dòng tế bào khác. Năm 2019, tác giả Esmaili và đồng tác giả đã có công bố tương tự về tác động gây độc trên dòng tế bào HCT-116 và CCd-18Co của chiết xuất *C. nutans*. Nồng độ chiết xuất nhỏ hơn 200 μ g/mL không cho thấy độc tính tế bào đáng kể đối với các tế bào được thử nghiệm. Phân đoạn chiết xuất methanol (CN-M) cho thấy độc tính tế bào đáng kể đối với các tế bào HCT-116 ở nồng độ 200 μ g/mL. Từ kết quả này chứng minh khả năng gây độc tế bào của cao chiết *C.nutans* phụ thuộc vào nồng độ sử dụng (Esmaili et al., 2019).

Sự đánh giá độc tính của tế bào đóng một vai trò quan trọng trong việc đánh giá khả năng duy trì cân bằng nội môi của tế bào dưới sự thay đổi nồng độ *C.nutans* khi được bổ sung vào môi trường nuôi. Kết quả cho thấy *C. nutans* tác động như một cơ chế hoạt động chính của nhiều tác nhân gây độc tế bào. Dựa vào kết quả đánh giá về hoạt tính gây độc tế bào theo cách phụ thuộc vào nồng độ là cơ sở cho việc đánh giá hoạt tính kháng viêm với nồng độ *C. nutans* được chia nhỏ hơn.

Đánh giá hoạt tính kháng viêm của cao chiết thông qua hoạt tính ức chế nitric oxide (NO)

Đánh giá khả năng ức chế của cao chiết *C.nutans* đến quá trình viêm gây ra bởi kích thích LPS, thông qua tác động kích thích của LPS, tế bào đáp ứng lại kích thích này bằng cách điều hòa miễn dịch và sản sinh NO, phóng thích các gốc tự do (Ruhee et al., 2019). NO là một phân tử gốc tự do có nhiều chức năng khác nhau bao gồm biến đổi protein, truyền tín hiệu tế bào và là một tín hiệu giữ vai trò quan trọng trong đáp ứng viêm của hệ miễn dịch (Sharma et al., 2007). Cao chiết *C.nutans* ức chế quá trình sản xuất NO qua trung gian lipopolysaccharit (LPS) trong tế bào RAW 264,7 được khảo sát ở dãy nồng độ từ 3.125 đến 100 μ g/mL. Kết quả được thể hiện ở (Hình 6)

Sự khác biệt giữa các nồng độ cao chiết có ý nghĩa thống kê (* $p < 0.05$) so với đối chứng dương Desamethasone được được xác định bằng T-test. Kết quả thể hiện giá trị TB $\pm$ SD từ ba thí nghiệm độc lập. Kết quả cho thấy, khi tăng dần nồng độ cao chiết đã ức chế đáng kể sự sản sinh các sản phẩm NO bởi kích thích LPS. Khả năng ức chế sản sinh các sản phẩm NO khá tốt thông qua các giá trị IC_{50} thấp (IC_{50} : 12,85 $\pm$ 3,41 μ g/mL).



Hình 6. Khả năng ức chế sản sinh NO do LPS gây ra của cao chiết so với đối chứng dương Desamethasone

Ở nồng độ 100 μ g/mL cao chiết đã ức chế lần lượt 86,42% các sản phẩm NO, thấp hơn so với đối chứng dương dexamethasone (95,42%). Mai và đồng tác giả (2016) cũng đã chứng minh cao chiết *C. nutans* ở dãy nồng độ 1,53 μ g/mL đến 100 μ g/mL có khả năng ức chế sản sinh các sản phẩm NO do kích thích LPS gây ra. Tất cả bốn cao chiết cụ thể là chiết xuất lá sử dụng dung môi phân cực (LP), chiết xuất lá sử dụng dung môi không phân cực (LN), chiết xuất thân sử dụng dung môi phân cực (SP) và chiết xuất thân sử dụng dung môi không phân cực (SN) với 4 dung môi khác nhau đều ức chế LPS gây ra sự sản xuất NO theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Trong đó chiết xuất lá sử dụng dung môi phân cực (LP) là mạnh nhất (IC_{50} NO = 18,9 $\pm$ 3,6 μ g/mL). So với kết quả nghiên cứu này, cho thấy khả năng ức chế sự sản xuất NO do LPS gây ra trong nghiên cứu chúng tôi tốt hơn với giá trị IC_{50} thấp hơn.

Dòng tế bào RAW 264.7 đóng vai trò là mô hình *in vitro* do tính ổn định về chức năng và khả năng thuộc tính cả thực bào và ẩm bào, nên tế bào RAW 264.7 rất cần thiết cho việc nghiên cứu sự tương tác giữa vật chủ và mầm bệnh trong nghiên cứu miễn dịch học (Taciak et al., 2018). Như vậy, kết quả trên đã bước đầu đánh giá tổng quan khả năng kháng viêm của cao chiết *C. nutans* thông qua sự ức chế trực tiếp NO sản sinh trong quá trình viêm. NO có thể phá vỡ trạng thái cân bằng oxy hóa khử, do đó dẫn đến tổn thương protein, DNA và màng, thúc đẩy quá trình chết tế bào. Kết quả nghiên cứu này cho thấy cao chiết *C. nutans* có khả năng kháng viêm tốt so với kết quả nghiên cứu của Mai và đồng tác giả (2016) khi đối chiếu các giá trị IC_{50} : 12,85 $\pm$ 3,41 μ g/mL.

Với kết quả thu được cho thấy tác dụng điều hòa miễn dịch và kích thích miễn dịch của cao chiết *C. nutans* và các hợp chất chính của nó đối với chức năng miễn dịch lên tế bào RAW 264.7. Có thể kết luận các hợp chất của cao chiết *C. nutans* thu mẫu tại Quảng Ngãi ở nồng độ từ 50 đến 100 μ g/mL có khả năng chống oxy hóa tốt và

tham gia vào quá trình ức chế sản xuất NO thông qua enzyme tổng hợp oxit nitric cảm ứng trong tế bào RAW 264.7. Tuy nhiên nồng độ lớn hơn 500 µg/mL cao chiết *C. nutans* cho thấy khả năng gây ra độc tính lên tế bào RAW 264.7. Kết quả nghiên cứu chứng minh cao chiết *C. nutans* có khả năng điều hòa miễn dịch và gây độc tế bào tùy thuộc vào nồng độ sử dụng

KẾT LUẬN

Cao chiết *C. nutans* tại Quảng Ngãi có khả năng thu dọn gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} là $40,02 \pm 1,13$ µg/mL. Khả năng thu dọn gốc ABTS là $39,58 \pm 1,03$ µg/mL. Ở nồng độ 100 µg/mL, khả năng thu dọn gốc DPPH và ABTS của mẫu nghiên cứu có hiệu quả trên 80%. Cao chiết *C. nutans* thể hiện hoạt tính kim hãm mạnh nhất đối với chủng *S. aureus* có đường kính vòng kháng khuẩn (15,55-19,09 mm) và yếu nhất đối với chủng *S. typhi* (8,93-12,77 mm). Cao chiết *C. nutans* ở nồng độ từ 50 đến 100 µg/mL có khả năng chống oxy hóa cao với giá trị IC_{50} thấp so với đối chứng dương. Ở nồng độ 500-1000 µg/mL cao chiết *C. nutans* làm giảm khả năng sống sót của tế bào RAW264.7 *in vitro*. Cao chiết *C. nutans* có khả năng kháng viêm đối với dòng tế bào RAW 264.7 với giá trị IC_{50} : $12,85 \pm 3,41$. Ở nồng độ 500 µg/mL cao chiết *C. nutans* gây độc tính lên tế bào RAW 264.7.

Lời cảm ơn: Công trình được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2022.ThS.100 và mã số VINIF.2023.ThS.150

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J Pharm Pharm Sci*. 16(5): 821-847. doi: 10.18433/j3vw2f.
- Currie J, Lin W, Zhang W (2011). Patient knowledge and antibiotic abuse: Evidence from an audit study in China. *J Health Econ*. 30(5): 933-949. doi: 10.1016/j.jhealeco.2011.05.009.
- Khooh LW, Mediani A, Zolkeflee NKZ, Leong SW, Ismail IS, Khatib A, Shaari K, Abas F (2015). Phytochemical diversity of *Clinacanthus nutans* extracts and their bioactivity correlations elucidated by NMR based metabolomics. *Phytochem Lett*, 14: 123-133.
- Yang HS, Peng TW, Madhavan P, Shukkoor MSA, Akowuah GA (2013) Phytochemical analysis and antibacterial activity of methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaf. *Int J Drug Dev Res*, 5(3): 349-355.
- Pham Nguyen Minh Dan (2014). *Evaluation of biological activities of clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau. 2014. PhD Thesis. International University, Vietnam.
- TCVN 11939:2017. Xác định hoạt độ chống oxy hóa bằng phản ứng với 2,2-Diphenyl- 1-Picrylhydrazyl (DPPH). Bộ Khoa học và Công nghệ.
- Re, Roberta, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 1999, 26.9-10: 1231-1237.
- Celikel, Nazan, and Gökhan Kavas. "Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms." *Czech journal of food sciences* 26.3 (2008): 174.
- Đặng Văn Giáp (2000). Phân tích dữ liệu khoa học bằng Microsoft Excel. Nxb Giáo dục Hà Nội.
- Tran Dinh Dieu Tinh (2014). *Biological activities of clinacanthus nutans* (Burm. F) Lindau extracts. PhD Thesis. International University HCMC, Vietnam.
- Pannangpetch P, Laupattarakasem P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U, Kongyingyoes B, Aromdee C (2007). Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm. F) Lindau. *Songklanakarin J Sci Technol*. 29: 1-9.
- Sekar M, Nurashikin AR (2016). Formulation, evaluation and antibacterial properties of herbal ointment containing methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaves. *Int J Pharma Clin Res* 8(8): 1170-1174.
- Mai CW, Yap KS, Kho MT, Ismail NH, Yusoff K, Shaari K, Chin SY, Lim ES (2016) Mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of *Clinacanthus nutans* Lindau extracts: inhibition of cytokine production and toll-like receptor-4 activation. *Front Pharmacol* 7: 7.
- Ruhee RT, Ma S, Suzuki K (2019). Sulforaphane protects cells against lipopolysaccharide-stimulated inflammation in murine macrophages. *Antioxidants* 8(12): 577.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15: 252-259.
- Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, Rygiel T, Król M (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages." *PLoS one* 13(6): e0198943.
- Esmaili K, Shafaei A, Aisha AF, Al-Suede FS, Majid AM, Ismail Z (2019). Evaluation of *in vitro* cytotoxicity effect of *Clinacanthus nutans* (Brum. f.) Lindau standardized leaf extracts. *Trop J Pharma Res* 18: 2341-2348.
- Esmaili K, Alsuede F, Abdalrahim A, Shafaei A, Ismail Z (2013). Preliminary phytochemical analysis and cytotoxicity studies of *Clinacanthus nutans* (Sabah snake grass). *Open Conf Proc J* 4(1): 187.

ANTIOXIDANT, ANTIBACTERIAL, ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF *Clinacanthus nutans* EXTRACT

Huynh Nhu Y¹, Do Thi Thao³, Nguyen Trong Nghia¹, Phạm Thị Ngọc Phương², Phan Hoàng Duy², Che Thi Cam Ha^{1*}

¹University of Science, Hue University

²Hue Central Hospital

³Institute of Technology DNA GENLAB Hanoi

SUMMARY

This study regarding the antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of *C. nutans* extract in Quang Ngai province. We discovered that *C. nutans* extracts (stigmasterol, lupeol, vitexin, isovitexin, orientin, schaftoside) have the phytochemicals that exhibit anti-inflammatory and immunoregulatory activities. The extract has the ability to inhibiting bacterial growth *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), antioxidant against DPPH value $IC_{50} 40,02 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$, the ABTS Radical Scavenging Assay value $39,58 \pm 1,03 \mu\text{g/mL}$. Cell line RAW264.7 were chosen to investigate the immunotoxicity of *Clinacanthus nutans* extract. The results showed that, with an increase in *Clinacanthus nutans* extract concentration, the proliferation viability of RAW264.7 cells presented a trend of decreasing with increasing concentration from $100\mu\text{g/mL}$ - $1000\mu\text{g/mL}$. *C. nutans* extract, effectively inhibited NO, with the most effective being $100\mu\text{g/mL}$ concentration, with an IC_{50} value $12.85 \pm 3.41 \mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Clinacanthus nutans* (Burm. f.), RAW264.7 cells, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory.

* Author for correspondence: Tel: 0362596712; Email: chethicamha@husc.edu.vn

NGHIÊN CỨU TÍNH CHẤT QUANG CỦA VẬT LIỆU TỔNG HỢP TỪ VỎ BƯỞI ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG Y SINH HỌC

Vũ Thị Huyền*, Phạm Thu Thủy

Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Vật liệu phát huỳnh quang được sử dụng rộng rãi trong y sinh học, và cũng không ít chất nhuộm huỳnh quang được sử dụng là những chất hóa học độc hại hoặc đắt tiền. Bên cạnh đó, việc chế biến sâu để tăng giá trị nông sản sau thu hoạch đang ngày càng được quan tâm. Trong công trình này, vỏ bưởi-một loại phế phụ phẩm trong nông nghiệp được sử dụng như một nguồn nguyên liệu hữu cơ ban đầu để tổng hợp ra chất có khả năng phát huỳnh quang hữu cơ và thân thiện với môi trường. Vỏ bưởi được xử lý ở nhiệt độ cao để thực hiện phản ứng carbon hóa tiền chất ban đầu. Vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi (VB) thu được được khảo sát tính chất quang và độ bền quang học theo thời gian. Kết quả thu được cho thấy, vật liệu thu được phát ra huỳnh quang màu xanh với bước sóng phát quang là 439 nm và có độ bền quang tối thiểu là 100 phút dưới tác động trực tiếp của ánh sáng trắng. Tiếp đó, vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi được thử nghiệm bước đầu với khả năng nhuộm tế bào vi khuẩn. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi soi trên bàn soi tử ngoại UV, mẫu vi khuẩn có ủ với vật liệu phát huỳnh quang phát ra ánh sáng màu xanh, trong khi mẫu vi khuẩn không ủ với vật liệu phát huỳnh quang thì không hiển thị màu. Điều này cho thấy rằng, có thể sử dụng vật liệu phát huỳnh quang được tổng hợp từ vỏ bưởi để nhuộm tế bào vi khuẩn và quan sát trên bàn soi UV. Các kết quả này mở ra các nghiên cứu ứng dụng tiềm năng khác của vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi trong lĩnh vực y sinh học.

Từ khóa: Vỏ bưởi, vật liệu phát huỳnh quang, nhuộm tế bào, vi khuẩn, tính chất quang, hình ảnh.

MỞ ĐẦU

Chất phát huỳnh quang là chất có khả năng phát ra ánh sáng ở bước sóng nào đó khi bị kích thích bởi một ánh sáng với bước sóng xác định. Chất phát huỳnh quang thường được sử dụng trong y sinh học như nhuộm tế bào, nhuộm DNA, đánh dấu các phân tử sinh học... Một số chất phát huỳnh quang phổ biến như ethidium bromide thường được sử dụng để nhuộm DNA, tuy nhiên đây là một chất độc, có thể gây ung thư cho người và động vật; hay Hoechst – một chất phát huỳnh quang được biết đến là ít độc tố với tế bào, nhưng lại tương đối đắt tiền. Ngoài thuốc nhuộm tổng hợp, còn có một số thuốc nhuộm có nguồn gốc tự nhiên như haematoxylin và carmine. Tuy nhiên các thuốc nhuộm có nguồn gốc tự nhiên này cho mức độ hiển thị màu yếu và cần có chất tăng cường màu sử dụng kèm.

Thời gian gần đây một số chất phát quang từ thực vật đã được nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực y sinh học như cảm biến/hình ảnh, quang điện tử, quang xúc tác, phân phối thuốc/gene, kỹ thuật mô, y học tái tạo, trị liệu ung thư... (Rabiee *et al.*, 2022). Trong nghiên cứu này, chúng tôi quan tâm đến ứng dụng trong hình ảnh sinh học của vật liệu phát quang. Gần đây, nhóm tác giả Atchudan và cộng sự đã nghiên cứu chế tạo chất phát quang từ vỏ quả kiwi nhằm sử dụng để quan sát tế bào người bình thường và tế bào ung thư trên kính hiển vi cho hình ảnh quan sát rõ nét, thể hiện sự tương thích sinh học và độc tính tế bào thấp (Atchudan *et al.*, 2022). Trước đó, năm 2017, nhóm tác giả Manaf và cộng sự cũng đã chế tạo chất phát quang từ vỏ cây cao lương để nhuộm tế bào N2a và tế bào A-375 (Manaf *et al.*, 2017).

Bên cạnh đó, bưởi là một loại thực phẩm bổ dưỡng và đem lại hiệu quả kinh tế cao với một số sản phẩm chế biến như nước ép bưởi, tinh dầu bưởi, rượu bưởi,... (Chavan *et al.*, 2018). Gần đây, việc đầu tư chế biến sâu để tăng giá trị nông sản đang ngày càng được chú trọng. Việc chế biến các sản phẩm từ vỏ bưởi - một loại phế phụ phẩm trong nông nghiệp chứa các phần chính như pectin, cellulose, tinh dầu, polyphenol, flavonoid... sẽ góp phần nâng cao giá trị kinh tế của quả bưởi và giảm nguồn gây ra ô nhiễm môi trường. Gần đây, đã có một số nghiên cứu ứng dụng từ vỏ bưởi như trà túi lọc (Trần Thanh Trúc *et al.*, 2021), thành phần của dầu gội đầu (Nguyễn Thị Linh Tuyền *et al.*, 2023)... Vỏ bưởi cũng đã được sử dụng làm nguyên liệu để tổng hợp thành các chất phát huỳnh quang với khả năng phát quang mạnh, độ bền màu cao để phát hiện kháng sinh (Qí *et al.*, 2022), hay ion Fe^{3+} và L-Cysteine (Zhang *et al.*, 2022). Với khả năng phát huỳnh quang này kèm thêm độc tính thấp, thân thiện với môi trường và rẻ tiền, nó cũng có thể sử dụng thử nghiệm trong việc đánh dấu/ nhuộm các phân tử sinh học.

Do vậy, công trình này tập trung nghiên cứu tính chất quang của vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi và bước đầu thử nghiệm sử dụng nó để nhuộm các tế bào vi khuẩn.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Nguyên liệu chính sử dụng trong công trình này là vỏ bưởi Diễn và vi khuẩn *Salmonella enterica* VTCC 12277.

Tổng hợp vật liệu phát quang từ vỏ bưởi

Vỏ bưởi thu về được rửa sạch bằng nước vòi. Sau đó, cắt nhỏ thành từng miếng nhỏ có kích thước khoảng 1 cm x 5 cm. Sấy vỏ bưởi đã cắt nhỏ ở 80°C trong 20 giờ bằng tủ sấy SH-DO-250FG (Hàn Quốc). Tiếp theo, sử dụng chày và cối sứ nghiền nhỏ vỏ bưởi thành dạng bột/hạt nhỏ. Cân 5 gram vỏ bưởi và lấy 50 mL nước deion vào bình Teflon. Hỗn hợp này được ủ ở 200°C trong 2 giờ và sau đó, để nguội đến nhiệt độ phòng. Lọc bỏ cặn bằng giấy lọc và ly tâm ở 5000 rpm trong 30 phút. Dung dịch bên trên thu được là sản phẩm tạo thành – vật liệu phát huỳnh quang VB.

Khảo sát tính chất quang

Vật liệu tạo thành từ vỏ bưởi được khảo sát quang phổ hấp thụ bằng thiết bị quang phổ nhỏ giọt Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Mỹ) và quang phổ huỳnh quang bằng thiết bị quang phổ huỳnh quang nhỏ giọt Nanodrop 3300 (Thermo Scientific, Mỹ). Độ bền quang của vật liệu được khảo sát bằng để mẫu vật liệu dưới ánh sáng trắng trực tiếp, đo cường độ huỳnh quang sau mỗi 10 phút trong 100 phút.

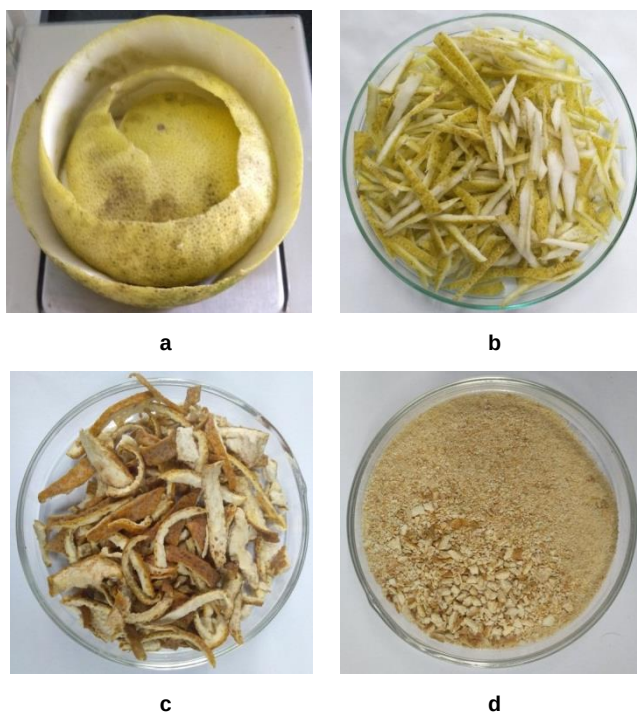
Thử nghiệm nhuộm tế bào vi khuẩn

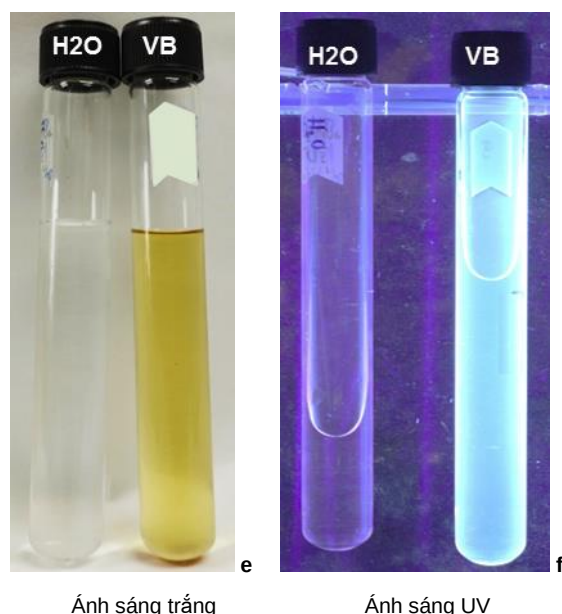
Vi khuẩn trữ đông được hoạt hóa và nuôi lỏng trên môi trường LB ở 37°C trong 16 giờ. Ủ vi khuẩn ở 95°C trong 10 phút để diệt chết hết vi khuẩn. Sau đó, ly tâm ở 5000 rpm trong 3 phút để loại bỏ dịch nuôi vi khuẩn, rửa lại 2 lần bằng đệm PBS (Phosphate Buffered Saline). Ủ vi khuẩn với vật liệu phát huỳnh quang VB trong đệm PBS trong 30 phút. Ly tâm loại bỏ dịch tan, rửa lại 3 lần bằng đệm PBS. Phân tán cặn thu được trong 50 µL PBS và quan sát hình ảnh trên bàn soi UV. Mẫu đối chứng là mẫu vi khuẩn không được ủ với vật liệu phát huỳnh quang VB.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chất phát huỳnh quang từ vỏ bưởi

Vỏ bưởi tươi ban đầu được cắt nhỏ, sấy khô và nghiền nhỏ (Hình 1a-d). Vỏ bưởi sau khi được thực hiện phản ứng carbon hóa ở nhiệt độ cao thì thu được dung dịch màu vàng (Hình 1e). Khi bị kích thích bởi ánh sáng UV thì chất tạo thành có khả năng phát ra huỳnh quang màu xanh (blue) (Hình 1f) như một số công trình đã công bố gần đây (Qì *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). Hiện tượng này cho thấy rằng một số chất trong vỏ bưởi đã được carbon hóa tạo thành các chất có cấu trúc và bề mặt mới.

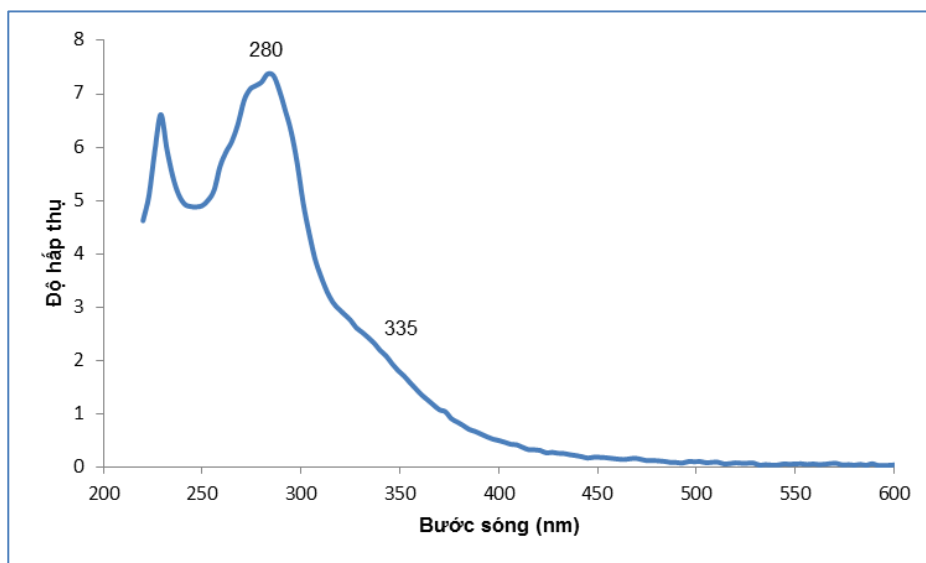




Hình 1. Vở bướm (a-d) và vật liệu phát huỳnh quang tạo thành dưới ánh sáng trắng (e) và ánh sáng UV (f)

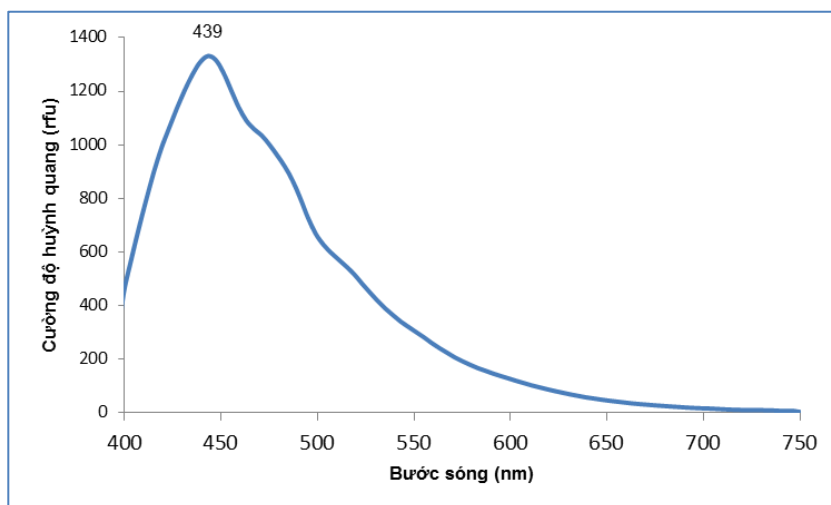
Tính chất quang của vật liệu tạo thành

Tính chất quang của vật liệu tạo thành được thể hiện qua phổ hấp thụ và phổ huỳnh quang của nó. Phổ hấp thụ của vật liệu phát huỳnh quang tạo thành được khảo sát trong dải bước sóng từ 200 nm đến 750 nm trên thiết bị đo quang phổ hấp thụ nhỏ giọt (NanoDrop 8000). Kết quả thu được cho thấy, phổ hấp thụ của vật liệu phát huỳnh quang VB xuất hiện các đỉnh hấp thụ cực đại tại bước sóng 280 nm và 335 nm (Hình 2). Trong đó, đỉnh hấp thụ tại bước sóng 280 nm xuất hiện được cho là do có sự dịch chuyển điện tử $n-\pi^*$ của liên kết $C=O$ trong nhóm carboxyl của vật liệu phát huỳnh quang VB, trong khi đó, đỉnh hấp thụ tại bước sóng 335 nm được cho là do có sự sửa đổi các thành phần khác nhau trên bề mặt vật liệu. Điều này chỉ ra rằng cấu trúc của vật liệu phát huỳnh quang VB tạo thành có chứa nhóm mang màu $n-\pi$ điện tử (cụ thể là nhóm carboxyl) và có cấu trúc liên hợp (Qì *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).



Hình 2. Phổ hấp thụ của vật liệu phát huỳnh quang VB

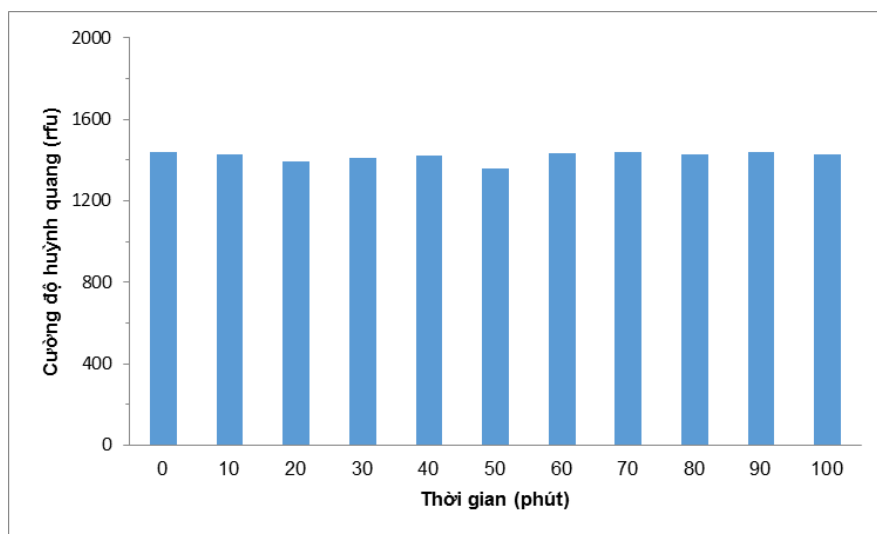
Quang phổ huỳnh quang của vật liệu tạo thành được ghi nhận bằng phương pháp đo quang phổ huỳnh quang nhỏ giọt (NanoDrop 3300). Phổ huỳnh quang cho thấy vật liệu phát quang VB phát ra ánh sáng màu xanh với đỉnh phát quang tại bước sóng là 439 nm khi bị kích thích bởi ánh sáng UV 312 nm (Hình 3).



Hình 3. Phổ huỳnh quang của vật liệu phát huỳnh quang VB

Bên cạnh đó, tính ổn định của huỳnh quang của vật liệu phát huỳnh quang VB dưới ánh sáng trắng theo thời gian. Mẫu được để dưới ánh sáng trắng, sau đó ghi nhận cường độ huỳnh quang khi bị kích thích bởi ánh sáng UV sau mỗi 10 phút trong khoảng 100 phút. Kết quả phân tích cho thấy không có sự thay đổi đáng kể về cường độ huỳnh quang của vật liệu phát quang VB theo thời gian (Hình 4). Kết quả này thể hiện vật liệu phát huỳnh quang VB tạo thành khá ổn định, không bị tác động nhiều bởi ánh sáng trắng. Tính chất này giúp vật liệu phát huỳnh quang VB có thể thuận lợi thực hiện một số ứng dụng mà không cần phải bao bọc, bảo vệ khỏi ánh sáng trắng chiếu vào khi tiến hành thực nghiệm trong khoảng 100 phút.

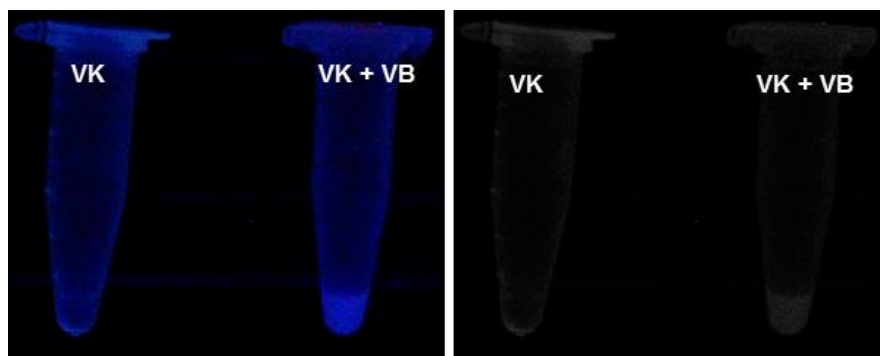
Như vậy, từ các kết quả phân tích trên có thể khẳng định rằng, từ vỏ bưởi (vật chất không phát huỳnh quang) có thể tạo thành vật liệu phát huỳnh quang màu xanh bền theo thời gian. Với tính chất huỳnh quang này, chất phát huỳnh quang từ vỏ bưởi có thể có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh học.



Hình 4. Cường độ huỳnh quang của vật liệu phát huỳnh quang VB theo thời gian

Định hướng ứng dụng trong y sinh học

Với tính chất huỳnh quang, vật liệu phát quang VB có thể thử nghiệm sử dụng với định hướng ứng dụng trong y sinh như phát hiện kim loại, kháng sinh, các tế bào... Trong báo cáo này, chúng tôi đã sử dụng nó để nhuộm tế bào vi khuẩn đã chết. Vi khuẩn sau khi diệt bằng nhiệt độ cao, ủ với vật liệu phát huỳnh quang VB, loại bỏ dịch tan và rửa trôi vật liệu huỳnh quang bám dính được phân tán vào trong PBS và soi dưới ánh sáng UV. Hình ảnh ghi nhận được cho thấy, mẫu vi khuẩn có ủ với vật liệu phát huỳnh quang VB phát ra ánh sáng màu xanh, trong khi mẫu vi khuẩn không ủ với vật liệu phát huỳnh quang VB thì không có màu (Hình 5). Điều này cho thấy rằng vật liệu phát huỳnh quang VB có thể đã kết hợp với vi khuẩn bằng một cách thức nào đó, có thể là chúng đã xâm nhập vào trong tế bào vi khuẩn. Như vậy, sử dụng vật liệu phát huỳnh quang VB có thể nhuộm được tế bào vi khuẩn.



Hình 5. Ảnh màu (trái) và ảnh đen trắng (phải) của dung dịch vi khuẩn đã nhuộm bằng chất phát quang VB dưới ánh sáng UV

KẾT LUẬN

Công trình này đã nghiên cứu tổng hợp được vật liệu có khả năng phát huỳnh quang từ vỏ bưởi bằng cách carbon hóa tiền chất ban đầu ở nhiệt độ cao. Vật liệu thu được phát ra huỳnh quang màu xanh với bước sóng phát quang là 439 nm và có độ bền quang tối thiểu là 100 phút dưới tác động trực tiếp của ánh sáng trắng. Vật liệu phát huỳnh quang này được thử nghiệm bước đầu với khả năng nhuộm tế bào vi khuẩn đã chết. Hình ảnh soi trên bàn soi tử ngoại UV cho thấy mẫu vi khuẩn có ủ với vật liệu phát huỳnh quang phát ra ánh sáng màu xanh, phân biệt khá rõ rệt với mẫu đối chứng. Kết quả này mở ra các ứng dụng tiềm năng khác của vật liệu phát huỳnh quang từ vỏ bưởi với việc sử dụng tính chất quang trong lĩnh vực y sinh học.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Hà Nội trong đề tài mã số QG.24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdul Manaf SA, Hegde G, Mandal UK, Wui T, Roy PJCdd (2017). Functionalized Carbon Nano-scale Drug Delivery Systems From Biowaste Sago Bark For Cancer Cell Imaging. *Curr Drug Deliv*, 14(8): 1071-1077.
- Atchudan R, Chandra Kishore S, Gangadaran P, Jebakumar Immanuel Edison TN, Perumal S, Rajendran RL, Alagan M, Al-Rashed S, Ahn BC, Lee YR (2022). Tunable fluorescent carbon dots from biowaste as fluorescence ink and imaging human normal and cancer cells. *Environ Res*, 204(Pt D): 112365.
- Chavan P, Singh AK, Kaur G (2018). Recent progress in the utilization of industrial waste and by products of citrus fruits: A review. *J FoodProcess Eng*, 41(8), 12895.
- Nguyễn Thị Linh Tuyền, Lê Cường Nam, Nguyễn Trần Văn Anh, Hoàng Thị Thuỳ Dung, Nguyễn Minh Thông (2023). Bào chế dầu gội chứa vỏ bưởi, dầu kết, hương nhu. *Tạp chí Y Dược học Cần Thơ*, 56: 16-22.
- Qì H, Huang D, Jing J, Ran M, Jing T, Zhao M, Zhang C, Sun X, Sami R, Benajiba N (2022). Transforming waste into value: pomelo-peel-based nitrogen-doped carbon dots for the highly selective detection of tetracycline. *RSC Adv*, 12(12): 7574-7583.
- Rabiee N, Iravani S, Varma RS (2022). Biowaste-Derived Carbon Dots: A Perspective on Biomedical Potentials. *Molecules*, 27(19): 6168.
- Trần Thanh Trúc, Mai Thành Thái, Mai Diễm Trinh, Nguyễn Trọng Tuân (2021). Nghiên cứu công nghệ chế biến trà túi lọc từ vỏ bưởi Năm Roi (*Citrus grandis* (L.) OSBECK). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57: 10-20.
- Zhang D, Zhang F, Liao Y, Wang F, Liu H (2022). Carbon Quantum Dots from Pomelo Peel as Fluorescence Probes for "Turn-Off-On" High-Sensitivity Detection of Fe³⁺ and L-Cysteine. *Molecules*. 27(13): 4099.

STUDY ON OPTICAL PROPERTIES OF POMELO PEEL - DIRIVED MATERIALS FOR APPLICATING IN BIOMEDICINE

Vu Thi Huyen*, Pham Thu Thuy

Faculty of Agriculture Technology, University of Engineering and Technology, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

Fluorescent dyes are widely used in biomedicine, but most of them are either toxic or costly chemicals. In addition, deep processing of post-harvest agricultural products to enhance their value is receiving more attention. In this work, pomelo peel, an agricultural waste product, was used as a carbon source to synthesize an environmentally friendly and organic fluorescent substance. To perform the carbonization reaction, the pomelo peel was treated with high temperatures. The optical properties and fluorescent stability over time of the obtained product were investigated. The results showed that the emission wavelength of fluorescent material was 439 nm and it has fluorescent stability when exposed to long-term light (at least 100 minutes). Additionally, this fluorescent material was initially tested for its ability to stain bacterial cells. The results show that when ultraviolet light is irradiated, bacterial samples incubated with fluorescent materials have a blue color, while the control sample does not have any color. This means that fluorescent material from pomelo peel can be used to stain bacterial cells. These results demonstrated the huge potential of its to application in the biomedical field.

Keywords: Pomelo peel, fluorescent material, cell staining, bacteria, optical properties, imaging.

* Author for correspondence: Tel: 0399092919; Email: huyenvu@vnu.edu.vn