

P-ISSN 1859-4794 * E-ISSN 2615-9929

TẬP 65, SỐ 12, THÁNG 12 NĂM 2023
VOLUME 65, NUMBER 12, DECEMBER 2023

TẠP CHÍ & KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST VIỆT NAM



HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Chủ tịch

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Thành viên

Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng, Việt Nam

Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Việt Nam

Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam, Việt Nam

Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân, Việt Nam

Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trương Nam Hải - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mở - Địa chất, Việt Nam

Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải, Việt Nam

Phạm Gia Khánh - Hội Ghép tạng Việt Nam, Việt Nam

Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Bành Tiến Long - Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam

Lê Quan Nghiệm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trần Hữu Phúc - Hội đồng Giáo sư Nhà nước, Việt Nam

Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Tổng biên tập

Nguyễn Thị Hương Giang - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ban biên tập

Phạm Thị Minh Nguyệt - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Phí Công Thường - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Vũ Văn Hưng - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ninh Văn Diện - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Bắc - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Tăng Xuân Bình - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Đoàn Đức Khải - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Trương Thị Thảo Dương - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

EDITORIAL BOARD

Chairman

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Members

Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering, Vietnam

Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam

Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology, Vietnam

Tran Tho Dat - National Economics University, Vietnam

Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Vu Minh Giang - VNU, Hanoi, Vietnam

Truong Nam Hai - Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology, Vietnam

Pham Huy Khang - University of Transport and Communications, Vietnam

Pham Gia Khanh - Vietnam Society of Organ Transplantation, Vietnam

Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi, Vietnam

Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology, Vietnam

Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Mai Trong Nham - VNU, Hanoi, Vietnam

Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship, Vietnam

Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University, Vietnam

Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

Editor-in-Chief

Nguyen Thi Huong Giang - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Managing Editors

Pham Thi Minh Nguyet - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Phi Cong Thuong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Vu Van Hung - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Ninh Van Dien - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Bac - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Tang Xuan Binh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Doan Duc Khai - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Truong Thi Thao Duong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội - Việt Nam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Số 50/GP-BTTTT ngày 01/02/2023

Giá: 18000^d

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi - Vietnam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

E-journal: b.vjst.vn

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

No. 50/GP-BTTTT 1st February 2023

Xác định đột biến gen α -thalassemia bằng kỹ thuật Multiplex ligation-dependent probe amplification

Lê Thị Phương, Vương Vũ Việt Hà, Trần Văn Khánh*

Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/10/2022; ngày chuyển phản biện 15/10/2022; ngày nhận phản biện 3/11/2022; ngày chấp nhận đăng 8/11/2022

Tóm tắt:

Việt Nam là nước có tỷ lệ người mang đột biến gen bệnh α -thalassemia cao, vì vậy việc sàng lọc người lành mang gen này của những cặp vợ chồng đã có một người mang đột biến gen gây bệnh là rất quan trọng để phòng tránh sinh con bị bệnh. Bệnh α -thalassemia di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, tùy theo số lượng chuỗi α bị thiếu hụt mà mức độ biểu hiện lâm sàng của bệnh ở các cấp độ khác nhau. Mẫu nghiên cứu được thu thập và thực hiện phân tích đột biến gen tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội. Với mục tiêu sàng lọc các đột biến xóa đoạn và không xóa đoạn bằng kỹ thuật Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) của 85 người đã có vợ hoặc chồng là người lành mang gen bệnh, nghiên cứu đã xác định được 38/85 người mang đột biến, bao gồm: 35 trường hợp đột biến xóa đoạn (26 --^{SEA}, 5 -- $\alpha^{3.7}$, 1 -- $\alpha^{4.2}$, 1 --^{THAI}, 1 xóa toàn bộ gen và 1 xóa *POLR3K-ITFG3*) và 3 trường hợp đột biến không xóa đoạn (2 -- α^{HbCs} , 1 anti^{3.7}). Đột biến xóa đoạn chiếm tỷ lệ 92,1%, còn đột biến không xóa đoạn là 7,9%.

Từ khóa: đột biến không xóa đoạn, đột biến xóa đoạn, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), người mang gen α -thalassemia.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

α -thalassemia là bệnh rối loạn huyết sắc tố di truyền phổ biến nhất trên thế giới, đặc trưng bởi sự suy giảm sản xuất chuỗi α -globin trong phân tử hemoglobin. Bệnh phân bố rộng rãi ở các vùng và quốc gia khác nhau, đặc biệt là các nước Đông Nam Á. Việt Nam là nước có tỷ lệ người mang đột biến gen bệnh được phát hiện với tần số cao nhất trong khu vực [1].

Ở người trưởng thành bình thường, 97% tổng lượng huyết sắc tố là hemoglobin A1 (HbA1), 3% còn lại bao gồm hemoglobin A2 (HbA2) và hemoglobin bào thai (HbF - foetal hemoglobin). Chuỗi α -globin được mã hóa bởi 2 gen hemoglobin alpha 1 (*HBA1*) và alpha 2 (*HBA2*) nằm ở cụm gen α -globin trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể số 16 (16p13.3). Mỗi gen gồm 2 alen quy định tổng hợp chuỗi α -globin, tùy thuộc vào số lượng alen bị xóa đoạn hoặc giảm chức năng mà các biểu hiện lâm sàng của bệnh α -thalassemia xảy ra ở các mức độ khác nhau. Ở những cặp vợ chồng đã có một người mang đột biến gen gây bệnh thì việc sàng lọc đột biến ở người còn lại là rất quan trọng, để tránh sinh con bị bệnh. Dạng bệnh α -thalassemia nặng nhất là hội chứng hemoglobin Bart (Hb Bart), gây ra bởi sự mất hoặc bất hoạt của cả 4 gen α -globin (---) dẫn đến thiếu Hb vận chuyển oxy gây phù thai, đứa trẻ có thể tử vong ngay trong giai đoạn bào thai (23-38 tuần) hoặc ngay sau khi sinh. Dạng

thường gặp nhất là bệnh hemoglobin H (HbH), do mất hoặc bất hoạt 3 gen α -globin (---/ α), trẻ bị bệnh do thiếu máu, tan máu và có thể phải phụ thuộc truyền máu cả đời. Những người chỉ mất hoặc bất hoạt 1 đến 2 gen α -globin là những người lành mang gen bệnh, họ chỉ biểu hiện thiếu máu nhẹ hoặc không có bất kỳ triệu chứng nào [2].

Trên 90% các trường hợp là do đột biến xóa đoạn gen, có thể xảy ra trên một hoặc cả 2 gen *HBA1* và *HBA2*, hoặc toàn bộ cụm gen α -globin, bao gồm cả gen ζ -globin; 10% còn lại là các đột biến không xóa đoạn, bao gồm các đột biến điểm, đột biến lặp đoạn. Dạng đột biến điểm hay gặp nhất ở Đông Nam Á là Hb Constant Spring (HbCs), sự thay thế T bằng C ở bộ 3 kết thúc của gen *HBA2* làm kéo dài chuỗi α -globin [3, 4]. Dạng đột biến không xóa đoạn hay gặp thứ hai là đột biến lặp đoạn, có thể chỉ lặp một gen *HBA* đơn lẻ nhưng cũng có thể lặp toàn bộ cụm gen α -globin, bao gồm cả các yếu tố điều hòa. Đột biến lặp đoạn có thể không ảnh hưởng đến việc sản xuất các chuỗi α -globin ở người bình thường, tuy nhiên nó sẽ làm nghiêm trọng hơn kiểu hình ở bệnh nhân beta-thalassemia do sự mất cân bằng giữa α -globin và beta-globin.

Các đột biến xóa đoạn gen *HBA* thông thường được xác định bằng kỹ thuật Gap-PCR (Gap-polymerase chain reaction), ARMS-PCR (Single-tube multiplex amplification refractory mutation system PCR) do chi phí thấp và thiết bị

*Tác giả liên hệ: Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Detection of α -thalassemia mutations by Multiplex ligation-dependent probe amplification

Thi Phuong Le, Vu Viet Ha Vuong, Van Khanh Tran*

Hanoi Medical University,

1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 12 October 2022; revised 3 November 2022; accepted 8 November 2022

Abstract:

Vietnam is a country with a high rate of people carrying α -globin gene mutations, therefore, it is highly important to screen for α -thalassemia carriers, especially in couples with one diagnosed α -carrier, in order to prevent and avoid having α -thalassemia major offspring. α -thalassemia is an inherited autosomal recessive disease, of which the phenotype depends on the degree of α -globin chain deficiency. Research samples were collected and analysed gene mutations at the Gene - Protein Research Center, Hanoi Medical University. With the objective of screening for deletional and nondeletional α -globin gene by using Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method on eighty-five people, whose spouses were α -thalassemia carriers, the results of this study have successfully identified 38/85 carriers including thirty-five deletional carriers (26 --SEA, 5 -- $\alpha^{3,7}$, 1 -- $\alpha^{4,2}$, 1 --THAI, 1 whole α -globin deletion, and 1 *POLR3K-ITFG3* gene deletion) and 3 cases of non-deletional mutation (2 -- α^{HbCs} , 1 anti^{3,7}). Deletional mutations account for 92.1% while non-deletional mutations account for only 7.9%.

Keywords: α -thalassemia carrier, deletional mutation, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), nondeletional mutation.

Classification number: 3.1

đơn giản. Các đột biến điểm đã biết có thể được xác định bằng kỹ thuật ARMS-PCR hay phản ứng lai ngược RDB (Reverse dot blot). Sự ra đời của kỹ thuật MLPA với độ chính xác cao và kết quả nhanh chóng cho phép xác định toàn bộ đột biến xóa đoạn đã biết cũng như các đột biến xóa đoạn mới, đồng thời còn xác định các đột biến lặp đoạn và đột biến điểm HbCs - dạng đột biến thường gặp trong cụm gen α -globin. Xuất phát từ thực tiễn nêu trên, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu phát hiện toàn bộ các đột biến xóa đoạn và một số đột biến không xóa đoạn trên cụm gen α -thalassemia bằng kỹ thuật MLPA.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nhóm nghiên cứu gồm 85 người có vợ hoặc chồng được xác định là người lành mang đột biến gen α -globin có nhu cầu sàng lọc đột biến để tư vấn di truyền.

Mẫu đối chứng: 5 mẫu DNA của người trưởng thành khỏe mạnh, có công thức máu ngoại vi bình thường và được xác định không mang đột biến gen α -globin bằng phương pháp MLPA, Gap-PCR và giải trình tự gen.

Mẫu nghiên cứu được thu thập và thực hiện kỹ thuật MLPA phân tích đột biến gen tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Kỹ thuật tách chiết DNA: DNA được tách từ mẫu máu toàn phần bằng bộ kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit của Hãng Promega (Mỹ). Quy trình tách chiết tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA sau tách chiết bằng phương pháp đo quang phổ trên máy NanoDrop: nồng độ DNA 80-200 ng/ μ l, đánh giá độ tinh sạch bằng tỷ lệ A260/A280 là 1,8-2,0.

Kỹ thuật MLPA: Nghiên cứu sử dụng bộ kit SALSA MLPA Probemix P140 HBA của Hãng MRC Holland (Hà Lan) dành cho chẩn đoán α -thalassemia. Thí nghiệm được thực hiện tuân theo quy trình chung của nhà sản xuất. Gồm các bước cơ bản như sau: khử RNA, gắn probe, nối các đoạn probe bằng enzyme ligase, khuếch đại các probe bằng phản ứng PCR, điện di sản phẩm trên hệ thống điện di mao quản ABI 3500 [5].

Kết quả MLPA được phân tích bằng phần mềm COFFALYSER để tính tỷ lệ đỉnh của mẫu nghiên cứu so với mẫu đối chứng được gọi là giá trị DQ (Dosage quotient - thương số của tín hiệu đỉnh mẫu nghiên cứu so với mẫu đối chứng). Những đỉnh có giá trị DQ trong khoảng 0,8-1,2 là bình thường; DQ=0 tương đương với đột biến mất đoạn đồng hợp tử; DQ trong khoảng 0,4-0,65 được xác định là xóa đoạn dị hợp tử; DQ>1,3 là có đột biến lặp đoạn [6].

Đạo đức nghiên cứu: Những người mang đột biến gen bệnh α -thalassemia tham gia vào nghiên cứu hoàn toàn tự nguyện. Họ được thông báo kết quả xét nghiệm gen và bảo mật thông tin cá nhân. Nghiên cứu đã được thông qua bởi Hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội.

3. Kết quả

Áp dụng kỹ thuật MLPA để sàng lọc các đột biến trên cụm gen α -globin ở 85 người vợ/chồng đã có chồng/vợ được xác định là người lành mang đột biến gen gây bệnh,

ngiên cứu đã xác định được 38/85 (44,7%) các trường hợp là người lành mang gen gây bệnh. Các đột biến xác định được gồm 2 loại đột biến xóa đoạn và không xóa đoạn.

3.1. Đột biến xóa đoạn

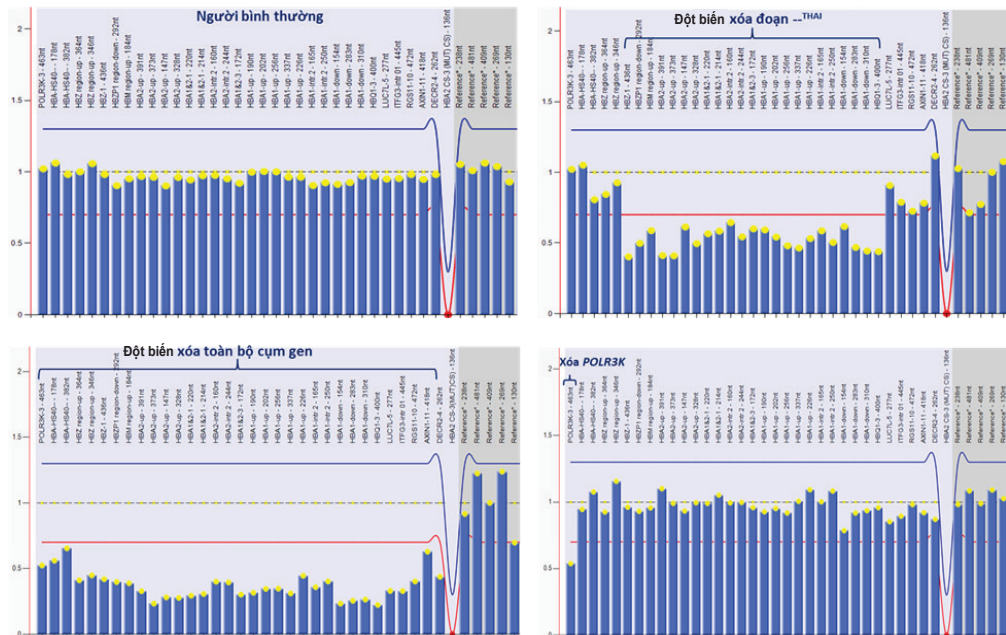
6 dạng đột biến xóa đoạn khác nhau đã được tìm thấy trong nghiên cứu gồm: 26 trường hợp mang đột biến --SEA; 5 trường hợp mang đột biến -- $\alpha^{3.7}$; các đột biến -- THAI , -- $\alpha^{4.2}$, xóa toàn bộ vùng gen α -globin, xóa vùng gen điều hòa *POLR3K-ITFG3* tìm thấy 1 trường hợp mỗi loại. Kết quả phân tích MLPA của từng nhóm đột biến được thể hiện ở hình 1.

Kết quả MLPA của người bình thường cho thấy, các đỉnh của cụm gen α -globin có chiều cao đều nhau và giá trị DQ đều nằm trong giá trị bình thường (khoảng 0,7-1,3 theo như khuyến cáo của nhà sản xuất). Ở người mang đột biến -- THAI các đỉnh từ *HBZ1* đến *HBQ1* có giá trị DQ 0,4-0,65, thấp hơn khoảng 1/2 so với người bình thường tương ứng với khoảng mất đoạn -- THAI . Ở người mang đột biến xóa toàn bộ vùng gen α -globin, toàn bộ các đỉnh đều thấp hơn với nhóm chứng, trừ vùng gen nội chuẩn (Reference). Người mang đột biến xóa vùng gen điều hòa *POLR3K-ITFG3* thì đỉnh tương ứng với gen này có giá trị DQ chỉ bằng 1/2 người bình thường.

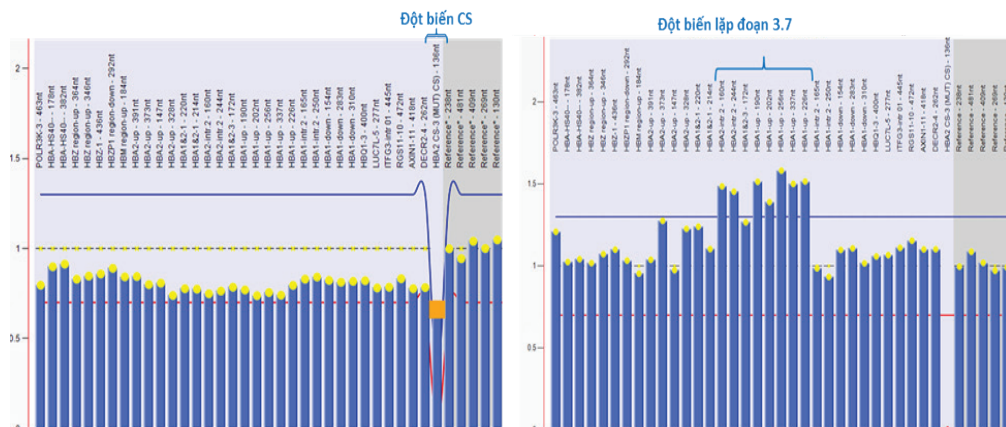
3.2. Đột biến không xóa đoạn

Có 3 trường hợp đột biến không xóa đoạn được phát hiện trong nghiên cứu, 2 trường hợp -- α^{HbCs} và 1 trường hợp lặp đoạn vùng đột biến 3.7 nên được gọi là anti3.7 ($\alpha\alpha^{3.7}$). Kết quả được thể hiện ở hình 2.

Người mang đột biến -- α^{HbCs} có kết quả MLPA gần giống với kết quả của nhóm chứng, giá trị DQ của các đầu dò đều nằm trong khoảng 0,7-1,3 nhưng xuất hiện thêm đỉnh *HBA2-CS* - người mang đột biến lặp đoạn.

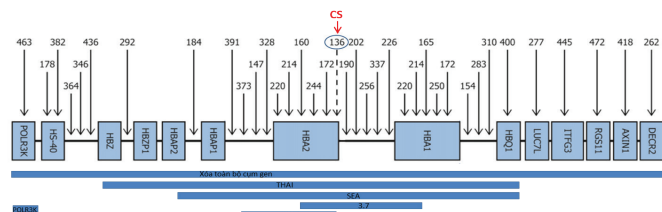


Hình 1. Hình ảnh MLPA một số đột biến xóa đoạn. Trục tung biểu thị giá trị DQ của các mẫu, trục hoành biểu thị các đỉnh của đầu dò trong bộ kit SALSA MLPA Probeset P140 HBA.



Hình 2. Hình ảnh MLPA của người mang đột biến -- α^{HbCs} và đột biến lặp đoạn $\alpha\alpha^{3.7}$.

6 dạng đột biến xóa đoạn được tìm thấy trong nghiên cứu có vị trí tương ứng trên cụm gen α -globin được mô tả theo sơ đồ ở hình 3. Đột biến xóa toàn bộ cụm gen, -- THAI , -- SEA sẽ mất cả 2 gen *HBA1* và *HBA2*; đột biến -- $\alpha^{3.7}$ làm mất một phần gen *HBA1* và 1 phần *HBA2*; đột biến -- $\alpha^{4.2}$ chỉ mất gen *HBA2*. Đột biến -- α^{HbCs} làm kéo dài chuỗi *HBA2*, còn



Hình 3. Sơ đồ vị trí các đột biến được tìm thấy trong nghiên cứu.

đột biến xóa đoạn *POLR3K-ITFG3* không làm thay đổi gen *HBA1* cũng như *HBA2*.

Tổng hợp kết quả MLPA của 85 người trong nhóm nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phát hiện đột biến trên gen α -globin.

Thứ tự	Kết quả	Số lượng	Trung bình MCV (fL)	Trung bình MCH (pg)
I	Dương tính	38 (44,7%)		
1	-- ^{SEA}	26	68,8	21,5
2	- $\alpha^{3.7}$	5	79,0	26,5
3	-- ^{THAI}	1	69,2	22,0
4	- $\alpha^{4.2}$	1	81,5	27,3
5	--	1	59,0	18,6
6	Xóa <i>POLR3K-ITFG3</i>	1	69,1	21,9
7	$\alpha\alpha^{3.7}$	1	79,6	27,5
8	- α^{HbCs}	2	81,9	27,4
II	Âm tính	47 (55,3%)		

MCH: lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu; MCV: thể tích trung bình hồng cầu.

Trong 38 trường hợp có kết quả MLPA dương tính, có 26 trường hợp mang đột biến --^{SEA} (chiếm 68,4%), 5 trường hợp mang đột biến - $\alpha^{3.7}$ (chiếm 13,2%), 2 trường hợp mang đột biến - α^{HbCs} (chiếm 5,3%), 5 dạng đột biến còn lại mỗi dạng chỉ có 1 trường hợp (chiếm 2,6%). Như vậy, đột biến xóa đoạn có tỷ lệ 92,1%, còn đột biến không xóa đoạn chỉ có tỷ lệ 7,9%. Các trường hợp mang đột biến không xóa đoạn hoặc chỉ xóa đoạn 1 gen α -globin thì lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (MCH) và thể tích trung bình hồng cầu (MCV) giảm không đáng kể.

4. Bàn luận

Việt Nam là nước có tỷ lệ người mang gen α -thalassemia rất cao, phân bố ở cả 63 tỉnh/thành phố và 54 dân tộc. Tỷ lệ mang gen chung trên toàn quốc ước tính là 13,8% (khoảng 13-14 triệu người); sự phân bố của bệnh có tính dân tộc và địa lý rõ rệt [7]. Do đó, việc sàng lọc người lành mang đột biến gen gây bệnh là vô cùng quan trọng, đặc biệt là những gia đình đã có vợ hoặc chồng là người lành mang gen bệnh. Nghiên cứu đã phát hiện được 38/85 trường hợp mang đột biến gen α -globin với tỷ lệ cao 44,7% và 8 loại đột biến trong hơn 128 loại đột biến gen α -globin gây ra bệnh α -thalassemia đã được tìm thấy. Sự tương tác giữa các đột biến này có khả năng ngày càng tạo ra các kiểu hình khác nhau. Mức độ nghiêm trọng của bệnh tương quan chặt chẽ với việc giảm hoạt động của gen α -globin [2].

Việc nghiên cứu, phân tích gen để phát hiện các đột biến α -globin đã trải qua hơn 40 năm với sự phát triển vượt bậc, từ kỹ thuật Southern blotting đến khuếch đại PCR và giải trình tự cho phép xác định được hầu hết các đột biến gen *HBA*. Ngày nay, kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (Next generation sequencing - NGS) ra đời cho phép xác định được toàn bộ các đột biến từ xóa đoạn, lặp đoạn, đột biến điểm hay thêm bớt một số nucleotide [8, 9]. Tuy nhiên, giá thành của kỹ thuật này chưa phù hợp với phần lớn các gia đình ở Việt Nam. MLPA được chọn làm kỹ thuật chính để xác định đột biến gen α -globin trong nghiên cứu vì có ưu điểm vượt trội so với các kỹ thuật thông thường khác: kỹ thuật Gap-PCR chỉ có thể xác định các đột biến mất đoạn đã biết và không thể xác định được các đột biến lặp đoạn hay đột biến điểm; kỹ thuật RDB cho phép xác định một số đột biến điểm đã biết. MLPA với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có thể xác định được toàn bộ các đột biến xóa đoạn và lặp đoạn kể cả đột biến xóa đoạn hiếm gặp hoặc mới phát sinh của các gen α -globin; ngoài ra MLPA còn có thể phát hiện được đột biến điểm phổ biến - α^{HbCs} [6, 10].

Đột biến xóa đoạn --^{SEA} chiếm tỷ lệ cao nhất trong nghiên cứu này (68,4%, với 26/38 mẫu có đột biến). Kết quả phù hợp với thực tế rằng, kiểu mất đoạn này là dạng đột biến phổ biến nhất ở Đông Nam Á, dẫn đến thiếu 2 gen quan trọng nhất của vùng gen α -globin là *HBA1* và *HBA2* trên nhiễm sắc thể 16. Các đột biến xóa đoạn lớn khác được tìm thấy là --^{THAI} và xóa toàn bộ vùng gen α -globin. Khi các đột biến xóa đoạn lớn kết hợp với nhau sẽ làm mất hoàn toàn 4 gen *HBA*, do đó không thể tổng hợp chuỗi α -globin. Thai nhi không may mắn mang các dạng đột biến trên sẽ sinh ra quá trình tự trùng hợp các chuỗi γ -globin trong bào thai, tạo ra Hb Bart's; loại α -thalassemia này không có khả năng giải phóng ôxy đến mô, gây phù thai, do đó thai nhi sẽ chết hoặc chỉ sống được một thời gian rất ngắn sau khi sinh [1, 3].

Các đột biến xóa một gen α -globin được tìm thấy của nghiên cứu bao gồm - $\alpha^{3.7}$, - $\alpha^{4.2}$ với tỷ lệ lần lượt là 5/38 (13,2%) và 1/38 (2,6%). Đột biến - $\alpha^{3.7}$ là phổ biến thứ hai sau --^{SEA}, dạng đột biến mất đoạn này tạo nên trình tự gen dung hợp *HBA2-HBA1* được quy ước là α^+ -thalassemia. Tiếp sau đó là đột biến - $\alpha^{4.2}$ làm xóa đoạn gen *HBA2*. Ở Campuchia tần số đột biến - $\alpha^{3.7}$ (0,167) là cao nhất, còn đột biến - $\alpha^{4.2}$ chỉ có tần số là 0,006 theo nghiên cứu của T. Munkongdee và cs (2016) [11], hay nghiên cứu của R. Azma và cs (2014) [12] trong các quần thể Malaysia thì đột biến - $\alpha^{3.7}$ chiếm tỷ lệ 6,2-29%, đột biến - $\alpha^{4.2}$ là 0-1,3%. Đột biến xóa đoạn gen *POLR3K-ITFG3*, gen đầu tiên của cụm α -globin không ảnh hưởng đến cấu trúc cũng như chức năng của gen *HBA1* và *HBA2*, các báo cáo trên thế giới cũng ít quan tâm đến vùng gen này, nhưng vì nằm ở vùng điều hòa nên nó có khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các gen *HBA1* và *HBA2*.

2 dạng đột biến không xóa đoạn được tìm thấy trong nghiên cứu là đột biến điểm $-\alpha^{\text{HbCs}}$ và đột biến lặp đoạn $\alpha\alpha^{3.7}$. Đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ được gây ra bởi sự thay thế bộ ba TAA thành CAA ở vị trí codon kết thúc của gen *HBA2* (c.427T>C(*142Gln)), glutamin thay thế mã kết thúc làm kéo dài chuỗi protein α -globin tạo nên phân tử Hb không bền, dễ bị phân hủy. Đột biến này được tìm thấy ở 2 trường hợp trong tổng số 85 mẫu nghiên cứu. Ở Đông Nam Á, đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ đặc biệt phổ biến ở Thái Lan và Lào. Ở các nước khác trong khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam, số liệu về tỷ lệ mang đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ trong dân số còn hạn chế [13]. Do vậy, việc nghiên cứu $-\alpha^{\text{HbCs}}$ trong cộng đồng là rất quan trọng. Tế bào hồng cầu có liên kết chuỗi globin $-\alpha^{\text{HbCs}}$ đã được chứng minh sẽ gây ra hiện tượng tán huyết. 2 trường hợp mang đột biến dị hợp tử của $-\alpha^{\text{HbCs}}$ không có bất kỳ triệu chứng lâm sàng nào của bệnh α -thalassemia, chỉ số MCV là 76,3 và 87,6 fL; chỉ số MCH là 26,1 và 28,6 pg hầu như bình thường hoặc giảm không đáng kể. Tuy nhiên, khi kết hợp với sự xóa đoạn $--^{\text{SEA}}$ có thể gây ra bệnh HbH. Vì vậy, việc xác định các đột biến trên đóng vai trò rất quan trọng trong việc tư vấn di truyền trước sinh và sàng lọc trước sinh. Đột biến lặp đoạn $\alpha\alpha^{3.7}$ tuy không ảnh hưởng đến việc sản xuất các chuỗi α -globin ở người bình thường, nhưng sẽ làm nghiêm trọng hơn kiểu hình ở bệnh nhân beta-thalassemia do sự mất cân bằng giữa α -globin và beta-globin [14]. Vì vậy, những trường hợp vợ/chồng phát hiện đột biến lặp đoạn gen alpha cần sàng lọc đột biến gen beta-thalassemia để tránh sinh con kết hợp đột biến 2 gen.

Những trường hợp MLPA âm tính, nếu có các chỉ số $\text{MCV} < 85$ fL và $\text{MCH} < 28$ pg cần thiết phải xác định thêm đột biến α -globin bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger hoặc NGS, vì còn khoảng dưới 10% đột biến điểm trên cụm gen α -globin không thể phát hiện bằng phương pháp MLPA [4].

Những nghiên cứu ở nước ta gần đây cho thấy, thalassemia thực sự là vấn đề nghiêm trọng, đe dọa chất lượng dân số và giống nòi. Với tỷ lệ người lành mang gen bệnh cao, tỷ lệ thai nhi bị phù thai hoặc trẻ sinh ra bị bệnh thalassemia thể nặng là đáng báo động ở nhiều tỉnh/thành phố ở nước ta. Vì vậy, việc sàng lọc người mang gen bệnh là vô cùng cần thiết, nhất là với những cặp vợ chồng đã từng sinh con bệnh hoặc có một người đã được xác định là người lành mang gen để có những tư vấn di truyền thích hợp nhằm giảm tỷ lệ phù thai hoặc trẻ sinh ra bị bệnh thalassemia thể nặng.

5. Kết luận

Bằng kỹ thuật MLPA nghiên cứu đã phát hiện 38/85 (44,7%) trường hợp là người lành mang gen bệnh α -thalassemia, bao gồm: 26 trường hợp mang đột biến $--^{\text{SEA}}$ (chiếm 68,4%), 5 trường hợp mang đột biến $-\alpha^{3.7}$ (chiếm

13,2%), 2 trường hợp mang đột biến $-\alpha^{\text{HbCs}}$ (chiếm 5,3%), 5 dạng đột biến còn lại là $--^{\text{THAI}}$, $-\alpha^{4.2}$, xóa toàn bộ vùng gen α -globin, xóa *POLR3K-ITFG3* và anti3.7 ($\alpha\alpha^{3.7}$), mỗi dạng chỉ có 1 trường hợp chiếm tỷ lệ 2,6%. Đột biến xóa đoạn chiếm tỷ lệ 92,1%, còn đột biến không xóa đoạn là 7,9%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.P.W. Goh, E.T.J. Chong, P.C. Lee (2020), "Prevalence of alpha(α)-thalassemia in Southeast Asia (2010-2020): A meta-analysis involving 83,674 subjects", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **17**(20), DOI: 10.3390/ijerph17207354.
- [2] H. Tamary, O. Dgany (1993), "Alpha-thalassemia", *GeneReviews*®, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1435/>, accessed 3 August 2022.
- [3] C.L. Harteveld, D.R. Higgs (2010), " α -thalassaemia", *Orphanet J. Rare Dis.*, **5**, DOI: 10.1186/1750-1172-5-13.
- [4] I.K. Kwaifa, M.I. Lai, S.M. Noor (2020), "Non-deletional alpha thalassemia: A review", *Orphanet J. Rare Dis.*, **15**(1), DOI: 10.1186/s13023-020-01429-1.
- [5] MRC Holland (2022a), *MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification): General Protocol for The Detection and Quantification of DNA Sequences*, <https://www.mrcholland.com/products/4838/MLPA%20General%20Protocol%20MDP-v008.pdf>, accessed 3 August 2022.
- [6] MRC Holland (2022b) *Product Description P140-C1 HBA-v05*, <https://www.mrcholland.com/products/28741/Product%20Description%20P140-C1%20HBA-v05.pdf>, accessed 15 August 2022.
- [7] N.T.T. Ha, N.T. Van, N.M. Quan, et al. (2021), "Overview of thalassemia, current situation, risk and solutions to control thalassemia in Vietnam", *Vietnam Medical Journal*, **502**, pp.1-16 (in Vietnamese).
- [8] S. Farashi, C.L. Harteveld (2018), "Molecular basis of α -thalassaemia", *Blood Cells Mol. Dis.*, **70**, pp.43-53, DOI: 10.1016/j.bcmd.2017.09.004.
- [9] V. Brancaloni, E.D. Pierro, I. Motta, et al. (2016), "Laboratory diagnosis of thalassemia", *Int. J. Lab. Hematol.*, **38**(S1), pp.32-40, DOI: 10.1111/ijlh.12527.
- [10] D. Vijian, W.S.W.A. Rahman, K.T. Ponnuraj, et al. (2021), "Molecular detection of alpha thalassemia: A review of prevalent techniques", *Medeni. Med. J.*, **36**(3), pp.257-269, DOI: 10.5222/MMJ.2021.14603.
- [11] T. Munkongdee, J. Tanakulmas, P. Butthep, et al. (2016), "Molecular epidemiology of hemoglobinopathies in Cambodia", *Hemoglobin*, **40**(3), pp.163-167, DOI: 10.3109/03630269.2016.1158723.
- [12] R. Azma, A. Othman, H. Alauddin, et al. (2014), "Molecular characteristic of alpha thalassemia among patients diagnosed in UKM medical centre", *Malays. J. Pathol.*, **36**(1), pp.27-32.
- [13] W. Jomoui, G. Fucharoen, K. Sanchaisuriya, et al. (2015), "Hemoglobin constant spring among Southeast Asian populations: Haplotypic heterogeneities and phylogenetic analysis", *PLOS ONE*, **10**(12), DOI: 10.1371/journal.pone.0145230.
- [14] C.L. Harteveld, C. Refaldi, E. Cassinerio, et al. (2008), "Segmental duplications involving the alpha-globin gene cluster are causing beta-thalassemia intermedia phenotypes in beta-thalassemia heterozygous patients", *Blood Cells Mol. Dis.*, **40**(3), pp.312-316, DOI: 10.1016/j.bcmd.2007.11.006.

Nghiên cứu sàng lọc sơ sinh bệnh thiếu enzyme Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) tại Bệnh viện Đa khoa Medlatec

Tạ Thị Lan Anh¹, Trịnh Thị Quế², Vũ Thị Hà¹, Đào Thị Thu Hiền³, Hoàng Thị Ngọc Lan¹, Đoàn Thị Kim Phượng^{1*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Đa khoa Medlatec, 42 Nghĩa Dũng, phường Phúc Xá, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện Phụ sản Trung ương, 43 Tràng Thi, phường Hàng Bông, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/9/2023; ngày chuyển phản biện 2/10/2023; ngày nhận phản biện 25/10/2023; ngày chấp nhận đăng 27/10/2023

Tóm tắt:

Mục tiêu: Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) từ mẫu máu gót chân trẻ sơ sinh và phân tích kết quả sàng lọc một số trường hợp thiếu hụt enzyme G6PD. **Phương pháp nghiên cứu:** Mô tả cắt ngang hồi cứu và tiến cứu kết hợp mô tả ca bệnh. **Kết quả:** Nghiên cứu trên 3.223 trẻ thực hiện xét nghiệm sàng lọc sơ sinh máu gót chân từ tháng 9/2022 đến tháng 9/2023 cho thấy, tỷ lệ nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD ở trẻ nam cao hơn đáng kể so với trẻ nữ. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh tỷ lệ trẻ có kết quả nguy cơ cao sàng lọc ở nhóm trẻ dân tộc Mường và các dân tộc thiểu số khác so với nhóm trẻ dân tộc Kinh ($p < 0,01$). Giữa các nhóm ngày tuổi lấy mẫu và cân nặng khác nhau, tỷ lệ trẻ có hoạt độ enzyme ở ngưỡng nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Đột biến gặp trong nghiên cứu là G6PD Union (c.1360C>T) (p.Arg454Cys), hoạt độ enzyme giảm <10%, tương ứng với mức độ thiếu enzyme Class II. **Kết luận:** Yếu tố giới tính và dân tộc của trẻ có mối liên quan với hoạt độ enzyme ở các ngưỡng nguy cơ thiếu enzyme G6PD. Nghiên cứu mối tương quan giữa kiểu gen *G6PD* và kiểu hình có ý nghĩa rất lớn trong việc tư vấn di truyền, dự đoán tiên lượng và quản lý tình trạng thiếu enzyme G6PD.

Từ khóa: đột biến, thiếu G6PD, trẻ sơ sinh, tư vấn di truyền.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Thiếu enzyme G6PD là một trong những bệnh lý enzyme phổ biến nhất ở người, ảnh hưởng đến hàng triệu người trên toàn thế giới [1]. Bệnh do đột biến trên gen *G6PD*, di truyền liên kết với nhiễm sắc thể X tạo nên nhiều kiểu hình lâm sàng và sinh hóa. Biểu hiện thường gặp nhất của tình trạng thiếu hụt enzyme G6PD là thiếu máu, tan máu cấp tính và vàng da sơ sinh, thường do tác nhân oxy hóa ngoại sinh gây ra. Sàng lọc sơ sinh bệnh thiếu enzyme G6PD đóng vai trò quan trọng trong việc phòng và điều trị tan máu, vàng da sơ sinh kịp thời, hạn chế biến chứng vàng da nhân não - biến chứng không hồi phục, để lại di chứng chậm phát triển tâm thần vận động và trở thành gánh nặng cho cả gia đình và xã hội. Từ năm 2015, chương trình sàng lọc sơ sinh bệnh thiếu enzyme G6PD đã được mở rộng triển khai tại nhiều cơ sở y tế Việt Nam, nhưng các nghiên cứu về sàng lọc sơ sinh đối với bệnh thiếu enzyme G6PD vẫn còn hạn chế. Vì vậy chúng tôi thực hiện: “Nghiên cứu sàng lọc sơ sinh bệnh thiếu enzyme G6PD tại Bệnh viện Đa khoa Medlatec” với 2 mục tiêu: 1) Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme G6PD từ mẫu máu gót chân trẻ sơ sinh; 2) Phân tích kết quả sàng lọc một số trường hợp thiếu hụt enzyme G6PD từ mẫu máu gót chân trẻ sơ sinh.

*Tác giả liên hệ: Email: doankimphuong@hmu.edu.vn

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu mô tả cắt ngang hồi cứu kết hợp tiến cứu trên 3.223 trẻ được lấy máu gót chân tham gia sàng lọc bệnh thiếu enzyme G6PD, có đầy đủ dữ liệu về các yếu tố liên quan trong thời gian từ tháng 9/2022 đến tháng 9/2023.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tất cả các mẫu được định lượng hoạt độ enzyme G6PD bằng kỹ thuật bán định lượng sử dụng bộ kit Neonatal G6PD ND-1000 của Hãng SISC trên hệ thống máy đo miễn dịch huỳnh quang Victor 2D. Hoạt độ enzyme $\leq 2,6$ U/gHb được phân loại nhóm nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD; $> 2,6$ U/gHb: nhóm nguy cơ thấp thiếu enzyme G6PD.

Các chỉ số giới tính, tuổi lấy mẫu, cân nặng lúc sinh, dân tộc được phân nhóm và tìm mối liên quan với ngưỡng hoạt độ cao thấp của G6PD. Mô tả ca bệnh một số trường hợp dương tính với sàng lọc được xét nghiệm định lượng hoạt độ G6PD máu tĩnh mạch và xác định đột biến trên gen *G6PD* bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới. Sử dụng các kiểm định χ^2 với các biến định tính. Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê y sinh học bằng phần mềm SPSS 20.0.

Research of newborn screening of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency at Medlatec General Hospital

Thi Lan Anh Ta¹, Thi Que Trinh², Thi Ha Vu¹,
Thi Thu Hien Dao³, Thi Ngoc Lan Hoang¹,
Thi Kim Phuong Doan^{1*}

¹Hanoi Medical University,

¹ Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Medlatec General Hospital,

42 Nghia Dung Street, Phuc Xa Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

³National Hospital of Obstetrics and Gynecology,

43 Trang Thi Street, Hang Bong Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 29 September 2023; revised 25 October 2023; accepted 27 October 2023

Abstract:

Objective: Survey some factors affecting Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) enzyme activity from newborn heel blood samples and analyse screening results of some cases of G6PD enzyme deficiency. **Research method:** Retrospective and prospective cross-sectional description combined with case description. **Results:** Research on 3223 children who performed the newborn heel blood screening test from September 2022 to September 2023 showed that the high-risk rate of G6PD enzyme deficiency in boys is significantly higher than in girls. The difference is statistically significant when comparing the proportion of neonates with high-risk screening results in the Muong ethnic group and other ethnic minorities compared to the Kinh ethnic group ($p < 0.01$). Between different sampling age groups and different weight groups, the proportion of children with enzyme activity at the high-risk threshold for G6PD enzyme deficiency did not have a statistically significant difference ($p > 0.05$). The mutation encountered in the study was G6PD Union (c.1360C>T) (p.Arg454Cys), the enzyme activity decreased by <10% corresponding to the level of class II enzyme deficiency, showing mild hemolysis and no severe consequences in infancy. **Conclusion:** Children's gender and ethnicity are related to enzyme activity at risk thresholds for G6PD enzyme deficiency. Studying the correlation between genotype and phenotype is of great significance in genetic counselling, predicting prognosis and managing G6PD enzyme deficiency.

Keywords: genetic counselling, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, deficiency, mutations, newborns.

Classification number: 3.1

3. Kết quả

3.1. Một số yếu tố của trẻ sơ sinh liên quan đến kết quả xét nghiệm sàng lọc bệnh thiếu enzyme G6PD

Kết quả bảng 1 cho thấy, tỷ lệ trẻ sơ sinh nam có hoạt độ enzyme G6PD thuộc nhóm nguy cơ cao có sự khác biệt đáng kể so với trẻ sơ sinh nữ, với độ tin cậy 95% ($p < 0,05$).

Bảng 1. Mối liên quan giữa giới tính và hoạt độ enzyme tại các ngưỡng nguy cơ thiếu enzyme G6PD.

Giới tính	Hoạt độ enzyme tại ngưỡng	Nguy cơ cao		Nguy cơ thấp		p
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
Nam		81	5,1	1497	94,9	$p < 0,05$
Nữ		60	3,6	1585	96,4	
Tổng		141		3082		

Tỷ lệ trẻ có hoạt độ enzyme tại ngưỡng nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD tại các nhóm cân nặng <2.500 g, ≥2.500 g lần lượt là 5,0 và 4,4% (bảng 2). Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ trẻ có hoạt độ enzyme G6PD ở nhóm nguy cơ cao và thấp ở các nhóm trẻ phân nhóm cân nặng khác nhau với độ tin cậy 95% ($p > 0,05$).

Bảng 2. Mối liên quan giữa cân nặng khi sinh và hoạt độ enzyme tại các ngưỡng nguy cơ thiếu enzyme G6PD.

Cân nặng	Hoạt độ enzyme tại ngưỡng	Nguy cơ cao		Nguy cơ thấp		p
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
<2.500 g		6	5,0	115	95,0	$p > 0,05$
≥2.500 g		135	4,4	2967	95,6	
Tổng		141		3082		

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ trẻ có hoạt độ enzyme G6PD tại ngưỡng nguy cơ cao ở các nhóm ngày tuổi <2 ngày, 2-3 ngày, 4-7 ngày, 8-30 ngày lần lượt là 3,4, 4,4, 5,4 và 4,3%. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% ($p > 0,05$).

Bảng 3. Mối liên quan giữa tuổi được sàng lọc và hoạt độ enzyme G6PD tại các ngưỡng nguy cơ thiếu enzyme G6PD.

Ngày tuổi	Hoạt độ enzyme tại ngưỡng	Nguy cơ cao		Nguy cơ thấp		p
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
<2 ngày		22	3,4	618	96,6	$p > 0,05$
2-3 ngày		86	4,4	1851	95,6	
4-7 ngày		25	5,4	435	94,6	
8-30 ngày		8	4,3	178	95,7	
Tổng số		141		3082		

Bảng 4. Mối liên quan giữa dân tộc và hoạt độ enzyme tại các ngưỡng nguy cơ thiếu enzyme G6PD.

Dân tộc	Hoạt độ enzyme tại ngưỡng	Nguy cơ cao		Nguy cơ thấp		p
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
Kinh		93	3,2	2772	96,8	p<0,01
Mường		38	13,4	246	86,6	
Các dân tộc thiểu số khác		10	13,5	64	86,5	
Tổng		141		3082		

Tỷ lệ trẻ dân tộc Kinh có nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD thấp hơn so với nhóm trẻ thuộc dân tộc Mường và các dân tộc thiểu số khác, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p<0,01$ (bảng 4).

3.2. Phân tích một số kết quả sàng lọc thiếu hụt enzyme G6PD bằng mẫu máu gót chân thấm khô

Bảng 5. Hoạt độ enzyme G6PD trong mẫu máu thấm khô của trẻ sơ sinh được sàng lọc.

Kết quả sàng lọc	n	Tỷ lệ (%)	Hoạt độ enzyme G6PD (U/gHb)		
			Min	Max	Trung vị
Nguy cơ cao thiếu G6PD	141	4,4	0,1	2,6	1,1
Nguy cơ thấp thiếu G6PD	3.082	95,6	2,7	50,0	4,9
Tổng	3.223	100			

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, với 3.223 trẻ sơ sinh được thống kê trong nghiên cứu, 141 trẻ sơ sinh thuộc nhóm nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD, chiếm tỷ lệ 4,4% so với nhóm nguy cơ thấp là 95,6%. Trong đó, ở nhóm nguy cơ thấp thiếu enzyme G6PD có trung vị hoạt độ là 4,9 U/gHb, hoạt độ dao động trong khoảng 2,7-50 U/gHb. Ở nhóm nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD, hoạt độ enzyme có trung vị là 1,1 U/gHb, với hoạt độ thấp nhất là 0,1 U/gHb và cao nhất là 2,6 U/gHb.

Hoạt độ G6PD máu gót chân sàng lọc sơ sinh và hoạt độ G6PD máu tĩnh mạch đều giảm $<10\%$, các trẻ đều là nam người dân tộc Mường và đều phát hiện biến thể gây bệnh c.1360C>T trên gen *G6PD* (bảng 6).

Bảng 6. Hoạt độ G6PD máu gót chân, máu tĩnh mạch và kết quả xét nghiệm gen của một số trẻ trong nhóm nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD.

Mã bệnh nhân	Giới	Tuổi (tháng)	Dân tộc	Hoạt độ G6PD máu gót chân (U/gHb)	Hoạt độ G6PD máu tĩnh mạch (U/gHb)	Biểu hiện lâm sàng giai đoạn sơ sinh	Biến thể <i>G6PD</i>
1	Nam	2	Mường	0,40	0,02	Không có hiện tượng vàng da bệnh lý	Bản hợp tử biến thể: c.1360C>T (p.Arg454Cys)
2		3		0,10	0,14	Không có hiện tượng vàng da bệnh lý	
3		7		0,10	0,10	Không có hiện tượng vàng da bệnh lý	
4		3		0,30	0,02	Vàng da kéo dài 1 tháng tự hết, không điều trị gì	
5		3,5		0,10	0,09	Vàng da kéo dài, điều trị chiếu đèn 5 ngày	

4. Bàn luận

Nghiên cứu trên 3.223 trẻ được sàng lọc máu gót chân bệnh thiếu enzyme G6PD cho thấy, trẻ nam có tỷ lệ nguy cơ thiếu men G6PD cao hơn so với trẻ nữ ($p<0,05$). Điều này phù hợp với sự di truyền liên kết X của gen *G6PD*, nam giới (XY) có tỷ lệ biểu hiện bệnh cao hơn nữ giới (XX).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, mối liên quan giữa hoạt độ enzyme G6PD tại các ngưỡng nguy cơ thiếu enzyme G6PD và yếu tố cân nặng khi sinh có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Điều này chứng minh rằng, yếu tố cân nặng có thể không liên quan đến nguy cơ thiếu enzyme G6PD. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu sàng lọc bệnh thiếu enzyme G6PD của H.V.Q. Vu và cs (2022) [2] trên 4.544 trẻ sơ sinh tại Bệnh viện Phụ sản TP Cần Thơ và S. Bisoi và cs (2012) [3] trên 109 trẻ sơ sinh tại Bệnh viện West Bengal. Thêm vào đó, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ trẻ có hoạt độ G6PD tại ngưỡng nguy cơ thấp và cao ở các nhóm ngày tuổi khác nhau. Điều này gợi ý việc lấy mẫu sàng lọc G6PD ở các nhóm ngày tuổi trong thời gian 30 ngày không làm nhiều kết quả sàng lọc. Mặc dù hoạt độ enzyme không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố này nhưng việc thực hiện lấy mẫu gót chân sàng lọc sơ sinh vào ngày thứ 2-3 sau sinh vẫn cần thiết để phát hiện bệnh sớm, tư vấn nguy cơ và sàng lọc cùng với nhóm bệnh chuyển hóa khác (suy giáp bẩm sinh, tăng sản thượng thận bẩm sinh...).

Kết quả một nghiên cứu khác cho thấy, tỷ lệ thiếu enzyme G6PD rất khác nhau giữa các dân tộc và vùng địa lý, đặc biệt là vùng dịch tễ sốt rét [1]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, dân tộc Mường chiếm tỷ lệ cao thứ 2, chỉ sau dân tộc Kinh, nhưng tỷ lệ nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD cao gấp 4 lần. Ngoài ra, các dân tộc khác như Thái, Tày... cũng chiếm tỷ lệ cao trong nhóm nguy cơ cao. Như vậy, trong nghiên cứu này, sự phân bố nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD tập trung chủ yếu ở các dân tộc thiểu số khu vực miền núi phía Bắc.

Nghiên cứu trên 5 mẫu sàng lọc nguy cơ cao đã phát hiện được đột biến trên gen *G6PD*. Điều thú vị là cả 5 mẫu đều mang cùng một loại biến thể c.1360C>T (p.Arg454Cys). Đây cũng là đột biến phổ biến nhất ở dân tộc Mường, tên

gọi khác là G6PD Union [4]. Biến thể thay thế nucleotide tại vị trí c.1360C>T làm biến đổi acid amin Arginin thành Cystein đã được chứng minh có liên quan đến khả năng ổn định nhiệt của protein và làm giảm khả năng xúc tác của enzyme [5]. G6PD Union được phân loại gây bệnh trên hệ thống ClinVar và Hiệp hội Di truyền Y khoa Hoa Kỳ (ACMG). Đột biến làm giảm hoạt độ enzyme G6PD <10%, thuộc Class II theo phân loại của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) về mức độ thiếu enzyme và biểu hiện lâm sàng [6, 7].

Hoạt độ enzyme G6PD biểu hiện mức độ thiếu hụt khác nhau tùy thuộc vào vị trí đột biến và giới tính. Khi mang cùng biến thể, người nam bán hợp tử (hemizygote) và người nữ đồng hợp tử (homozygote) không có sự khác biệt về hoạt độ enzyme, tuy nhiên người nữ dị hợp tử (heterozygote) có mức độ biểu hiện đa dạng, hoạt độ enzyme chủ yếu trong khoảng 30-60% hoạt độ bình thường, xếp vào Class III [8]. Điều này được giải thích bởi sự bất hoạt nhiễm sắc thể X, hoạt độ G6PD phụ thuộc vào tỷ lệ tế bào hồng cầu bị thiếu hụt enzyme. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các trẻ nam bán hợp biến thể G6PD Union có hoạt độ enzyme ở mức <10% (0,02-0,14 U/gHb) thuộc Class II, có biểu hiện lâm sàng là thiếu hụt enzyme mức độ nặng, có thể có các đợt tan máu cấp khi tiếp xúc với các tác nhân oxy hóa mạnh (thuốc chống sốt rét, đậu fava...) hoặc nhiễm trùng, tuy vậy cùng là biến thể này, hoạt độ enzyme ở người nam trưởng thành là $0,68 \pm 0,39$ U/gHb (<10%), của người nữ trưởng thành dị hợp tử ở nghiên cứu của Y. He và cs (2020) [8] là $4,63 \pm 2,77$ U/gHb, thuộc Class III, thiếu hụt mức độ nhẹ hơn, có thể có tình trạng tan máu cấp tính khi tiếp xúc với các tác nhân oxy hóa [8]. Với 5 trẻ có đột biến, ở giai đoạn sơ sinh các biểu hiện tan máu chưa để lại hậu quả nghiêm trọng nhưng những trẻ này vẫn cần khám định kỳ, tư vấn chế độ ăn uống và chế độ dùng thuốc để hạn chế những đợt tan máu cấp biểu hiện khi tiếp xúc với các tác nhân oxy hóa mạnh.

5. Kết luận

Kết quả sàng lọc sơ sinh nguy cơ cao thiếu enzyme G6PD gặp nhiều hơn ở trẻ nam và dân tộc thiểu số. Các yếu tố cân nặng khi sinh, ngày tuổi lấy mẫu không ảnh hưởng đến sự khác biệt của nguy cơ sàng lọc bệnh thiếu enzyme G6PD.

Đột biến gặp phổ biến trong nghiên cứu là G6PD Union, tương ứng với mức độ thiếu enzyme Class II (WHO), biểu hiện tan máu chưa để lại hậu quả nghiêm trọng ở giai đoạn sơ sinh, tuy nhiên người bệnh vẫn cần được tư vấn về nguy cơ tan máu khi sử dụng thuốc, thực phẩm có tính oxy hóa mạnh. Nghiên cứu mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình có ý nghĩa rất lớn trong việc tư vấn di truyền, dự đoán tiên lượng và quản lý tình trạng thiếu enzyme G6PD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Luzzatto, M. Ally, R. Notaro (2020), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency", *Blood*, **136**(11), pp.1225-1240, DOI: 10.1182/blood.2019000944.
- [2] H.V.Q. Vu, T.N. Dung (2022), "Rate of G6PD deficiency and some related factors in newborns at Can Tho City Obstetrics Hospital in 2021-2022", *Journal of Medical Research*, **516**(1), DOI: 10.51298/vmj.v516i1.2938 (in Vietnamese).
- [3] S. Bisoi, S. Chakraborty, D. Chattopadhyay, et al. (2012), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase screening of babies born in a tertiary care hospital in West Bengal", *Indian J. Public Health*, **56**(2), pp.146-148, DOI: 10.4103/0019-557X.99908.
- [4] T.H. Thinh, N.T. Thao, T.V. Khanh (2022), "Determination of G6PD gene mutation in patients of the Muong ethnic group with G6PD enzyme deficiency", *Journal of Medical Research*, **514**(2), DOI: 10.51298/vmj.v514i2.2599 (in Vietnamese).
- [5] X.T. Wang, V.M.S. Lam, P.C. Engel (2005), "Marked decrease in specific activity contributes to disease phenotype in two human Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutants, G6PD_{Union} and G6PD_{Andalus}", *Hum. Mutat.*, **26**(3), DOI: 10.1002/humu.9367.
- [6] S.R. Richardson, G.F. O'Malley (2022), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency", *Bull. World Health Organ.*, **67**(6), pp.601-611.
- [7] Malaria Policy Advisory Group Meeting (2022), *Technical Consultation to Review The Classification of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)*, Switzerland Background document for Session 2, 20pp.
- [8] Y. He, Y. Zhang, X. Chen, et al. (2020), "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Han Chinese population: Molecular characterization and genotype-phenotype association throughout an activity distribution", *Sci. Rep.*, **10**, DOI: 10.1038/s41598-020-74200-y.

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và căn nguyên chảy máu phế nang lan tỏa ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2018 đến 2023

Nguyễn Thị Lê*, Hoàng Thị Phương Thanh, Hoàng Thị Thu Hằng, Phan Tuấn Hưng

Trung tâm Hô hấp, Bệnh viện Nhi Trung ương, 18/879 La Thành, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/8/2023; ngày chuyển phản biện 25/8/2023; ngày nhận phản biện 11/9/2023; ngày chấp nhận đăng 14/9/2023

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Chảy máu phế nang lan tỏa (Diffuse alveolar haemorrhage - DAH) là tình trạng bệnh nặng, hiếm gặp ở trẻ em. Do bệnh diễn biến kéo dài, biểu hiện lâm sàng kín đáo, triệu chứng không đặc hiệu, dễ gây nhầm lẫn với một số bệnh nên DAH hay bị bỏ sót hoặc chẩn đoán muộn. Nghiên cứu này mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, nhằm tìm ra dấu hiệu gợi ý chẩn đoán sớm cũng như xác định nguyên nhân DAH ở trẻ em. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mô tả loạt ca bệnh. **Kết quả:** Từ tháng 1/2018 đến tháng 3/2023 nghiên cứu thu thập được 14 trẻ mắc DAH. Tuổi khởi phát là 4,08 (1,58-5,41) tuổi, nhưng đa số bệnh nhân được chẩn đoán muộn với tuổi khi chẩn đoán là 5,25 (1,67-6,16), tỷ lệ nam/nữ là 1:1,8. Các triệu chứng thường gặp là thiếu máu (100%) với tính chất thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc nhưng không thiếu sắt (Ferritin 458 ± 132), ho máu (57,1%), khó thở (71,4%) và suy hô hấp (85,7%). Hình ảnh X-quang thường gặp là thâm nhiễm lan tỏa 2 phổi (92,9%). Trên cắt lớp vi tính lồng ngực, 92,9% bệnh nhân có hình ảnh kính mờ lan tỏa, 57,1% có dày kẽ 2 phổi và 28,6% có hình ảnh đông đặc phổi. Trong 14 bệnh nhân có 3 trẻ dị ứng sữa (chiếm 22%), 2 trẻ viêm mạch ANCA (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody), chiếm 14% và 9 trẻ ứ hemosiderin phổi vô căn (IPH), chiếm 64%.

Từ khóa: bệnh ứ hemosiderin phổi vô căn (IPH), chảy máu phế nang lan tỏa (DAH), trẻ em, viêm mạch ANCA.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

DAH là tình trạng bệnh hiếm gặp nhưng nguy hiểm đến tính mạng nếu không được chẩn đoán và điều trị phù hợp. Triệu chứng lâm sàng của bệnh thường kín đáo ở giai đoạn đầu nên dễ bị bỏ sót. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu về DAH, đa số đều cho thấy có nhiều bệnh nhân bị chẩn đoán muộn. Ở Việt Nam, số lượng bệnh nhân được chẩn đoán DAH chưa nhiều và chưa có nghiên cứu nào về biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng cũng như căn nguyên DAH ở trẻ em. Do vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này để mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và căn nguyên DAH ở trẻ em, nhằm tìm ra những triệu chứng gợi ý giúp chẩn đoán sớm DAH. DAH là hội chứng tổn thương màng mao mạch - phế nang ở phổi, dẫn đến chảy máu từ mao mạch phổi vào trong phế nang. Biểu hiện thường gặp là ho máu, thiếu máu, thâm nhiễm phổi, trong trường hợp nặng có thể gây suy hô hấp. Chẩn đoán sớm và điều trị phù hợp có thể làm giảm tỷ lệ tử vong của bệnh. Về sinh lý bệnh, có 2 nguồn cấp máu chính cho phổi là tuần hoàn phế quản và tuần hoàn phổi. DAH là tình trạng chảy máu từ nguồn tuần hoàn phổi, là nguồn cấp máu áp lực thấp nhưng thể tích tuần hoàn cao, do vậy chảy máu thường có tính chất lan tỏa, ít gây ho máu nhưng bệnh nhân dễ suy hô hấp và thiếu máu nặng. Có nhiều tình trạng bệnh có thể gây ra DAH và được chia thành 3 nhóm lớn như mô tả ở bảng 1 [1-3].

Bảng 1. Bảng các nguyên nhân gây DAH.

Viêm mạch ANCA (+)	Viêm đa mạch u hạt Wegener (WG)
	Viêm đa mạch u hạt dị ứng Churg-Strauss (CSS)
Viêm mao mạch phổi	Viêm đa mạch máu nhỏ (MPA)
	Hội chứng Goodpasture (GPS)
Viêm mạch ANCA (-)	Lupus ban đỏ hệ thống (SLE)
	Viêm khớp thiếu niên
Viêm mạch phổi đơn độc vô căn (IPC)	Bệnh Behcet's
	Viêm mao mạch dị ứng, bệnh thận IgA
Tổn thương mạch phổi không viêm	Viêm mạch cryoglobulinemia
	Bệnh ứ sắt phổi vô căn (IPH)
Tim mạch	Hội chứng Heiner, bệnh Celiac von Willebrand
	Chảy máu phổi cấp tính vô căn ở trẻ nhũ nhi
Tim mạch	Hẹp hai lá, hẹp hoặc thiếu sản tĩnh mạch phổi, tăng áp phổi, suy tim mạn,
	bất thường trở về tĩnh mạch phổi toàn bộ

Căn nguyên gây DAH thường gặp nhất ở trẻ em là IPH [4, 5]. Đây là tình trạng tổn thương mao mạch phổi chưa rõ nguyên nhân, gây từng đợt chảy máu từ mao mạch phổi vào phế nang, lâu dài dẫn đến ứ sắt ở phổi và dần dần xơ hóa phổi. Sinh lý bệnh của IPH còn nhiều tranh cãi, nhưng có một số giả thuyết được đưa ra như: dị ứng, môi trường, gen và yếu tố tự miễn [5, 6]. Trong IPH, không có hiện tượng viêm mạch phổi, cũng không tìm thấy kháng thể tự miễn nào tấn công vào mao mạch phổi. Thời gian bệnh diễn biến kéo dài, tỷ lệ tử vong cao.

*Tác giả liên hệ: Email: drnguyenle@gmail.com

Clinical features, paraclinical characteristics, and etiology of mediastinal bleeding diffusion in children at the Vietnam National Children's Hospital from 2018 to 2023

Thi Le Nguyen*, Thi Phuong Thanh Hoang,
Thi Thu Hang Hoang, Tuan Hung Phan

Respiratory Center, Vietnam National Children's Hospital,
18/879 La Thanh Street, Lang Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 22 August 2023; revised 11 September 2023; accepted 14 September 2023

Abstract:

Background: In modern life, diffuse alveolar haemorrhage (DAH) is a serious and rare condition in children. Due to the subtle clinical manifestations and diverse causes of the disease, it is easy to be missed or diagnosed late. This study describes clinical and paraclinical characteristics, with the aim to find signs suggesting early diagnosis as well as determine the cause of DAH in children. **Objects and methods:** Case series. **Results:** From January 2018 to March 2023, there were 14 children diagnosed with DAH. The age of onset is 4.08 (1.58-5.41) years old, but most patients are diagnosed late with age at diagnosis being 5.25 (1.67-6.16) years old, male/female ratio is 1:1.8. The most common symptoms reported were anaemia (100%), hemoptysis (57.1%), shortness of breath (71.4%), and respiratory failure (85.7%). The common X-ray finding was diffuse infiltrates in both lungs (92.9%). On chest computed tomography scans, 92.9% of patients exhibited images of blurred opacity spreading, 57.1% showed interlobar pleural thickening, and 28.6% presented with images of lung consolidation. 3 patients (22%) had milk allergy, 2 patients (14%) had ANCA (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody) vasculitis, and 9 patients (64%) had idiopathic pulmonary haemosiderosis (IPH).

Keywords: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody vasculitis, children, diffuse alveolar haemorrhage, idiopathic pulmonary hemosiderosis.

Classification number: 3.2

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Tất cả bệnh nhân nhập viện ở Trung tâm Hô hấp, Bệnh viện Nhi Trung ương được chẩn đoán DAH từ tháng 1/2018 đến tháng 3/2023.

2.2. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân

Tổn thương thâm nhiễm phổi lan tỏa trên cắt lớp vi tính lồng ngực kèm theo xét nghiệm dịch rửa phế quản có hình ảnh đại thực bào ăn hemosiderin, hoặc sinh thiết phổi có hình ảnh DAH. Bệnh nhân và gia đình bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu [1, 2].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Mô tả tiến cứu loạt ca bệnh.

Các bước tiến hành: Tất cả bệnh nhân được làm xét nghiệm cơ bản như công thức máu, đông máu, chức năng gan thận, tế bào niệu, protein niệu, CRP, X-quang ngực trước khi được nội soi phế quản, chụp cắt lớp vi tính lồng ngực độ phân giải cao và siêu âm tim. Quá trình nội soi phế quản sẽ đánh giá cấu trúc cây phế quản, tìm điểm chảy máu, lấy dịch rửa phế quản đánh giá tính chất dịch như màu sắc (hồng, đỏ, vàng, nâu, trong) và phân tích tế bào dịch, nhuộm sắt tìm đại thực bào ăn hemosiderin, PCR và nuôi cấy tìm vi khuẩn, nấm là những nhiễm trùng có thể gây chảy máu phổi. Cắt lớp vi tính lồng ngực độ phân giải cao giúp đánh giá tổn thương phổi lan tỏa hay khu trú, tìm tổn thương kính mờ, dày mô kẽ, đông đặc phổi, giúp chẩn đoán phân biệt với các nguyên nhân ho máu khác như u phổi, dị dạng thông động tĩnh mạch phổi. Siêu âm tim Doppler được chỉ định thường quy để đánh giá các bất thường cấu trúc tim và tăng áp lực động mạch phổi. Các bệnh nhân đều được làm các xét nghiệm tìm kháng thể bệnh tự miễn gây viêm mạch phổi bao gồm: kháng thể kháng nhân, anti - DsDNA, anti Phospholipid, pANCA, cANCA, anti GBM, bổ thể C3, C4, RF, anti CCP, xét nghiệm dị ứng sữa IgG4 với casein, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin.

Định nghĩa các biến số chính: Tuổi khởi phát là tuổi của trẻ lúc phát hiện triệu chứng đầu tiên. Hội chứng thận phổi là bệnh nhân có chảy máu phổi kèm tổn thương cầu thận gồm: protein/creatinin niệu >20 mcg/mg, hồng cầu niệu (+). Chảy máu phổi do viêm mạch ANCA khi bệnh nhân được chẩn đoán DAH và có kháng thể ANCA (+). Chảy máu phổi do dị ứng sữa (hội chứng Heiner): Nếu bệnh nhân có kháng thể IgG4 với casein, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin dương tính và các triệu chứng hô hấp cải thiện sau khi bệnh nhân ngừng hoàn toàn các chế phẩm từ sữa. Bệnh IPH được hiểu là khi bệnh nhân có DAH tái diễn nhưng không tìm được căn nguyên, sinh thiết phổi không có viêm mạch phổi.

2.4. Xử lý và phân tích số liệu

Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0. Biến định tính được tính tần số và tỷ lệ phần trăm. Biến định lượng được tính trung bình và độ lệch chuẩn đối với phân bố chuẩn, được tính trung vị và khoảng tứ phân vị đối với phân bố không chuẩn.

3. Kết quả

Trong thời gian từ tháng 1/2018 đến tháng 3/2023 có 14 bệnh nhân được chẩn đoán DAH tại Trung tâm Hô hấp, Bệnh viện Nhi Trung ương. Tất cả 14 bệnh nhân đều được nội soi phế quản lấy dịch rửa phế quản xét nghiệm và đều có hình ảnh đại thực bào ăn hemosiderin trên tiêu bản nhuộm sắt trong dịch rửa phế quản. Có 2 bệnh nhân được sinh thiết phổi cho thấy hình ảnh chảy máu lan tỏa vào các phế nang mà không có hình ảnh viêm mao mạch phổi.

Bảng 2. Đặc điểm chung nhóm bệnh nhân nghiên cứu.

Đặc điểm	Trung vị (khoảng tứ phân vị)
Tuổi khởi phát triệu chứng	4,08 (1,58-5,41) tuổi
Tuổi chẩn đoán	5,25 (1,67-6,16) tuổi
Thời gian chẩn đoán muộn	1,08 (0,5-1,25) tuổi
Tỷ lệ nam/nữ	5/9 (nam:nữ là 1:1,8)

Kết quả bảng 2 cho thấy, các bệnh nhân khởi phát triệu chứng ở thời điểm 4,08 (1,58-5,41) tuổi, nhưng được chẩn đoán DAH lúc 5,25 (1,67-6,16) tuổi, trung bình muộn 1,08 năm. Trẻ nữ gặp nhiều hơn nam, với tỷ lệ nam:nữ là 1:1,8.

Bảng 3. Chẩn đoán trước khi được chẩn đoán DAH.

Chẩn đoán	n	%
Thiếu máu chưa rõ nguyên nhân	6	42,9
Viêm phổi tái diễn/kéo dài	3	21,4
Thalassemia	2	14,3
Viêm phổi kẽ	2	14,3
ARDS	1	7,1

Kết quả bảng 3 cho thấy, trước khi được chẩn đoán xác định DAH, bệnh nhân thường được chẩn đoán là thiếu máu chưa rõ nguyên nhân (42,9%), thalassemia (14,3%) hoặc viêm phổi tái diễn/kéo dài (21,4%).

Bảng 4. Triệu chứng lâm sàng.

	Khởi phát	Chẩn đoán
Thiếu máu	14 (100%)	14 (100%)
Ho máu	2 (14,3%)	8 (57,1%)
Khó thở	7 (50%)	12 (85,7%)
Suy hô hấp	7 (50%)	11 (78,6%)
Sốt	3 (21,4%)	4 (28,6%)
Ran ẩm	-	2 (14,3%)

Kết quả bảng 4 cho thấy, thiếu máu là biểu hiện thường gặp nhất cả ở thời điểm xuất hiện triệu chứng và thời điểm chẩn đoán. Đa số các bệnh nhân không có biểu hiện khó thở trong giai đoạn đầu (85,7%), đây có thể là lý do bệnh nhân bị bỏ sót chẩn đoán trong giai đoạn sớm. Tại thời điểm chẩn đoán, 57,1% bệnh nhân có ho máu, 78,6% suy hô hấp. Triệu chứng sốt và phổi có ran ẩm ít gặp hơn.

Bảng 5. Đặc điểm triệu chứng thiếu máu.

Thiếu máu	n
Thiếu máu nhược sắc hồng cầu nhỏ	14 (100%)
Hemoglobin	7,8±3,2 g/dl
Ferritin	458±132 mcg/l

Kết quả bảng 5 cho thấy, tính chất thiếu máu thường là thiếu máu nhược sắc hồng cầu nhỏ, với Hemoglobin trung bình là 7,8±3,2 g/dl, tuy nhiên không có tình trạng thiếu sắt với Ferritin trung bình là 458±132 mcg/l.

Bảng 6. Dấu hiệu trên X-quang và cắt lớp vi tính ngực.

Tổn thương	X-quang ngực	Cắt lớp vi tính ngực	p
Thâm nhiễm lan tỏa 2 phổi	13 (92,9%)	-	
Kính mờ	-	13 (92,9%)	
Dày tổ chức kẽ	4 (28,6%)	8 (57,1%)	<0,05
Đông đặc phổi	2 (14,3%)	5 (35,7%)	<0,05

Kết quả bảng 6 cho thấy, hình ảnh thường gặp trên X-quang phổi là thâm nhiễm lan tỏa 2 phổi (92,9%), tương ứng với tổn thương thường gặp trên cắt lớp vi tính lồng ngực là hình kính mờ lan tỏa 2 phổi (92,9%). Cắt lớp vi tính phát hiện 57,1% bệnh nhân có dày tổ chức kẽ, là biểu hiện của ứ sắt trong nhu mô phổi, cao hơn có ý nghĩa so với X-quang ngực chỉ phát hiện được 28,6%. Đông đặc phổi cũng có thể gặp trong đợt chảy máu cấp ở 14,3% trên X-quang ngực và 35,7% trên cắt lớp vi tính lồng ngực (hình 1).

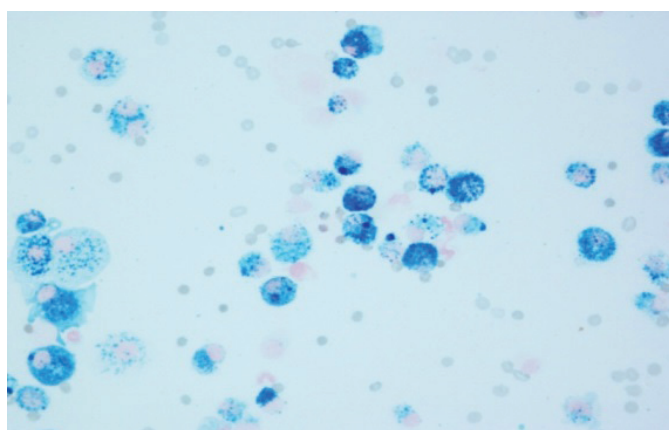


Hình 1. Cắt lớp vi tính lồng ngực bệnh nhân DAH với hình ảnh kính mờ lan tỏa 2 phổi.

Bảng 7. Đặc điểm dịch rửa phế quản.

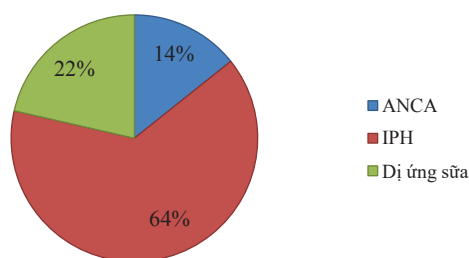
Màu sắc	Hồng	9 (64,3%)
	Nâu, vàng	3 (21,4%)
	Đỏ	2 (14,3%)
Hồng cầu		12 (85,7%)
Đại thực bào ăn hemosiderin		14 (100%)

Kết quả bảng 7 cho thấy, đa số bệnh nhân có dịch soi màu hồng. Dịch đỏ hoặc nâu, vàng ít gặp hơn. Đại thực bào ăn hemosiderin dương tính ở tất cả các mẫu bệnh phẩm dịch rửa phế quản của bệnh nhân. Như vậy, màu sắc dịch rửa phế quản chỉ mang tính chất gợi ý, không có ý nghĩa khẳng định hiện tượng chảy máu phổi.



Hình 2. Hình ảnh đại thực bào ăn hemosiderin trên tiêu bản nhuộm xanh phổi Perl dịch rửa phế quản của bệnh nhân DAH.

Kết quả hình 2 cho thấy, có 2 bệnh nhân được sinh thiết phổi đều cho thấy hình ảnh DAH với nhiều hồng cầu và đại thực bào ăn hemosiderin trong phế nang mà không có hình ảnh viêm mạch hay hoại tử mạch máu.



Hình 3. Căn nguyên DAH.

Kết quả hình 3 cho thấy, IPH là nguyên nhân thường gặp nhất (64%). Dị ứng sữa xác định ở 3 bệnh nhân (22%) và viêm mạch ANCA xác định được ở 2 bệnh nhân (14%).

4. Bàn luận

DAH là tình trạng có tổn thương lan tỏa màng mao mạch phế nang ở phổi, khiến cho máu chảy trực tiếp từ mao mạch phổi vào phế nang, gây ra ho máu, thiếu máu, khó thở, có

thể suy hô hấp. Bệnh hiếm gặp ở trẻ em nhưng là tình trạng nặng, có thể đe dọa tính mạng bệnh nhân nếu chảy máu nặng. Bởi bệnh diễn biến kéo dài, qua nhiều đợt chảy máu phổi sẽ gây ứ sắt trong khoảng kẽ nhu mô phổi, lâu dài dẫn tới xơ phổi. Chẩn đoán sớm và điều trị phù hợp có vai trò quyết định giúp làm ngừng tình trạng chảy máu, bảo tồn chức năng phổi cho bệnh nhân.

Từ tháng 1/2018 đến tháng 3/2023, có 14 bệnh nhân được chẩn đoán DAH tại Trung tâm Hô hấp, Bệnh viện Nhi Trung ương. Tỷ lệ trẻ nữ cao hơn nam (nam/nữ là 1:1,8). Y. Qi và cs (2021) [3] báo cáo nhóm 74 trẻ DAH trong vòng 10 năm tại Trung Quốc cho thấy tỷ lệ nam/nữ là 1:1,6. Nghiên cứu đa trung tâm của A.M. Ring và cs (2021) [4] cũng chỉ ra bệnh gặp ở nữ nhiều hơn (58%).

Các bệnh nhân khởi phát triệu chứng ở thời điểm 4,08 (1,58-5,41) tuổi, nhưng được chẩn đoán lúc 5,25(1,67-6,16) tuổi. Thời điểm chẩn đoán chậm 1,08 (0,5-1,25) năm so với thời điểm bắt đầu của bệnh. Y. Qi và cs (2021) [3] cũng báo cáo đa số các bệnh nhân đều được chẩn đoán muộn, trung bình khoảng 2 năm. DAH là bệnh diễn biến kéo dài, trong giai đoạn sớm có thể chỉ có biểu hiện thiếu máu, các triệu chứng hô hấp như ho máu, khó thở, suy hô hấp thường chưa xuất hiện, do vậy bác sỹ lâm sàng dễ bỏ sót bệnh này.

Thiếu máu là triệu chứng thường gặp và xuyên suốt của DAH. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra, trong giai đoạn sớm, thiếu máu có thể là biểu hiện duy nhất của bệnh. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 100% bệnh nhân có thiếu máu, với tính chất thiếu máu hồng cầu nhỏ, nhược sắc. Đây là lý do nhiều bệnh nhân bị chẩn đoán nhầm với các bệnh lý khác như thiếu máu chưa rõ nguyên nhân (42,9%), Thalassemia (14,3%). Tuy nhiên, đa số các bệnh nhân của chúng tôi không có biểu hiện thiếu sắt với Ferritin trung bình là 458±132 mcg/l. Đây là dấu hiệu phân biệt thiếu máu do DAH và thiếu máu do thiếu sắt.

Ở một số trẻ tình trạng chảy máu phổi diễn biến kéo dài với nhiều đợt chảy máu cấp tính khiến trẻ khó thở, suy hô hấp nên trẻ có thể được chẩn đoán viêm phổi tái diễn (21,4%). Một số trường hợp khác tình trạng chảy máu mức độ ít tới vừa nhưng liên tục và kéo dài, trẻ không có triệu chứng ho hay khó thở nhưng sau thời gian dài gây ra hiện tượng ứ sắt trong nhu mô phổi, biểu hiện như viêm phổi kẽ (14,3%).

Ho máu là triệu chứng kinh điển của chảy máu phổi. Tuy nhiên trong DAH ở trẻ em, ho máu có thể không xuất hiện. Theo A.M. Ring và cs (2021) [4], ho máu chỉ xuất hiện ở 42% các trường hợp DAH. Còn Y. Qi và cs (2021) [3] thì báo cáo 64,9% trẻ DAH có ho máu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, giai đoạn sớm ho máu chỉ xuất hiện ở 14,3%, giai đoạn muộn ở 57,1% các trường hợp. Triệu chứng ho máu xuất hiện muộn hoặc không xuất hiện là lý do quan trọng khiến cho bác sỹ lâm sàng không nghĩ tới và bỏ sót DAH.

Trong DAH, máu chảy trực tiếp từ mao mạch phổi vào phế nang, làm rối loạn tình trạng trao đổi khí nên bệnh nhân dễ dàng suy hô hấp, thậm chí trước khi ho máu xuất hiện. Trong 14 bệnh nhân của chúng tôi, 78,62% bệnh nhân có suy hô hấp ở thời điểm chẩn đoán. Có 28,6% bệnh nhân sốt trong đợt ho máu, kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu đa trung tâm của A.M. Ring và cs (2021) [4] với triệu chứng thường gặp là thiếu máu (85%), ho máu (40%) và Y. Qi và cs (2021) [3] với 83,8% bệnh nhân thiếu máu, 64,9% có ho máu, 44,6% khó thở và giảm oxy máu.

Chẩn đoán hình ảnh có vai trò quan trọng trong chẩn đoán và định hướng căn nguyên ho máu nói chung và DAH nói riêng. X-quang ngực là xét nghiệm cơ bản hay được sử dụng trên lâm sàng, tuy nhiên các dấu hiệu trên X-quang thường không đặc hiệu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các dấu hiệu trên X-quang thường gặp là thâm nhiễm lan tỏa 2 phổi (92,9%), dày tổ chức kẽ (28,6%). Cắt lớp vi tính có khả năng phát hiện tổn thương chảy máu phổi cũng như xơ hóa khoảng kẽ của phổi vượt trội hơn X-quang. Hình ảnh đặc trưng của chảy máu phổi trên cắt lớp vi tính là kính mờ. Đông đặc phổi cũng có thể xuất hiện trong đợt chảy máu cấp nặng, khi máu lấp đầy nhanh chóng và toàn bộ các phế nang ở một vùng của phổi. Các bệnh nhân của chúng tôi đa số đều có hình ảnh kính mờ trên cắt lớp vi tính (92,9%), dày tổ chức kẽ ghi nhận ở 57,1% bệnh nhân, là dấu hiệu chỉ điểm của chảy máu phổi đã diễn biến kéo dài, tái diễn nhiều đợt gây ứ sắt ở phổi. Như vậy, cắt lớp vi tính có thể phát hiện tổn thương chảy máu phổi và xơ phổi tốt hơn X-quang, có ý nghĩa trong chẩn đoán bệnh.

Tất cả các bệnh nhân đều được nội soi phế quản lấy dịch rửa phế quản, trong đó 2 bệnh nhân có dịch soi màu đỏ, 9 bệnh nhân có dịch soi hồng và 3 bệnh nhân có dịch soi nâu, vàng. Màu sắc dịch rửa phế quản có thể thay đổi tùy thuộc thời điểm soi phế quản. Giai đoạn mới chảy máu, dịch soi có thể màu đỏ với bệnh nhân chảy máu nặng ở ạt, hoặc màu hồng với bệnh nhân có tốc độ chảy máu chậm hơn. Giai đoạn sau chảy máu, hồng cầu trong dịch rửa bị giáng hóa, thực bào, dịch soi sẽ dần chuyển sang màu nâu hoặc vàng. Khi nhuộm xanh phổ Perl dịch rửa phế quản, 100% bệnh nhân có hình ảnh đại thực bào ăn hemosiderin. Như vậy, màu sắc dịch rửa phế quản chỉ mang tính chất gợi ý, không có giá trị khẳng định chảy máu phổi.

Về nguyên nhân DAH, nhóm bệnh nhân của chúng tôi có 3 trẻ dị ứng sữa (22%), 2 trẻ bị viêm mạch ANCA với hội chứng thận phổi, 9 bệnh nhân IPH. 2/9 bệnh nhân IPH được tiến hành sinh thiết phổi, kết quả cho thấy tình trạng DAH với nhiều hồng cầu trong lòng phế nang, đại thực bào ăn sắt,

không có tình trạng viêm mạch hay hoại tử mạch. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu của Y. Qi và cs (2021) [3] và A.M. Ring và cs (2021) [4] với IPH là nhóm căn nguyên hàng đầu của DAH. IPH là một bệnh lý hiếm gặp ở trẻ nhỏ, đặc trưng bởi các đợt chảy máu tái diễn từ mao mạch phổi vào phế nang dẫn tới ứ hemosiderin trong đại thực bào ăn sắt của phổi. IPH thường diễn biến mạn tính, bệnh kéo dài nhiều tháng và chỉ được phát hiện khi tình trạng thiếu máu đã tái diễn nhiều đợt hoặc ứ sắt trong phổi gây những triệu chứng hô hấp rõ rệt.

5. Kết luận

DAH là nhóm bệnh hiếm gặp, nặng nề và hay bị bỏ sót hoặc chẩn đoán muộn ở trẻ em. Bệnh diễn biến mạn tính với triệu chứng thường gặp nhất là thiếu máu hồng cầu nhỏ. Thiếu máu có thể là biểu hiện đầu tiên và duy nhất của DAH mà không kèm theo ho máu. Với các bệnh nhân thiếu máu hồng cầu nhỏ mà không tìm được nguyên nhân, hoặc thiếu máu kèm viêm phổi kẽ, viêm phổi kéo dài/tái diễn, nên chuyển bệnh nhân tới những cơ sở có khả năng chụp cắt lớp vi tính lồng ngực và nội soi phế quản lấy dịch rửa xét nghiệm để chẩn đoán DAH. Hình ảnh đại thực bào ăn hemosiderin trên tiêu bản nhuộm sắt dịch rửa phế quản kết hợp với tổn thương kính mờ lan tỏa trên cắt lớp vi tính cho chẩn đoán xác định DAH. Nguyên nhân của bệnh rất đa dạng trong đó IPH là nhóm hay gặp nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.J. Vece, M.M. De Guzman, C. Langston, et al. (2019), "Diffuse alveolar hemorrhage in children", *Kendig's Disorders of The Respiratory Tract in Children*, **19**(3), pp.893-902, DOI: 10.1016/B978-0-323-44887-1.00061-4.
- [2] D. Parris, A.V. Niekerk, A.C. Jeevarathnum, et al. (2017), "An approach to pulmonary haemorrhage in children", *S. Afr. Respir. J.*, **23**(3), pp.63-70, DOI: 10.7196/SARJ.2017.v23i3.152.
- [3] Y. Qi, L. Wang, L. Qian, et al. (2021), "The etiology, clinical profile, and outcome of diffuse alveolar hemorrhage in children: A ten-year single-center experience", *Transl. Pediatr.*, **10**(11), pp.2921-2928, DOI: 10.21037/tp-21-283.
- [4] A.M. Ring, N. Schwerk, N. Kiper, et al. (2021), "Diffuse alveolar haemorrhage in children: An international multicentre study", *ERJ. Open Res.*, **9**(2), DOI: 10.1183/23120541.00733-2022.
- [5] Y. Zhang, F. Luo, N. Wang, et al. (2019), "Clinical characteristics and prognosis of idiopathic pulmonary hemosiderosis in pediatric patients", *J. Int. Med. Res.*, **47**(1), pp.293-302, DOI: 10.1177/0300060518800652.
- [6] C.T. Yang, B.L. Chiang, L.C. Wang (2021), "Aggressive corticosteroid treatment in childhood idiopathic pulmonary hemosiderosis with better outcome", *Journal of The Formosan Medical Association*, **120**(2), pp.838-846, DOI: 10.1016/j.jfma.2020.05.022.

Kết quả phẫu thuật nội soi điều trị bệnh co thắt tâm vị theo phương pháp Heller-Toupet

Nguyễn Đăng Hưng^{1,2*}, Phạm Đức Huân³, Nguyễn Hoàng^{1,2}

¹Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec Times City, 458 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/12/2022; ngày chuyển phản biện 14/12/2022; ngày nhận phản biện 4/1/2023; ngày chấp nhận đăng 9/1/2023

Tóm tắt:

Mục tiêu: Đánh giá kết quả phẫu thuật nội soi điều trị bệnh co thắt tâm vị theo phương pháp Heller-Toupet. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả hồi cứu được thực hiện tại Khoa Ngoại Tiêu hóa - Gan mật, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 1/2015 đến tháng 8/2022 trên 71 bệnh nhân (BN) bị co thắt tâm vị được phẫu thuật nội soi theo phương pháp Heller-Toupet. **Kết quả:** BN nam (52,1%) nhiều hơn nữ (47,9%), tuổi trung bình là $44,9 \pm 13,9$, 100% BN có nuốt nghẹn. Đa số có thực quản giãn độ II (76,1%) và mức độ nặng của bệnh ở giai đoạn I (57,7%). Độ dài đường mở cơ trung bình là $7,4 \pm 1,3$ cm, thời gian phẫu thuật là 135 ± 25 phút. Không có trường hợp nào phải chuyển mổ mở, không có tai biến trong mổ và biến chứng sau mổ liên quan đến phẫu thuật. Kết quả xa: tốt (không nghẹn hoặc nghẹn rất nhẹ) là 90,1%, trung bình (nghẹn vừa) là 9,9% và tỷ lệ có hội chứng trào ngược trên lâm sàng là 17%. Không có trường hợp nào phải can thiệp hoặc mổ lại. **Kết luận:** Phẫu thuật nội soi điều trị co thắt tâm vị theo phương pháp Heller-Toupet là phương pháp an toàn, ít tai biến và có kết quả theo dõi xa sau mổ tốt.

Từ khóa: co thắt tâm vị, phẫu thuật nội soi, phương pháp Heller-Toupet.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Co thắt tâm vị là bệnh hiếm gặp (tỷ lệ gặp là 0,4-0,6/100.000 người), nhưng có thể gặp ở mọi lứa tuổi và ở cả hai giới. Nguyên nhân gây bệnh chưa rõ ràng, hai giả thuyết chính được nêu ra để giải thích hiện tượng không có hạch thần kinh ở thực quản là bệnh tự miễn gây ra quá trình thoái hóa của các tế bào thần kinh (tương tự như bệnh Parkinson) hoặc thứ phát do nhiễm virus gây độc tế bào thần kinh dẫn tới thoái hóa tế bào thần kinh [1].

Hiện nay, điều trị có nhiều phương pháp khác nhau có thể tóm tắt thành 2 nhóm gồm: điều trị nội khoa bằng thuốc chẹn kênh calci, tiêm độc tố toxin botulinum (Botox) vào cơ thắt dưới thực quản, nong thực quản bằng bóng và điều trị ngoại khoa gồm cắt cơ vòng thực quản dưới niêm mạc qua nội soi đường miệng (POEM) hoặc phẫu thuật cắt cơ thắt dưới thực quản (phẫu thuật Heller) [1].

Heller là người đầu tiên thực hiện phẫu thuật cắt cơ thắt dưới thực quản vào năm 1913, cho tới nay vẫn là phương pháp chính để điều trị co thắt tâm vị. Có thể ghi nhận Cuschieri và Shimi là những người đầu tiên thực hiện phẫu thuật Heller bằng phẫu thuật nội soi vào năm 1991 [2]. Phẫu thuật nội soi điều trị co thắt tâm vị có ưu điểm là khả thi, an toàn, ít đau, nhanh hồi phục, thẩm mỹ nên được áp dụng rộng rãi trong điều trị co thắt tâm vị [3-5].

Một vấn đề còn đang được thảo luận là trong phẫu thuật Heller thì có cần tạo van chống trào ngược không và phương pháp tạo van nào có hiệu quả nhất? Đa số các nhà khoa học ủng

hộ cho việc tạo van chống trào ngược. Van 270° theo Toupet và van 180° theo Dor được áp dụng nhiều hơn vì hiệu quả chống trào ngược và ít gây hẹp thực quản [5-7].

Tại Khoa Phẫu thuật Tiêu hóa, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, các tác giả thực hiện phẫu thuật Heller-Toupet bằng phẫu thuật nội soi điều trị co thắt tâm vị từ năm 2004 và đã có bài báo đánh giá kết quả sớm về phương pháp phẫu thuật này [8, 9]. Trong thời gian từ tháng 1/2015 tới tháng 8/2022, chúng tôi tiếp tục triển khai phẫu thuật này tại Khoa Ngoại Tiêu hóa - Gan mật, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội trên 71 trường hợp. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm đánh giá kết quả của phẫu thuật nội soi điều trị co thắt tâm vị theo phương pháp Heller-Toupet tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả hồi cứu được thực hiện tại Khoa Ngoại Tiêu hóa - Gan mật, Bệnh viện Trường Đại học Y Hà Nội từ tháng 1/2015 đến tháng 8/2022. Tiêu chuẩn chọn BN bao gồm: Các BN được chẩn đoán co thắt tâm vị dựa trên triệu chứng lâm sàng và các phương pháp thăm dò chức năng. BN được phẫu thuật nội soi theo phương pháp Heller-Toupet. Các biến số nghiên cứu của BN bao gồm tuổi, giới, triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, bảng điểm Eckardt của BN trước và sau mổ.

Tất cả các BN được thực hiện theo một quy trình phẫu thuật nội soi thống nhất với 5 vị trí đặt trocar, bao gồm các thì bóc tách thực quản bụng lên cao đủ để cắt mở cơ thực quản, mở cơ thực quản bắt đầu từ tâm vị lên thực quản 5-8 cm và mở cơ về

*Tác giả liên hệ: Email: danghung1214@gmail.com

Results of laparoscopic Heller-Toupet operation for achalasia

Dang Hung Nguyen^{1,2*}, Duc Huan Pham³, Hoang Nguyen^{1,2}

¹Hanoi Medical University Hospital,

1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi Medical University,

1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

³Vinmec Times City International Hospital,

458 Minh Khai Street, Vinh Tuy Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 12 December 2022; revised 4 January 2023; accepted 9 January 2023

Abstract:

Objectives: This study was carried out to evaluate surgical outcomes of laparoscopic Heller-Toupet surgery for achalasia. **Methodology:** This is a retrospective case series implemented at the Gastrointestinal Department, Hanoi Medical University Hospital between January 2015 and August 2022, including 71 patients with achalasia who underwent laparoscopic Heller-Toupet. **Results:** 52.1% of patients in the study are male (more than female 47.9%). The average age of the cohort was 44.9±13.9 years. The incidence of dysphagia was 100%. Most patients report esophageal dilatation grade II (76.1%) and disease severity stage I (57.7%). The mean muscle opening length was 7.4±1.3 cm, the operative time was 135±25 minutes. There was no conversion, no intra- and postoperative adverse events. **Long-term outcomes:** good (no or very mild dysphagia) was 90.1%, moderate (moderate dysphagia) was 9.9% and clinical incidence of reflux syndrome was 17%. There was no case requiring intervention or re-operation. **Conclusions:** Laparoscopic Heller-Toupet is a safe, low rate of intra- and postoperative complication, and brings good long-term outcomes in the treatment of achalasia.

Keywords: achalasia, Heller-Toupet procedure, laparoscopy.

Classification number: 3.2

phía dạ dày 2-3 cm. Bơm hơi qua thông dạ dày kiểm tra đường mở cơ và thủng niêm mạc thực quản. Nếu khe hoành rộng thì khâu hẹp lại bằng 1-2 mũi chỉ Vicryl 2.0. Giải phóng phình vị bằng dao siêu âm, tạo van kiểu Toupet 270 độ phía sau thực quản và khâu van vào 2 mép của đường mở cơ bằng chỉ Vicryl 3.0. Van được khâu vào cột trụ hoành phải bằng 4 mũi chỉ rời, Vicryl 2.0.

Các tai biến, tỷ lệ chuyển mổ mở, các kết quả sớm sau mổ được ghi nhận. Theo dõi xa sau mổ qua thăm khám để đánh giá kết quả xa sau mổ.

Các kết quả được thu thập và phân tích bằng phần mềm thống kê SPSS 20.0. Biến liên tục được mô tả dưới dạng trung bình ±SD và biến rời rạc được mô tả dưới dạng tần số và tỷ lệ %.

3. Kết quả

Trong 7 năm, có 71 BN có thất tâm vị được phẫu thuật nội soi theo phương pháp Heller-Toupet tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, trong đó nam giới chiếm 52,1%, nữ chiếm 47,9%. Tuổi trung bình của nhóm BN là 44,9±13,9, thấp nhất là 21 tuổi, cao nhất là 78 tuổi. 100% BN nghiên cứu đều có nuốt nghẹn. Điểm Eckardt trước mổ được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Điểm Eckardt trước mổ.

Triệu chứng	n	%	Tần suất	n	%
Nuốt nghẹn	71	100	Không	0	0
			Thỉnh thoảng	3	4,2
			Hàng ngày	3	4,2
			Mỗi bữa ăn	65	91,6
Ợ	17	23,9	Không	54	76,1
			Thỉnh thoảng	5	7,0
			Hàng ngày	5	7,0
			Mỗi bữa ăn	7	9,9
Đau ngực	6	8,5	Không	65	91,6
			Thỉnh thoảng	3	4,2
			Hàng ngày	3	4,2
			Mỗi bữa ăn	0	0
Gầy sút	16	22,5	Không	55	77,5
			<5 kg	2	2,8
			5-10 kg	3	4,2
			>10 kg	11	15,5

Trên phim chụp X quang thực quản, thực quản giãn độ I, II, III, IV lần lượt là 7,0, 76,1, 15,5 và 1,4%. Chỉ có 10 BN được đo áp lực thực quản độ phân giải cao trước mổ và phân loại, trong đó 3 BN thuộc loại I, 5 BN thuộc loại II và 2 BN thuộc loại III (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả cận lâm sàng trước mổ.

Đặc điểm	n	%
Mức độ giãn của thực quản trên phim X-quang thực quản có uống thuốc	Độ I	5
	Độ II	54
	Độ III	11
	Độ IV	1
	Tổng	71
Phân loại dựa trên đo áp lực thực quản độ phân giải cao thực hiện trước mổ	Loại I	3
	Loại II	5
	Loại III	2
	Tổng	10

Mức độ nặng của BN được trình bày ở bảng 3 cho thấy, chủ yếu BN ở mức độ 1 và 2.

Bảng 3. Mức độ nặng của nhóm BN nghiên cứu trước mổ.

Giai đoạn	n	%
Giai đoạn 0 (0-1 đ)	2	2,8
Giai đoạn 1 (2-3 đ)	41	57,7
Giai đoạn 2 (4-6 đ)	24	33,8
Giai đoạn 3 (>6 đ)	4	5,7
Tổng	71	100

Bảng 4. Kết quả trong mổ.

Thời gian phẫu thuật (phút)	Trung bình	135±25
	Ngắn nhất	90
	Dài nhất	225
Chiều dài trung bình đường mở cơ (cm)	Chung	7,4±1,3
	Thực quản	5,8±1,6
	Dạ dày	2,5±0,6
Tai biến trong mổ	Chảy máu	0
	Rách màng phổi	0
	Thủng niêm mạc	0
	Khác	0

Kết quả bảng 4 cho thấy, không có trường hợp nào phải chuyển mổ mở, không có tai biến trong mổ, không có thủng niêm mạc thực quản khi mở cơ. Chiều dài đường mở cơ trung bình là 7,4±1,3 cm. Chiều dài đường mở cơ trung bình về phía thực quản là 5,8±1,6 cm và chiều dài đường mở cơ trung bình về phía dạ dày là 2,5±0,6 cm. Thời gian mổ trung bình là 135±25 phút.

Bảng 5. Kết quả sau mổ.

Đặc điểm	n	%	
Thời gian nằm viện trung bình (ngày)	5,3±5,4		
Biến chứng sau mổ	Chảy máu	0	
	Viêm phổi	0	
	Thủng niêm mạc thì 2	0	
	Viêm gan cấp	1	
Thời gian theo dõi trung bình (tháng)	Trung bình	26,6±19,2	
	Ngắn nhất	1	
	Dài nhất	66	
Nuốt nghẹn sau mổ	Không	50	70,4
	Thỉnh thoảng	14	17,7
	Hàng ngày	6	8,5
	Mỗi bữa ăn	1	3,4
	Tổng	71	100
X-quang thực quản có uống cản quang sau mổ	Bình thường	64	90,1
	Lưu thông chậm	7	9,9
	Không lưu thông	0	0
	Tổng	71	100
Tăng cân sau mổ	Có	55	77,5
	Không	16	22,5
Trào ngược dạ dày - thực quản sau mổ	Không	59	83,0
	Thỉnh thoảng	5	7,0
	Hàng ngày	7	10,0
	Tổng	71	100

Kết quả bảng 5 cho thấy, sau mổ, không có trường hợp nào có biến chứng liên quan đến phẫu thuật. 1 BN viêm gan cấp trong thời gian hậu phẫu, điều trị nội khoa sau 10 ngày BN ổn định ra viện. Thời gian nằm viện trung bình 5,3±5,4 ngày. Thời gian theo dõi trung bình là 26,6±19,2 tháng, ngắn nhất là 1 tháng và dài nhất là 66 tháng.

Kết quả theo dõi xa sau mổ cho thấy, 90,1% BN không nghẹn hoặc nghẹn rất nhẹ với thức ăn đặc và chụp thực quản kiểm tra thấy thuốc cản quang lưu thông tốt chỉ có 9,9% BN có nuốt nghẹn mức độ trung bình, chụp thực quản kiểm tra thấy thuốc lưu thông qua thực quản xuống dạ dày chậm. 77,5% BN tăng cân sau mổ và 22,5% BN không tăng cân.

Dấu hiệu lâm sàng trào ngược dạ dày thực quản sau mổ gặp ở 17% biểu hiện bằng nóng rát vùng trên rốn và sau xương ức, được điều trị nội khoa, không có BN nào hẹp thực quản phải can thiệp hoặc mổ lại.

4. Bàn luận

Phẫu thuật mở cơ thắt dưới thực quản được Heller thực hiện lần đầu tiên vào năm 1913 và cho đến nay vẫn là phương pháp chính trong điều trị bệnh cơ thắt tâm vị. Phẫu thuật nội soi điều trị cơ thắt tâm vị được thực hiện lần đầu vào năm 1991 bởi 2 nhóm nghiên cứu của Cuschieri và Shimi và ngày càng được phổ cập vì các ưu điểm của nó so với mổ mở [2-4]. Các nghiên cứu đều cho thấy phẫu thuật nội soi là phương pháp khả thi, với kết quả sớm có nhiều ưu điểm hơn mổ mở và kết quả xa ngang bằng mổ mở. Các ưu điểm của phẫu thuật nội soi được nêu ra là giảm đau sau mổ, giảm các biến chứng của vết mổ, ăn sớm hơn, giảm thời gian nằm viện, hoạt động trở lại sớm và thẩm mỹ. Do vậy, phẫu thuật nội soi được cho là một ưu tiên lựa chọn để điều trị để điều trị cơ thắt tâm vị, phẫu thuật mở chỉ còn được áp dụng khi không có chỉ định của phẫu thuật nội soi [2-4].

Các tai biến trong mổ là rất ít và nhẹ. Tai biến chính trong mổ là thủng niêm mạc thực quản. Tỷ lệ thủng niêm mạc thực quản thay đổi theo các nghiên cứu từ 4-15% [5, 6]. Vị trí thủng niêm mạc thường xảy ra khi cắt cơ ở phần thấp của đường mở cơ, về phía dạ dày, ở đó lớp cơ mỏng, lớp cơ dính sát lớp dưới niêm mạc nên khó bóc tách và dễ thủng hơn. Các lỗ thủng niêm mạc thường nhỏ và thường được khâu thành công qua nội soi với chỉ PDS hoặc Vicryl 4.0. Một số tác giả tăng cường cho đường khâu bằng tạo van 180°, khâu úp mặt trước của phình vị lớn vào đường mở cơ theo phương pháp Dor [10]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, không có trường hợp nào bị thủng niêm mạc thực quản khi cắt cơ. Kinh nghiệm cắt mở cơ thực quản của chúng tôi là bắt đầu đường mở cơ ở phần thấp của thực quản, cắt từ lớp cơ dọc sau đó đến lớp cơ vòng cho tới lớp dưới niêm mạc bằng móc điện và kéo. Khi tới lớp dưới niêm mạc, 2 mép cơ được nâng lên và kéo sang 2 bên, sau đó dùng dao siêu âm tách lớp cơ thực quản khỏi lớp niêm mạc và cắt dọc từ dưới lên trên cho tới khi đặt được 5-6 cm. Việc tách và cắt lớp cơ bằng dao siêu âm đảm bảo đường cắt cơ gọn, cầm máu tốt và không gây bỏng niêm mạc. Sau đó, đường mở cơ đi dần về phía dạ dày 2-3 cm và dùng móc điện để cắt từ từ từng thớ cơ một, đặc biệt thận trọng khi cắt các sợi cơ sát niêm mạc. Cần lưu ý là khi chảy máu ở các mạch nhỏ dưới niêm mạc thì rất cần thận khi đốt điện cầm máu tránh làm bỏng niêm mạc, nên sử dụng gạc nội soi ép vào để cầm máu và kiên nhẫn cho đến khi máu tự cầm. Chúng tôi kiểm tra đường mở cơ và thủng niêm mạc bằng bơm nước vào bụng, sau đó bơm hơi từ từ qua ống thông dạ dày, nếu đã cắt hết cơ thì niêm mạc thực quản màu hồng nhạt sẽ phồng lên giữa 2 mép của đường mở cơ, nếu có thủng niêm mạc thì hơi sẽ xì qua lỗ thủng và dễ dàng nhận thấy.

Tỷ lệ chuyển mổ trong các nghiên cứu thay đổi 0-13%, nguyên nhân chủ yếu là thủng niêm mạc và chảy máu phải chuyển mổ để xử lý [4, 7, 8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi không có trường hợp nào phải chuyển mổ và không gặp khó khăn nào trong mổ.

Các biến chứng sau mổ có thể gặp 1-13%. Trong đó, thủng niêm mạc thứ phát gây viêm phúc mạc do bong niêm mạc bằng dao điện khi cắt cơ. Tỷ lệ này có thể gặp 1-7% [5, 9, 10]. Đây là các biến chứng nặng, tuy nhiên, với kinh nghiệm và kỹ thuật của phẫu thuật viên ngày càng hoàn thiện nên các tai biến và biến chứng sau mổ ngày càng giảm. Chúng tôi chưa gặp biến chứng này trong nghiên cứu và chúng tôi cũng rất cẩn trọng trong việc dùng móc điện, nhất là khi cắt các sợi cơ sát niêm mạc dạ dày. Trong các BN của chúng tôi có 1 BN bị viêm gan cấp, tăng men gan sau mổ, BN đã được làm chẩn đoán loại trừ các nguyên nhân nội ngoại khoa khác và được chỉ định điều trị nội khoa hạ men gan sau 10 ngày đã xuất viện an toàn. Chúng tôi nghĩ rằng nguyên nhân gây tăng men gan ở bệnh nhân này là do trong quá trình phẫu thuật, gan trái của BN phì đại nhiều, chúng tôi sử dụng dụng cụ vén gan làm giảm lượng máu lưu thông trong tĩnh mạch gan trái về tĩnh mạch chủ dưới, trong quá trình phẫu thuật đã ghi nhận sự biến đổi màu sắc của gan trái. Đề hạn chế biến chứng này ảnh hưởng tới chức năng gan, các ca mổ sau chúng tôi đều dành thời gian nghỉ sau một khoảng dùng dụng cụ vén gan liên tục.

Về vấn đề tạo van chống trào ngược, các nghiên cứu đều cho thấy là cần thiết tạo van chống trào ngược để giảm nguy cơ trào ngược sau mổ vì cơ thắt dưới đã bị cắt [3, 11]. Hai phương pháp tạo van chống trào ngược thường được áp dụng nhiều nhất là Toupet và Dor. Hiện nay cũng chưa có nghiên cứu nào chứng minh rõ ràng là phương pháp nào có ưu điểm vượt trội hơn. Tuy nhiên, phương pháp Dor đơn giản hơn và đặc biệt hữu ích khi có thủng niêm mạc. Phẫu thuật Toupet có tác dụng làm tách 2 mép cơ, có thể làm giảm xơ hóa chỗ mở cơ và giảm tái phát nuốt nghẹn. Một nghiên cứu so sánh phương pháp Heller-Dor (36 BN) và Heller-Toupet (24 BN) cho thấy không có sự khác biệt về nuốt nghẹn ở thời điểm 6 và 12 tháng. Nhóm Heller-Dor có tỷ lệ pH bất thường 24 giờ là 42%, tỷ lệ pH bất thường 24 giờ của nhóm Heller-Toupet là 21% ($p=0,152$) [5]. Nhưng sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê do mẫu còn nhỏ và việc theo dõi, đánh giá chưa thật đầy đủ. Một nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng nhằm xác định van theo kiểu Dor hay Toupet có tác dụng chống trào ngược tốt hơn đã được thực hiện. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, nhóm tạo van kiểu Dor có tỷ lệ trào ngược thấp hơn nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa về kết quả sau mổ giữa 2 phương pháp [11]. Phương pháp tạo van 360° của Nissen hiện nay ít được áp dụng vì có nguy cơ gây hẹp thực quản do tạo van quá chặt [12].

Chúng tôi có xu hướng sử dụng phương pháp tạo van kiểu Toupet vì cho rằng phương pháp này làm mở rộng 2 mép mở cơ nên có thể tránh dính 2 mép để tránh nuốt nghẹn tái phát.

Tỷ lệ cải thiện chức năng, hết nghẹn của phẫu thuật đạt cao tới 90-93% [1, 2, 10]. Những trường hợp nuốt nghẹn sớm sau mổ là do mở cơ chưa hết. Kết quả của chúng tôi là 90,1% BN không

nghe hoặc nghe rất nhẹ, 9,9% BN có nuốt nghẹn mức độ trung bình với thức ăn đặc.

Kết quả sau mổ theo phương pháp Heller thường ổn định lâu dài. Trong nghiên cứu của P. Krishnamohan và cs (2014) [13] hồi cứu 500 BN với thời gian theo dõi trung bình là 77 tháng chỉ thấy có khoảng 7,1% xuất hiện nuốt khó sau mổ mức độ nặng. Nghiên cứu của chúng tôi với thời gian theo dõi dài nhất 66 tháng chỉ có 9,9% có nuốt nghẹn trở lại sau mổ mức độ trung bình.

5. Kết luận

Phẫu thuật nội soi điều trị bệnh cơ thắt tâm vị theo phương pháp Heller-Toupet là an toàn, ít tai biến và có kết quả theo dõi xa sau mổ tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.H. Pham, Q.H. Doan (2021), *Gastrointestinal Surgical Pathology*, Medical Publishing House, 732pp (in Vietnamese).
- [2] Z. Arora, P.N. Thota, M.R. Sanaka (2017) "Achalasia: Current therapeutic options", *Ther. Adv. Chronic. Dis.*, **8(6-7)**, pp.101-108, DOI: 10.1177/2040622317710010.
- [3] E. Ancona, M. Anselmino, G. Zaninotto, et al. (1995), "Esophageal achalasia: Laparoscopic versus conventional open Heller-Dor operation", *Am. J. Surg.*, **170(3)**, pp.265-270, DOI: 10.1016/s0002-9610(05)80012-1.
- [4] R. Rosati, U. Fumagalli, S. Bona, et al. (1998), "Evaluating results of laparoscopic surgery for esophageal achalasia", *Surg. Endosc.*, **12(3)**, pp.270-273, DOI: 10.1007/s004649900649.
- [5] A. Rawlings, N.J. Soper, B. Oelschlager, et al. (2012), "Laparoscopic Dor versus Toupet fundoplication following Heller myotomy for achalasia: Results of a multicenter, prospective, randomized-controlled trial", *Surg. Endosc.*, **26(1)**, pp.18-26, DOI: 10.1007/s00464-011-1822-y.
- [6] P.C. Wang, K.W. Sharp, M.D. Holzman, et al. (1998), "The outcome of laparoscopic Heller myotomy without antireflux procedure in patients with achalasia", *Am. Surg.*, **64(6)**, pp.515-520.
- [7] G. Ramacciato, F.A. D'Angelo, P. Aurello, et al. (2005), "Laparoscopic Heller myotomy with or without partial fundoplication: A matter of debate", *World J. Gastroenterol.*, **11(10)**, pp.1558-1561, DOI: 10.3748/wjg.v11.i10.1558.
- [8] D.H. Pham (1986), *Results of Treatment of Achalasia with Heller Surgery*, Scientific Research Project 1981-1983, Viet Duc Friendship Hospital (in Vietnamese).
- [9] T.S. Do (2014), "Laparoscopic surgery to treat achalasia: Experience over 10 years of follow-up at the Department of Digestive Surgery, Viet Duc Friendship Hospital", *Journal of Medical Research*, **89(4)**, pp.77-82 (in Vietnamese).
- [10] R. Salvador, L. Spadotto, G. Capovilla, et al. (2016), "Mucosal perforation during laparoscopic Heller myotomy has no influence on final treatment outcome (2016)", *Journal of Gastrointestinal Surgery*, **20(12)**, pp.1923-1930, DOI: 10.1007/s11605-016-3276-y.
- [11] W.O. Richards, A. Torquati, M.D. Holzman, et al. (2004), "Heller myotomy versus Heller myotomy with Dor fundoplication for achalasia: A prospective randomized double-blind clinical trial", *Ann. Surg.*, **240(3)**, pp.405-412, DOI: 10.1097/01.sla.0000136940.32255.51.
- [12] A. Cuttitta, A. Tancredi, A. Andriulli, et al. (2014), "Fundoplication after Heller myotomy: A retrospective comparison between Nissen and Dor", *Eurasian J. Med.*, **43(3)**, pp.133-140, DOI: 10.5152/eajm.2011.31.
- [13] P. Krishnamohan, M.S. Allen, K.R. Shen, et al. (2014), "Long-term outcome after laparoscopic myotomy for achalasia", *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **147(2)**, pp.730-737, DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.09.063.

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân viêm phế quản cấp tại Bệnh viện Đa khoa Y học Cổ truyền Hà Nội

Vũ Thị Ngoan¹, Ngô Quỳnh Hoa^{2*}

¹Trường Đại học Y Dược Hải Phòng, 72A Nguyễn Bình Khiêm, phường Đằng Giang, quận Ngô Quyền, TP Hải Phòng, Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/12/2022; ngày chuyển phản biện 28/12/2022; ngày nhận phản biện 19/1/2023; ngày chấp nhận đăng 24/1/2023

Tóm tắt:

Mục tiêu: Mô tả đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân (BN) viêm phế quản cấp điều trị nội trú tại Bệnh viện Đa khoa Y học Cổ truyền Hà Nội. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 60 BN viêm phế quản cấp từ tháng 4/2021 đến tháng 12/2021. BN đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu được tiến hành khám lâm sàng, lấy máu xét nghiệm và chụp X-quang ngực. **Kết quả:** Tuổi trung bình trong nghiên cứu là $66,78 \pm 18,33$; BN trên 70 tuổi chiếm 56,67%; tỷ lệ BN nam/nữ là 1/1,03; 21,70% BN có hút thuốc lá, thuốc lào. Ho, khạc đờm vàng, đặc dính khó khạc và rales phổi là các triệu chứng gặp ở tất cả các BN trong nghiên cứu này. Các triệu chứng sốt, khó thở, đau ngực khi ho gặp với tỷ lệ ít hơn, lần lượt là 63,30, 28,33 và 46,67%. Hầu hết BN có chất lưỡi đỏ, rêu lưỡi vàng, mạch phù sắc. Xét nghiệm máu ngoại vi cho thấy số lượng bạch cầu tăng, chủ yếu bạch cầu đa nhân trung tính. Xét nghiệm tốc độ máu lắng (VSS) và CRP (C-reactive protein) tăng cao với giá trị trung bình là $36,33 \pm 15,47$ mm và $25,49 \pm 16,08$ mg/l.

Từ khóa: bạch cầu đa nhân trung tính, viêm phế quản cấp, xét nghiệm máu, y học cổ truyền.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Viêm phế quản cấp là tình trạng viêm nhiễm cấp tính của niêm mạc phế quản ở người trước đó không có tổn thương. Nếu không bị bội nhiễm, bệnh có thể khỏi hoàn toàn không để lại di chứng, tuy nhiên nếu không được điều trị kịp thời có thể gây viêm phổi thứ phát [1]. Khoảng 5% người trưởng thành có một đợt viêm phế quản cấp mỗi năm. Tại Mỹ, viêm phế quản cấp là một trong mười bệnh phổ biến nhất được điều trị ngoại trú [2]. Bệnh ảnh hưởng đến khoảng 44/1000 người trên 16 tuổi mỗi năm ở Anh, với khoảng 82% các đợt xảy ra vào mùa thu hoặc mùa đông [3, 4].

Biểu hiện lâm sàng chính của viêm phế quản cấp là ho và khạc đờm. Nhiễm trùng được cho là tác nhân chính gây viêm phế quản cấp, trong đó virus chiếm 50-90% các trường hợp, điển hình là *Influenza A* và *B*, *Myxovirus*, các *Rhinovirus*, *Coronavirus*, virus đại thực bào đường hô hấp, *Adenovirus*, *Enterovirus* và một số chủng virus herpes. Một số ít gây ra do nhóm các vi khuẩn điển hình như *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* hoặc các vi khuẩn không điển hình như *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* [3, 5].

Viêm phế quản cấp đơn thuần ở người lớn có thể tự khỏi không cần điều trị nếu không bị bội nhiễm. Mục tiêu chính của điều trị là giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng, nhưng cải thiện chức năng và chất lượng cuộc sống cũng rất quan trọng. Các phương pháp điều trị thường được sử dụng như vận động trị liệu hô hấp, kháng sinh nếu có bội nhiễm hoặc do vi khuẩn, hạ sốt, giảm ho, long đờm, giãn phế quản... [6]. Các phương pháp này khá an toàn, tuy nhiên cũng có một số tác dụng không mong muốn như dị ứng, buồn nôn, tiêu chảy, đau đầu...

Theo y học cổ truyền, viêm phế quản cấp được mô tả trong các chứng “khái thấu”, “đàm ẩm”. Nguyên nhân do ngoại nhân gồm phong hàn, phong nhiệt và khí tảo, ngoài ra cũng liên quan chặt chẽ với các tạng phủ [7]. Với mỗi nguyên nhân gây bệnh sẽ có phương pháp điều trị dùng thuốc, không dùng thuốc phù hợp [8].

Để chuẩn bị đầy đủ các nguồn lực cả về nhân lực, thuốc và trang thiết bị trong điều trị BN viêm phế quản cấp tại bệnh viện, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: “Mô tả đặc điểm lâm sàng (y học hiện đại, y học cổ truyền) và cận lâm sàng của BN viêm phế quản cấp điều trị tại Bệnh viện Đa khoa Y học Cổ truyền Hà Nội”.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Là các BN điều trị nội trú tại Bệnh viện Đa khoa Y học Cổ truyền Hà Nội từ tháng 4/2021 đến tháng 12/2021. Tiêu chuẩn lựa chọn theo y học hiện đại: lâm sàng: có sốt hoặc không, ho <3 tuần, ho khan hoặc ho có đờm, nghe phổi có rales ngáy, rales rít hoặc rales ẩm. Cận lâm sàng: bạch cầu đa nhân trung tính $\geq 80\%$, VSS tăng, CRP > 10 mg/l, X-quang phổi bình thường hoặc thành phế quản dày. Đã được chẩn đoán loại trừ các bệnh đồng mắc trong đợt bệnh này như COVID 19, viêm phổi, hen phế quản, giãn phế quản bội nhiễm, dị vật đường thở, lao phổi, ung thư phế quản - phổi, đợt cấp suy tim xung huyết. Tiêu chuẩn lựa chọn theo y học cổ truyền: BN được chẩn đoán khái thấu thể phong nhiệt [8]. Tiêu chuẩn loại trừ: đã có bệnh lý hô hấp trước đó như lao phổi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, hen phế quản, giãn phế quản, viêm phế quản mạn tính, ung thư phổi, tràn dịch màng phổi. Suy gan, suy thận, suy tim nặng.

*Tác giả liên hệ: Email: ngoquynhhoa@gmail.com

Clinical and paraclinical characteristics of acute bronchitis patients at Hanoi Hospital of Traditional Medical

Thi Ngoan Vu¹, Quynh Hoa Ngo^{2*}

¹Hai Phong University of Medicine and Pharmacy, 72A Nguyen Binh Khiem, Dang Giang Ward, Ngo Quyen District, Hai Phong City, Vietnam

²Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 26 December 2022; revised 19 January 2023; accepted 24 January 2023

Abstract:

Objectives: To describe the clinical and paraclinical features of inpatients with acute bronchitis treated at Hanoi Hospital of Traditional Medical. **Subjects and methods:** A cross-sectional study was conducted on 60 acute bronchitis patients from April to December 2021. Eligible patients included in the study were carried out with clinical examination, blood test, and chest X-ray. **Results:** The mean age in the study was 66.78 ± 18.33 years old; the patients over 70 years old are 56.67%; the female/male ratio is 1/1.03; 21.70% of patients had smoking tobacco and pipe tobacco. Cough, thick sticky yellow sputum difficult to expectorate, and crackles were common symptoms in all patients in this study. Fever, dyspnea, and chest pain while coughing accounted for 63.30, 28.33, and 46.67%. Most of the patients had a red tongue, yellow tongue moss, and float fast pulse. Peripheral blood tests showed that increased amount of leukocytes, mainly in neutrophils. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein (CRP) increased with mean values of 36.33 ± 15.47 mm and 25.49 ± 16.08 mg/l.

Keywords: acute bronchitis, blood tests, neutrophils, traditional medicine.

Classification number: 3.2

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.

Cỡ mẫu: Nghiên cứu sử dụng phương pháp lấy mẫu thuận tiện, có chủ đích 60 BN được chẩn đoán viêm phế quản cấp theo tiêu chuẩn lựa chọn nêu trên.

Quy trình nghiên cứu: BN đáp ứng đủ tiêu chuẩn lựa chọn theo y học hiện đại, y học cổ truyền và tiêu chuẩn loại trừ được đưa vào nghiên cứu, thu thập các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá.

Các chỉ tiêu theo dõi, đánh giá: đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu: tuổi, giới, tiền sử (hút thuốc lá, thuốc lào và các bệnh kèm theo); đặc điểm lâm sàng bao gồm các triệu chứng: sốt, ho, khạc đờm, khó thở, đau ngực, rales phổi (rales rít, rales ngáy, rales ẩm); đặc điểm lâm sàng y học cổ truyền: chất lưỡi đỏ, rêu lưỡi

vàng mỏng; mạch phù sắc; đặc điểm cận lâm sàng: số lượng bạch cầu, tỷ lệ bạch cầu đa nhân trung tính, VS, CRP.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm chung

Kết quả bảng 1 cho thấy, trong số 60 BN nghiên cứu, nhóm tuổi ≥ 70 trở lên chiếm tỷ lệ cao nhất với 56,67%, không có BN nào dưới 30 tuổi. Độ tuổi trung bình là $66,78 \pm 18,33$, nhỏ nhất là 31 tuổi, lớn nhất là 88 tuổi. Tỷ lệ nam giới trong nghiên cứu là 51,67%, nữ giới là 48,33%. Tỷ lệ nam/nữ là 1/1,03. Tỷ lệ BN hút thuốc lá, thuốc lào là 21,67%.

Bảng 1. Các đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm	Số lượng (n=60)	Tỷ lệ (%)
Độ tuổi	18-29	0
	30-49	20,00
	50-69	23,33
	≥ 70	56,67
Tuổi trung bình (năm, $\bar{x} \pm SD$)	$66,78 \pm 18,33$	
Giới	Nam	51,67
	Nữ	48,33
Hút thuốc lá, thuốc lào	Có	21,67
	Không	78,33
Các bệnh kèm theo	Đái tháo đường	35,00
	Tăng huyết áp	8,33

3.2. Đặc điểm lâm sàng

Kết quả bảng 2 cho thấy, tất cả BN trong nghiên cứu được chẩn đoán viêm phế quản cấp đều có triệu chứng ho có đờm, khạc đờm vàng, đặc dính, khó khạc và rales phổi (100%). Các triệu chứng sốt, đau ngực khi ho, khó thở gặp ít hơn với tỷ lệ lần lượt là 63,33, 46,67 và 28,33%.

Bảng 2. Các đặc điểm lâm sàng của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm lâm sàng	Số lượng (n=60)	Tỷ lệ (%)
Sốt	38	63,33
Ho có đờm	60	100
Khạc đờm vàng, đặc dính, khó khạc	60	100
Đau ngực khi ho	28	46,67
Khó thở	17	28,33
Rales ngáy	21	35,00
Rales rít	13	21,67
Rales ẩm	26	43,33

3.3. Đặc điểm triệu chứng y học cổ truyền

Bảng 3. Các đặc điểm triệu chứng y học cổ truyền của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm triệu chứng y học cổ truyền	Số lượng (n=60)	Tỷ lệ (%)
Chất lưỡi đỏ	57	95
Rêu lưỡi vàng mỏng	57	95
Mạch phù sắc	55	91,67

Trong 60 BN nghiên cứu, có 95% BN có chất lưỡi đỏ, rêu lưỡi vàng mỏng và 91,67% có mạch phù sắc (bảng 3).

3.4. Đặc điểm cận lâm sàng

Kết quả bảng 4 cho thấy, số lượng bạch cầu và tỷ lệ bạch cầu đa nhân trung tính tăng cao gặp ở đa số các BN (55 và 53,33%). Tất cả các BN đều có VSS và CRP tăng cao với giá trị trung bình lần lượt là 36,33±15,47 mm và 25,49±16,08 mg/l.

Bảng 4. Đặc điểm cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu.

Chỉ số		Số lượng (n=60)	Tỷ lệ (%)
Số lượng bạch cầu (G/l)	Bình thường	27	45
	Tăng	33	55
	$\bar{x} \pm SD$	10,57±3,47	
Bạch cầu đa nhân trung tính (%)	Bình thường	28	53,33
	Tăng	32	53,33
	$\bar{x} \pm SD$	72,77±12,36	
VSS (mm)	Bình thường	0	
	Tăng	60	100
	$\bar{x} \pm SD$	36,33±15,47	
CRP (mg/l)	Bình thường	0	
	Tăng	60	100
	$\bar{x} \pm SD$	25,49±16,08	

4. Bàn luận

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, nhóm từ 70 tuổi trở lên chiếm tỷ lệ cao nhất (56,67%). Độ tuổi trung bình là 66,78±18,33, nhỏ nhất là 31 tuổi và lớn nhất là 88 tuổi. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của W.Y. Kim và cs (2020) [8] với tuổi trung bình trong nghiên cứu là 39±12,40; C. Llor và cs (2013) [9] với tuổi trung bình là 45,10±14,3; L. Zehui và cs (2017) [10] là 44,21±11,55 tuổi và L. Yu (2015) [11] với tuổi trung bình của BN là 36,2±11,34. Y. Yi và cs (2019) [12] nghiên cứu trên 84 BN viêm phế quản cấp cho kết quả nhóm tuổi phổ biến là 34-49, trung bình là 39,05±13,04 tuổi. Theo kết quả nghiên cứu của Y. Kangtai và cs (2021) [13], tuổi mắc viêm phế quản cấp từ là 21-73, trung bình là 49,61±10,27. Đây là đặc điểm chung của BN vào điều trị nội trú tại các bệnh viện y học cổ truyền, trong đó có Bệnh viện Đa khoa Y học Cổ truyền Hà Nội.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ BN nam và nữ gần như tương đương nhau (48,33 và 51,67%) với $p > 0,05$. So sánh với nghiên cứu của Y. Kangtai và cs (2021) [13] trên 102 BN nhận thấy tỷ lệ viêm phế quản cấp ở nam giới là 46,08% và nữ giới là 53,92%. Trong khi đó, Y. Yi và cs (2019) [12] nghiên cứu trên 84 BN viêm phế quản cấp, cho thấy tỷ lệ nam giới là 46,43%, nữ giới là 53,57%. T. Cheng và cs (2019) [14] nghiên cứu trên 78 BN nhận thấy tỷ lệ nam và nữ bị viêm phế quản cấp là 52,56 và 47,44%. Trong nghiên cứu của L. Yu (2015) [11] trên 60 BN viêm phế quản cấp, tỷ lệ nam và nữ đều là 50%. Y. Shanjun và cs (2014) [15] nghiên cứu trên 78 BN, tỷ lệ nam là 52,56%, tỷ lệ nữ là 47,44%. L. Zehui và cs (2017) [10] nghiên cứu trên 106 BN, tỷ lệ nam là 63,31%, tỷ lệ nữ là 36,79%. T. Xiaochun và cs (2017) [16] nghiên cứu trên 62 BN, tỷ lệ nam là 64,52%, tỷ lệ nữ là 35,48%. Như vậy, kết quả của chúng tôi có sự tương đồng với nghiên cứu của Y. Kangtai và cs (2021) [13], Y. Yi và cs (2019) [12], T. Cheng và cs (2019) [14], L. Yu (2015)

[11], Y. Shanjun và cs (2014) [15]. Nhưng lại có sự khác biệt với nghiên cứu của L. Zehui và cs (2017) [10], T. Xiaochun và cs (2017) [16]. Sự khác biệt này có thể do cách thức chọn mẫu và địa điểm nghiên cứu khác nhau.

Tỷ lệ BN hút thuốc lá, thuốc láo trong nghiên cứu của chúng tôi là 21,67%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của W.Y. Kim và cs (2020) [8] trên 246 BN (24,44%), nhưng lại thấp hơn của C. Llor và cs (2013) [9] khi nghiên cứu trên 416 BN viêm phế quản cấp có tỷ lệ BN hút thuốc lá là 52,64%. Khói thuốc lá chứa nhiều chất kích thích dạng khí hoặc hạt nhỏ. Các chất kích thích này làm thay đổi cấu trúc của niêm mạc phế quản dẫn đến tăng sinh các tuyến phế quản, tế bào tiết nhầy và làm mất các tế bào có lông chuyển. Những thay đổi này làm tăng tiết nhầy và giảm hiệu quả thanh lọc của hệ thống nhầy - lông chuyển ở niêm mạc phế quản. Nguy cơ viêm đường hô hấp như viêm phế quản, viêm phổi và bệnh cúm ở người hút thuốc cao hơn ở người không hút thuốc. Người hút thuốc không chỉ phải chịu đựng mắc bệnh tật nhiều hơn mà họ phải chịu bệnh tật ở mức độ nặng hơn [17, 18]. Hút thuốc làm suy yếu hệ miễn dịch của cơ thể, dẫn đến tỷ lệ mắc các bệnh hô hấp cấp tính ở người khỏe mạnh hút thuốc cao hơn người khỏe mạnh không hút thuốc 1,5-7 lần. Trong thuốc lá, hàm lượng nicotin lên tới 9%, cao hơn so với thuốc lá thông thường (1-3%) và khoảng 56 chất độc hại khác nhau. Khi vào phổi, các chất này cũng gây tổn thương phế quản phổi, gây viêm, tăng tiết đờm nhầy, giảm suy giảm hệ miễn dịch của cơ thể, làm gia tăng nguy cơ mắc các bệnh lý hô hấp, trong đó có viêm phế quản cấp [19].

Đối tượng nghiên cứu mắc các bệnh lý kèm theo là đái tháo đường chiếm tỷ lệ cao nhất (35%) và tăng huyết áp (8,33%). Trên BN đái tháo đường, lượng đường huyết tăng cao, đây là môi trường thuận lợi cho vi khuẩn phát triển. Đồng thời, đái tháo đường lâu năm có thể gây suy giảm chức năng của hệ miễn dịch. Chức năng của các tế bào đa nhân trung tính và đại thực bào như hóa ứng động, kết dính, thực bào... bị giảm sút rõ rệt. Mất khả năng diệt vi khuẩn nội bào của các gốc tự do, superoxide và hydrogen peroxide. Bên cạnh đó, các tế bào lympho cũng bị giảm sút về số lượng và chất lượng. Kháng thể do các tế bào miễn dịch tiết ra cũng bị suy giảm hoặc không còn khả năng kim, diệt vi khuẩn. Ngoài ra còn có vai trò của hệ mao mạch. Ở BN đái tháo đường, các mạch máu bị tổn thương nhiều ở lớp tế bào nội mạc, các tế bào hồng cầu giảm sự mềm dẻo và sự trao đổi oxy ở mô bị rối loạn khiến cho sức kháng khuẩn tại chỗ bị suy giảm. Cuối cùng, các bệnh lý phối hợp cũng góp phần làm giảm sức đề kháng của cơ thể và tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhập gây viêm phế quản. Theo y học cổ truyền, những BN đái tháo đường, “giai đoạn trung kỳ... có thể dẫn đến khí âm lưỡng hư, can thận âm hư, phế tỳ bất túc”, “giai đoạn cuối, âm tổn ảnh hưởng đến dương, làm cho âm dương khí huyết lưỡng hư”. Trên nền chính khí trong cơ thể suy giảm, ngũ tạng hư nhược, chủ yếu là thận, tỳ vị và phế. Phế rất dễ bị ngoại tà xâm nhập gây ra bệnh, dẫn tới tuyên phát thất thường, phế khí thượng nghịch, phát ra ho [7, 8]. Một số nhóm thuốc điều trị tăng huyết áp làm trầm trọng thêm tình trạng co thắt phế quản. Như thuốc chẹn beta giao cảm nên được thận trọng ở BN gắng sức gây co thắt phế quản. Thuốc ức chế men chuyển thường có tác dụng phụ gây ho khan rất khó chịu. Những BN tăng huyết áp có sức đề kháng suy giảm thì dễ dẫn đến tình trạng bội nhiễm đường hô hấp, trong đó có viêm phế quản cấp.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các triệu chứng ho có đờm, khạc đờm vàng, đặc dính, khó khạc và rales phổi (rales ngáy hoặc rales rít hoặc rales ẩm) gặp ở tất cả các BN. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu C. Llor và cs (2013) [9], L. Yu (2015) [11], T. Cheng và cs (2019) [14], Y. Yi và cs (2019) [12], W.Y. Kim và cs (2020) [8], Y. Kangtai và cs (2021) [13].

Ho là triệu chứng điển hình của viêm phế quản cấp, có thể ho khan hoặc ho có đờm. Trong một số trường hợp, ho có thể kéo dài nhiều tuần do tăng tính phản ứng của phế quản sau nhiễm trùng. Tất cả các BN đều có khạc đờm vàng, đặc dính, khó khạc; có thể do cách chọn đối tượng nghiên cứu đều là những BN đang có tình trạng nhiễm trùng. Đa số trong nghiên cứu gặp nhiều rales ngáy do tình trạng tăng xuất tiết các dịch nhầy dính vào thành các phế quản lớn làm hẹp lòng phế quản và rales ẩm do sự di động của các chất tiết ở trong các phế quản lớn, vừa và tiểu phế quản.

Các triệu chứng sốt, khó thở, đau ngực khi ho gặp với tỷ lệ ít hơn lần lượt là 63,33, 28,33 và 46,67%. So với nghiên cứu của C. Llor và cs (2013) [9], sốt chiếm 62,30%, khó thở là 33,65% và đau ngực khi ho là 82,45%. BN có sốt là vì trong đợt cấp, nguyên nhân chính là do nhiễm khuẩn đường hô hấp. Khó thở là kết quả của đau ngực hoặc cảm giác thắt ngực khi hít thở, không phải từ tình trạng thiếu oxy. Đau ngực do cơ vì BN ho liên tục. Chứng khó thở chủ quan là kết quả của đau ngực hoặc cảm giác thắt ngực khi hít thở, không phải từ tình trạng thiếu oxy.

Các triệu chứng về mạch và lưỡi của BN nghiên cứu đa số phù hợp với viêm phế quản cấp thể phong nhiệt (chất lưỡi đỏ và rêu lưỡi vàng mỏng chiếm 95%, mạch phù sắc là 91,67%).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tất cả các BN đều có tăng VSS và CRP. 2 chỉ số này được coi như yếu tố tiên lượng tình trạng bội nhiễm vi khuẩn ở BN viêm phế quản cấp. Những trường hợp bội nhiễm cũng có thể được định hướng phát hiện thông qua biến đổi của công thức bạch cầu, nhất là bạch cầu đa nhân trung tính. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Y. Kangtai và cs (2021) [13], số lượng bạch cầu trung tính chiếm $12,13 \pm 0,86$ G/l, tỷ lệ bạch cầu đa nhân trung tính trung bình là $85,32 \pm 6,41\%$, giá trị VSS trung bình là 29,45 mm và CRP trung bình là 32,74 mg/l [14].

5. Kết luận

Qua nghiên cứu trên 60 BN viêm phế quản cấp tại Bệnh viện Đa khoa Y học Cổ truyền Hà Nội, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Tuổi trung bình trong nghiên cứu là $66,78 \pm 18,33$, gặp nhiều nhất ở nhóm tuổi trên 70 tuổi. Tỷ lệ nam/nữ là 1/1,03. Có 21,70% BN có tiền sử hút thuốc lá, thuốc lào. Các bệnh kèm theo thường gặp là đái tháo đường (35%) và tăng huyết áp (8,30%).

- Ho, khạc đờm vàng, đặc dính khó khạc và rales phổi (rales ngáy, rales rít, rales ẩm) là các triệu chứng gặp ở tất cả các BN. Các triệu chứng gặp với tỷ lệ ít hơn là sốt, khó thở và đau ngực khi ho.

- Tất cả các BN đều có VSS và CRP tăng cao với giá trị trung bình lần lượt là $36,33 \pm 15,47$ mm và $25,49 \pm 16,08$ mg/l. Số lượng bạch cầu và tỷ lệ bạch cầu đa nhân trung tính tăng cao gặp ở đa số các BN (55 và 53,33%).

Tỷ lệ xuất hiện các chứng trạng theo y học cổ truyền ở đối tượng nghiên cứu là: 95% BN có chất lưỡi đỏ, rêu lưỡi vàng mỏng và 91,67% có mạch phù sắc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hanoi Medical University (2020), *Internal Medicine Volume I*, Medical Publishing House, 713pp (in Vietnamese).
- [2] A. Singh, A. Avula, E. Zahn (2021), *Acute Bronchitis*, StatPearls Publishing, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448067/>, accessed 9 November 2021.
- [3] R.R. Blush (2013), "Acute bronchitis: Evaluation and management", *Nurse Pract.*, **38**(10), pp.14-20, DOI:10.1097/01.NPR.0000434092.41971.
- [4] A.M. Hart (2014), "Evidence-based diagnosis and management of acute bronchitis", *Nurse Pract.*, **39**(9), pp.32-39, DOI: 10.1097/01.NPR.0000452978.99676.2b.
- [5] R.J. Mason, J.D. Ernst, T.E. King, et al. (2021), *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*, Elsevier, 7th Edition, 2272pp.
- [6] K.L. Tackett, A. Atkins (2012), "Evidence-based acute bronchitis therapy", *J. Pharm. Pract.*, **25**(6), pp.586-590, DOI: 10.1177/0897190012460826.
- [7] Hanoi Oriental Traditional Medicine Association (2014), *Pathogenesis and Treatment of Lung Organs*, Medical Publishing House, 327pp (in Vietnamese).
- [8] W.Y. Kim, M.J. Park, C.K. Rhee, et al. (2020), "HL301 versus Umckamin in the treatment of acute bronchitis: A phase III, randomised, controlled, double-blind, multicenter study", *Current Medical Research and Opinion*, **36**(3), pp.503-508, DOI: 10.1080/03007995.2019.1706044.
- [9] C. Llor, A. Moragas, C. Bayona, et al. (2013), "Efficacy of anti-inflammatory or antibiotic treatment in patients with non-complicated acute bronchitis and discoloured sputum: Randomised placebo controlled trial", *BMJ*, **347**, DOI: 10.1136/bmj.f5762.
- [10] L. Zehui, L. Jing, L. Xiao, et al. (2017), "Clinical observation on the treatment of acute bronchitis (wind-heat attacking the lung syndrome) with Jiebiao Zhike Yin", *Chinese Traditional Chinese Medicine Emergency*, **26**(7), pp.1283-1285 (in Chinese).
- [11] L. Yu (2015), *Observation on The Efficacy of Maxing Shigan Decoction Combined with Zhisou Powder in The Treatment of Acute Bronchitis (Wind-Heat Lung Syndrome)*, Master's Degree Thesis, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (in Chinese).
- [12] Y. Yi, L. Beichen, G. Lei, et al. (2019), "Observation on the efficacy of Sangbei decoction in the treatment of 42 cases of acute tracheobronchitis with wind-heat affecting the lung syndrome", *Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine*, **40**(5), pp.45-47, DOI: 10.16254/j.cnki.53-1120/r.2019.05.017 (in Chinese).
- [13] Y. Kangtai, W. Ling (2021), "Clinical observation of Sangju Zhisou decoction in the treatment of acute tracheobronchitis with wind-heat attacking the lung syndrome", *Medical and Health Technology*, **28**(5), pp.784-785 (in Chinese).
- [14] T. Cheng, X. Jin, L. Hongyan, et al. (2019), "Clinical observation on the treatment of acute tracheo-bronchitis with wind-heat attacking the lung syndrome with Kangdu Zhisou recipe", *Chinese Ethnic Folk Medicine*, **28**(4), pp.78-80 (in Chinese).
- [15] Y. Shanjun, W. Yue (2014), "Modified maxing Ganshi decoction in the treatment of acute tracheobronchitis", *Everyone's Health (Academic Edition)*, **8**(15), pp.218-219 (in Chinese).
- [16] T. Xiaochun, H. Ning (2017), "Clinical observation on Shufeng Jiedu capsule in the treatment of acute tracheobronchitis (wind-heat attacking the lung syndrome)", *Chinese Traditional Chinese Medicine Emergency*, **26**(8), pp.1467-1469 (in Chinese).
- [17] L. Jayes, P.L. Haslam, C.G. Gratzou, et al. (2016), "SmokeHaz: Systematic reviews and meta-analyses of the effects of smoking on respiratory health", *Chest*, **150**(1), pp.164-179, DOI: 10.1016/j.chest.2016.03.060.
- [18] T. Ferkol, D. Schraufnagel (2014), "The global burden of respiratory disease", *Annals A. T. S.*, **11**(3), pp.404-406, DOI: 10.1513/AnnalsATS.201311-405PS.
- [19] R.B. Klekotka, E. Mizgala, W. Król (2015), "The etiology of lower respiratory tract infections in people with diabetes", *Pneumonol. Alergol. Pol.*, **83**(5), pp.401-408, DOI: 10.5603/PiAP.2015.0065.

Xác định thành phần loài giun móc (*Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*) và giun mỏ *Necator americanus* gây bệnh cho người tại tỉnh Tây Ninh bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Lê Đức Vinh, Trần Trinh Vương, Nguyễn Kim Thạch*

Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/3/2023; ngày chuyển phản biện 24/3/2023; ngày nhận phản biện 18/4/2023; ngày chấp nhận đăng 21/4/2023

Tóm tắt:

Nhiễm giun móc/mỏ ở người Việt Nam là bệnh khá phổ biến. Tác nhân gây bệnh là *Necator americanus* và *Ancylostoma duodenale*. Một số nghiên cứu gần đây đã xác định thêm một tác nhân mới gây bệnh trên người - giun móc *Ancylostoma ceylanicum*, vốn thường ký sinh ở chó. Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật PCR lồng (nested PCR) và giải trình tự gen nhằm xác định sự hiện diện và thành phần của các loài giun móc *A. duodenale*, *A. ceylanicum* và giun mỏ *N. americanus*. Các mẫu phân người dân nghi nhiễm sống tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh được tiến hành nuôi cấy, thu thập ấu trùng và xác định sơ bộ bằng hình thái học. 65 mẫu DNA được tách chiết từ các mẫu ấu trùng dùng cho các kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả cho thấy, 44 mẫu đơn nhiễm *N. americanus* (67,7%), 11 mẫu *A. ceylanicum* (16,9%) và 1 mẫu *A. duodenale* (1,6%). Các trường hợp đồng nhiễm (13,8%) là *A. ceylanicum* và *N. americanus*. *N. americanus* có nguồn gốc gần với loài được công bố tại Malaysia, *A. ceylanicum* có nguồn gốc gần với loài đã công bố tại Thái Lan. Kết luận, tại xã Thạnh Bình, loài mới *A. ceylanicum* phổ biến hơn loài truyền thống *A. duodenale*, chiếm 95,2 so với 4,8%.

Từ khóa: *Ancylostoma ceylanicum*, giải trình tự gen, *Necator americanus*, PCR lồng, phân người, phương pháp Sasa.

Chỉ số phân loại: 3.3

1. Mở đầu

Nhiều nghiên cứu chỉ ra nhiễm giun móc/mỏ ở người tại các tỉnh miền Đông Nam Bộ của Việt Nam chiếm tỷ lệ còn cao, dù rằng cả tỷ lệ và cường độ nhiễm đang giảm dần do áp lực của thuốc điều trị và các yếu tố xã hội khác tác động. Ở người Việt Nam, giun móc gây bệnh là *A. duodenale*, chiếm tỷ lệ thấp hơn so với loài giun mỏ *N. americanus*. Gần đây, một báo cáo đã tìm thấy dấu vết của loài giun móc *A. ceylanicum* bằng kỹ thuật phân tử và kết luận loài này có tỷ lệ nhiễm thấp.

A. ceylanicum và *A. duodenale* được gọi chung là giun móc và do vòng đời phát triển khá giống với loài giun mỏ *N. americanus* nên 3 loài giun này thường được ghép chung với nhau bằng danh từ giun móc/mỏ [1-3]. Chẩn đoán nhiễm bệnh thường dựa vào hình thể trứng và ấu trùng của 3 loài giun từ bệnh phẩm phân. Điểm khác biệt về hình thể học giữa các loài là rất nhỏ, nên việc định danh còn nhiều điểm chưa rõ ràng. Vì vậy, hạn chế của chẩn đoán hình thể học khi áp dụng thực tế là chỉ dừng lại ở mức độ chẩn đoán chung chung, đó là có hay không nhiễm giun móc/mỏ.

Với sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử, chẩn đoán định loài đã chính xác và toàn diện. Kỹ thuật phân tử, đặc biệt là giải trình tự gen đã khắc phục được những nhược điểm tồn tại của các kỹ thuật chẩn đoán truyền thống. Ngoài ra, kỹ thuật này có khả năng xác định loài giun móc *A. ceylanicum* gây bệnh ở người Việt Nam có nguồn gốc từ động vật [4, 5]. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định chính xác thành phần từng loài giun móc, giun mỏ gây bệnh ở người dân bị nhiễm cư ngụ tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh. Từ đó nghiên cứu góp phần làm sáng tỏ hiện trạng nhiễm loài giun mỏ hay giun móc nào là phổ biến ở người Việt Nam.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyengkimthach@pnt.edu.vn

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Từ tháng 2/2022 đến 8/2022 tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh, 65 người dân sống tại đây được xác định nhiễm giun thông qua phương pháp nuôi cấy mẫu phân phối hợp với kỹ thuật soi trực tiếp. Ấu trùng giun móc/mỏ được thu thập từ các mẫu phân trên được sử dụng cho nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Hóa chất và môi trường cấy phân bằng phương pháp Sasa sử dụng trong nghiên cứu này được sản xuất từ Hãng Merck (Đức). Kít tách chiết DNA của Hãng ABT Biological Solution Company Limited, Việt Nam (Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam). Các hoá chất thực hiện kỹ thuật PCR của Hãng Promega, Mỹ. Trình tự các đoạn mồi của các gen được tổng hợp bởi Công ty IDT, Singapore.

Địa điểm nghiên cứu là Phòng Thí nghiệm của Bộ môn Ký sinh Y học, Khoa Khoa học Cơ bản - Y học Cơ sở, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch và giải trình tự gen tại Công ty First BASE Laboratories-Axil Scientific, Singapore.

Xác định hình thể ấu trùng và trứng của giun móc/mỏ bằng soi trực tiếp dưới kính hiển vi: Xét nghiệm tầm soát nhiễm giun cho người dân tình nguyện bằng phương pháp nuôi cấy Sasa và soi trực tiếp dưới kính hiển vi xác định được các trường hợp dương tính người dân nhiễm bệnh giun móc/mỏ. Tiến hành thu thập tất cả ấu trùng giun trong từng mẫu cấy bằng kỹ thuật ly tâm lắng cạn với tốc độ 3.000 vòng trong 5 phút. Phần cặn lắng sau ly tâm được soi dưới kính hiển vi kiểm tra sự hiện diện ấu trùng giai đoạn I, II

Determination of the composition of hookworm species (*Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*) and *Necator americanus* in humans at community in Tay Ninh province by biomolecular technique

Duc Vinh Le, Trinh Vuong Tran, Kim Thach Nguyen*

Pham Ngoc Thach University of Medicine,
2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City,
Vietnam

Received 22 March 2023; revised 18 April 2023; accepted 21 April 2023

Abstract:

Hookworm infections are common in Vietnam and are caused by two known pathogens: *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. Recent studies have identified a new hookworm species - *Ancylostoma ceylanicum*, which typically parasitises in dogs. To determine the prevalence of these three hookworm species: *A. duodenale*, *A. ceylanicum*, and *N. americanus*, nested PCR and gene sequencing were employed in fecal samples from suspected individuals residing in Thanh Binh commune, Tan Bien district, Tay Ninh province. Larvae were collected and identified by morphology before 65 DNA samples were extracted and analysed using molecular biology techniques. Results showed that 67.7% (44/65) of the samples were infected with *N. americanus*, while 16.9% (11/65) and 1.6% (1/65) were infected with *A. ceylanicum* and *A. duodenale*, respectively. Co-infection was present in 13.8% of cases, with *A. ceylanicum* and *N. americanus* being the most common combination. The origin of the *N. americanus* species identified was found to be closely related to that reported in Malaysia, while *A. ceylanicum* was more closely related to the species reported in Thailand. In conclusion, the study found that the new hookworm species *A. ceylanicum* was more prevalent than the traditional species *A. duodenale* in Thanh Binh commune (95.2 vs 4.8% of hookworm infections).

Keywords: *Ancylostoma ceylanicum*, DNA sequencing, human faeces, *Necator americanus*, nested PCR, Sasa method.

Classification number: 3.3

của giun. Cố định ấu trùng giun bằng dung dịch cồn 70°. Với mỗi trường hợp bệnh nhân bị nhiễm, chọn ngẫu nhiên 5 ấu trùng giun bằng micropipette dưới kính hiển vi soi nổi SZ51, cho vào 1 ống nghiệm trữ tạo thành mẫu nguồn cho kỹ thuật phân tử.

Tách chiết DNA: Mỗi mẫu cấy chứa 5-10 ấu trùng giun được tiến hành tách chiết DNA bằng kit tách chiết Top Pure genomic DNA extraction kit (Hãng ABT, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam). Sau khi tách chiết, DNA mẫu nghiên cứu này được lưu trữ ở -70°C. DNA được áp dụng làm khuôn tổng hợp cho 2 bước của kỹ thuật PCR lồng gồm [6]:

Bước 1: Nhân lượng đoạn DNA đích có kích thước đã xác định bằng mỗi NC1 F và mỗi NC2 R đặc hiệu cho giống *Ancylostoma* spp. và loài *N. americanus* của vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2. Trong thể tích 20 µl phản ứng có thành phần gồm: 4 µl đệm Taq (10X), 4,8 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 4 µl DNA mẫu pha loãng (20 ng), 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM) và 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), nước khử ion bổ sung cho đủ thể tích 20 µl theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ.

Chu kỳ nhiệt của phản ứng như sau: bước 1 (94°C, 3 phút); bước 2 (94°C, 30 giây), (55°C, 30 giây) và (72°C, 30 giây), lặp lại 30 chu kỳ; bước 3 (72°C, 7 phút). Bảo quản sản phẩm ở nhiệt độ 4°C.

Sản phẩm sau PCR được thực hiện điện di trên thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide để xác định sự hiện diện của NDA đích. Mẫu PCR nhân lượng thành công ở bước 1 sẽ áp dụng để thực hiện PCR nhân lượng bước 2.

Bước 2: Nhân lượng đoạn DNA đích bằng mỗi NAF, mỗi AD1 F và mỗi NC2 R đặc hiệu cho giống *Ancylostoma* spp. và *N. americanus* của vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2 (bảng 1). Thành phần phản ứng trong thể tích 50 µl gồm: 8 µl đệm Taq (10X), 5,6 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 2 µl sản phẩm PCR nhân lượng bước 1, 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl), nước khử ion bổ sung đủ thể tích 50 µl.

Bảng 1. Các đoạn mỗi vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2 và *cox1*.

Tên mỗi	Trình tự mỗi	PCR nhân lượng đoạn DNA	Tài liệu tham khảo
NC1 F	5'-ACG TCT GGT TCA GGG TTC TT-3'	<i>Ancylostoma</i> spp.: 310 bp	[7, 8]
NC2 R	5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'	<i>N. americanus</i> : 420 bp	
NA F	5'-ATG TGC ACG TTA TTC ACT-3'	<i>N. americanus</i> : 250 bp	[9]
AD1 F	5'-CGA CTT TAG AAC GTT TCG GC-3'	<i>Ancylostoma</i> spp.: 130 bp	
NC2 R	5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'		[5]
AceyCOXI F	5'-GCT TTT GGT ATT GTA AGA CA-3'	<i>A. duodenale</i> và <i>A. ceylanicum</i> : 377 bp	[10]
AceyCOXI R	5'-CTA ACA ACA TAA TAA GTA TCA TG-3'		

Chu kỳ nhiệt của phản ứng như sau: bước 1 (94°C, 5 phút); bước 2 (94°C, 1 phút), (55°C, 1 phút) và (72°C, 1 phút) lặp lại 35 chu kỳ; bước 3 (72°C, 7 phút). Bảo quản mẫu ở điều kiện 4°C. Sản phẩm sau PCR bước 2 được điện di trên thạch agarose 1,5%; nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide để xác định kết quả.

Xác định loài giun móc *A. duodenale*, *A. ceylanicum* bằng giải trình tự gen ty thể vùng *cox1*: Nhân lượng đoạn DNA đích bằng mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu cho giống *Ancylostoma* spp. thuộc gen ty thể vùng *cox1* (bảng 1). Trong thể tích 50 µl phản ứng có thành phần gồm: 8 µl đệm Taq (10X), 5,6 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl sản phẩm PCR bước 1, 1,5 µl mỗi loại dNTP's (10 mM), 0,5 µl mỗi loại mỗi đặc hiệu, 0,2 µl enzyme Taq polymerase (5 U/µl). Bổ sung nước khử ion đủ thể tích 50 µl.

Các bước được thực hiện theo chu kỳ nhiệt như sau: bước 1 (94°C, 5 phút); bước 2 (94°C, 30 giây), (58°C, 30 giây), (72°C, 30 giây) và lặp lại 50 chu kỳ; bước 3 (72°C, 7 phút). Bước cuối là bảo quản mẫu ở điều kiện 4°C. Sản phẩm sau PCR được điện di trên

thạch agarose 1,5%, nhuộm bản thạch trong dung dịch Ethidium bromide nhằm xác định sự hiện diện của đoạn gen cần giải trình tự.

Tinh sạch sản phẩm PCR của *Ancylostoma* spp. 600 bp bằng bộ kit Wizard® SV Gel theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ và được tiến hành giải trình tự.

Xác định loài *N. americanus* bằng giải trình tự gen ty thể vùng *cox1*: Sản phẩm PCR của *N. americanus* 420 bp được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch Wizard® SV Gel theo hướng dẫn của Hãng Promega, Mỹ và được tiến hành giải trình tự tại First BASE Laboratories-Axil Scientific.

2.3. Phân tích và xử lý số liệu

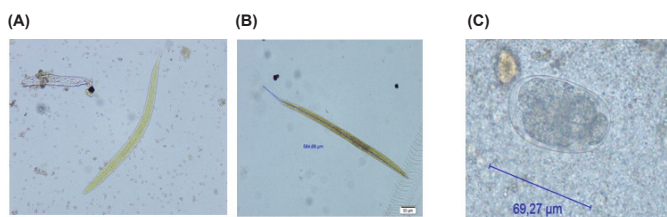
Trình tự gen thu được sau giải trình tự được xử lý bằng phần mềm Bioedit 7.2.6 (Tom Hall, 2017) và MEGA X (Temura, 2013). So sánh trình tự các mẫu trong nghiên cứu với trình tự *Ancylostoma* spp. và *N. americanus* đã được công bố trên Ngân hàng gen NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) để dựng cây phân loài mối quan hệ di truyền.

Kết quả giải trình tự được đối chiếu với kết quả PCR lồng. Số liệu được nhập vào phần mềm Excel V16.0 và xử lý.

3. Kết quả

3.1. Chẩn đoán hình thể ấu trùng, trứng của loài giun móc/mỏ

Trong quần thể mẫu thu thập tại thực địa, nghiên cứu xác định được 85 trường hợp nhiễm giun móc/mỏ khi phối 2 kỹ thuật chẩn đoán dựa trên hình thể. Trong đó, 69 mẫu đều tìm thấy ấu trùng giai đoạn I, II của giun dài 200-650 μ m và rất khó phân biệt loài giữa giun móc *Ancylostoma* spp. với giun mỏ *N. americanus* (hình 1A và 1B). 48 mẫu dương tính tìm thấy trứng giun có hình bầu dục, vỏ mỏng, kích thước khoảng 60-70x30-40 μ m và có 4-16 phôi bào (hình 1C). Sự phối hợp giữa 2 kỹ thuật giúp chẩn đoán chính xác số ca nhiễm giun móc/mỏ và chẩn đoán phân biệt được với loài giun lươn gây bệnh ở người.



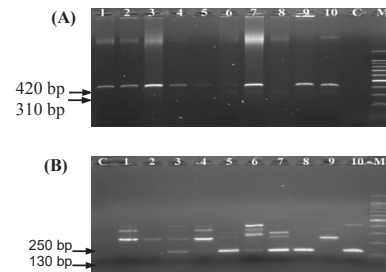
Hình 1. Ấu trùng và trứng của giun móc/mỏ. (A) Ấu trùng giai đoạn I; **(B)** Ấu trùng giai đoạn II; **(C)** Trứng.

Khi nuôi cấy chỉ có 69 trường hợp dương tính và thu được ấu trùng, nhưng khi đưa vào quy trình gạn lọc và tách chiết DNA thì chỉ có 65 mẫu đạt được nồng độ DNA theo quy định của nhà sản xuất, tỷ lệ là 94,2% (65/69). Như vậy, mục tiêu xác định thành phần loài được xác định trên mẫu nghiên cứu gồm n=65 mẫu.

3.2. Kết quả PCR lồng định loài *Ancylostoma* spp. và *N. americanus*

65 mẫu DNA đã tách chiết từ ấu trùng được sử dụng làm khuôn tổng hợp trong phản ứng PCR lồng 2 bước xác định giống

Ancylostoma spp. và *N. americanus* đặc hiệu trên vùng trình tự gen 28S rRNA-ITS2.



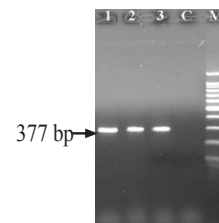
Hình 2. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện gen vùng trình tự 28S rRNA-ITS2 với 10 mẫu DNA *Ancylostoma* spp. và *N. americanus* bằng điện di agarose 1,5%. (A): PCR bước 1; (B): PCR bước 2; M: thang DNA 100 bp; giếng 1-10: 10 mẫu ấu trùng và giếng C: chứng H₂O.

Đối chiếu kết quả PCR lồng ở cả 2 bước, có 44 mẫu (67,7%) được xác định nhiễm *N. americanus* như tại vị trí giếng thứ 1, 2, 4, 9 của hình 2A và 2B; 12 mẫu (18,5%) nhiễm *Ancylostoma* spp. như tại vị trí giếng thứ 8 của hình 2A và 2B; 9 mẫu (13,8%) đồng nhiễm cả 2 loài như tại vị trí giếng thứ 3, 5, 6, 7, 10 của hình 2A và 2B (bảng 2).

Bảng 2. Thành phần loài *N. americanus* và giống *Ancylostoma* spp. xác định bằng kỹ thuật PCR tổ hợp.

Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>N. americanus</i>	44	67,7
<i>Ancylostoma</i> spp.	12	18,5
Đồng nhiễm <i>N. americanus</i> và <i>Ancylostoma</i> spp.	9	13,8
Tổng	65	100

Sau khi thực hiện tổng hợp nhân lượng PCR, tiến hành giải trình tự gen ty thể vùng *cox1* của 12 mẫu ấu trùng nhóm *Ancylostoma* spp. và nhóm đồng nhiễm cả 2 loài (9 mẫu) để xác định từng thành phần loài. Kết quả giải trình tự so sánh bằng phần mềm Bio-edit v.7.2.6 và MEGA X cho thấy, các trình tự nucleotide *cox1* giống nhau ở cả 21 ấu trùng đặc hiệu vùng gen *cox1* ở thí nghiệm trên (hình 3).



Hình 3. Kết quả khảo sát mức độ biểu hiện trình tự gen ty thể vùng *cox1* ở 3 mẫu DNA ấu trùng nhóm *Ancylostoma* spp. và nhóm đồng nhiễm cả 2 loài bằng điện di agarose 1.5%. M: thang DNA 100 bp; giếng 1: mẫu ấu trùng *Ancylostoma* spp.; giếng 2-3: mẫu ấu trùng đồng nhiễm cả 2 loài; giếng C: chứng H₂O.

3.3. Kết quả giải trình tự gen ty thể vùng *cox1*

Tiến hành truy cập Ngân hàng gen NCBI tìm kiếm những chuỗi tương đồng giữa mẫu nghiên cứu và các trình tự đã được

đăng ký trước đó. Kết quả cho thấy, nhóm 12 mẫu ấu trùng *Ancylostoma* spp. đơn nhiễm có 11 mẫu là *A. ceylanicum* và 1 mẫu là *A. duodenale* (bảng 3). Nhóm 9 mẫu ấu trùng đồng nhiễm cả 2 loài tất cả là *A. ceylanicum* (bảng 4).

Bảng 3. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen *cox1* của nhóm 12 mẫu *Ancylostoma* spp. và thể giới.

Mã số gen của NCBI	Số mẫu (n=12)	Tỷ lệ (%)	Hệ số tương đồng (%)
F896602.1 <i>A. ceylanicum</i> (Thái Lan)	6/11	54,5	87,5-98,28
MW549613.1 <i>A. ceylanicum</i> (Việt Nam)	2/11	18,2	97,76; 99,13
KC 274470.1 <i>A. ceylanicum</i> (Malaysia)	2/11	18,2	84,90; 85,38
Q 452515.1 <i>A. ceylanicum</i> (Malaysia)	1/11	9,1	87,46
AJ407954.1 <i>A. duodenale</i> (Úc)	1		80,83

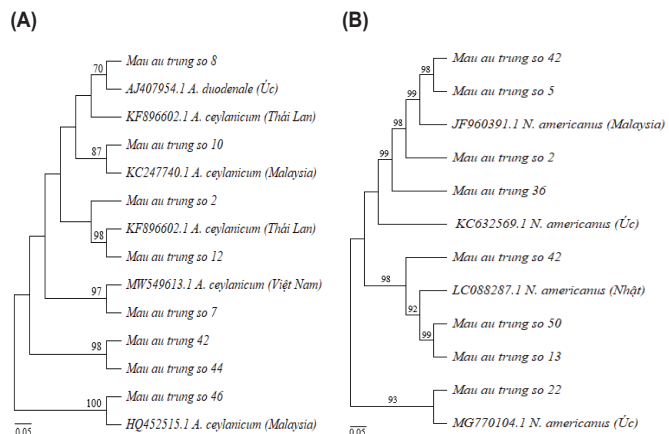
Bảng 4. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen *cox1* của nhóm 9 mẫu đồng nhiễm cả 2 loài và trên thể giới.

Mã số gen của NCBI	Số mẫu (n=9)	Tỷ lệ (%)	Hệ số tương đồng (%)
HQ 452515.1 <i>A. ceylanicum</i> (Malaysia)	6	66,7	95,1-100
KF896602.1 <i>A. ceylanicum</i> (Thái Lan)	2	22,2	87,5, 98,28
MW549613.1 <i>A. ceylanicum</i> (Việt Nam)	1	11,1	97,76

Bảng 5. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa gen *cox1* của nhóm 44 mẫu *N. americanus* và trên thể giới.

Mã số gen của Ngân hàng gen thể giới	Số mẫu (n=44)	Tỷ lệ (%)	Hệ số tương đồng (%)
JF960391.1 <i>N. americanus</i> (Malaysia)	38	86,4	92,18-100
MG770104.1 <i>N. americanus</i> (Úc)	3	6,8	92,7-98
KC632569.1 <i>N. americanus</i> (Úc)	2	4,5	99,69, 100
LC088287.1 <i>N. americanus</i> (Nhật)	1	2,3	97,87

Kết quả bảng 5 cho thấy, 86,4% mẫu ấu trùng *N. americanus* thu được tại huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh có quan hệ gần với loài *N. americanus* được công bố tại Malaysia với mức tương đồng cao từ 92,18 đến 100%, tỷ lệ tương đồng với các mã gen từ loài công bố ở Úc và Nhật Bản thấp (11,3 và 2,3%). Giun mò *N. americanus* có mức tương đồng rất lớn với thể giới (92,18-100%).



Hình 4. Cây phát sinh loài xây dựng trên cơ sở so sánh trình tự gen ty thể vùng *cox1* 377 bp của các mẫu ấu trùng *Ancylostoma* spp. và *N. americanus* với Ngân hàng gen trên BLAST. (A) Nhóm mẫu ấu trùng *A. ceylanicum*; (B) Nhóm mẫu ấu trùng *N. americanus*.

Các mẫu ấu trùng *A. ceylanicum* thu được tại huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh (hình 4A), có quan hệ gần với loài *A. ceylanicum* được công bố tại Malaysia và Thái Lan. *N. americanus* có quan hệ gần với loài của Malaysia (hình 4B).

Bảng 6. Thành phần loài giun móc/mỏ được xác định bằng phối hợp kỹ thuật PCR lồng và giải trình tự.

Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>N. americanus</i>	44	67,7
<i>A. duodenale</i>	1	1,6
<i>A. ceylanicum</i>	11	16,9
<i>N. americanus</i> và <i>A. duodenale</i>	0	0
<i>N. americanus</i> và <i>A. ceylanicum</i>	9	13,8
Tổng	65	100

Kết quả bảng 6 cho thấy, giun mò *N. americanus* chiếm tỷ lệ cao nhất (67,7%), kế đến là giun móc *A. ceylanicum* (16,9%).

4. Bàn luận

Nghiên cứu đã thu thập được 85 mẫu phân của người dân tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh có kết quả dương tính. Chẩn đoán về hình thể cho thấy tất cả ấu trùng, trứng được định danh là của giun móc *Ancylostoma* spp. hoặc giun mò *N. americanus*. Dù vậy, số mẫu nghiên cứu cho kỹ thuật phân tử có nguồn gốc từ ấu trùng là 69 và tổng thể mẫu DNA là 65, đủ lớn để đáp ứng yêu cầu của nghiên cứu thực nghiệm.

Kết quả bảng 2 cho thấy, 65 mẫu DNA tách chiết từ nguồn ấu trùng áp dụng với kỹ thuật PCR lồng có kết quả dương tính là 100%, tương đồng với chẩn đoán hình thể học. Với kết quả này cho thấy, bước đầu kỹ thuật PCR lồng áp dụng có độ nhạy tốt khi áp dụng đúng quy trình. Tỷ lệ nhiễm *N. americanus* có 44/65 mẫu (67,7%), chiếm phần lớn các ca nhiễm dương tính của mẫu nghiên cứu. Kết quả chứng minh khả năng phát hiện giun mò *N. americanus* của kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu này tốt hơn so với kỹ thuật chẩn đoán hình thể truyền thống của các M. Papaïakovou và cs (2017) [11] nghiên cứu tại Ghana và T.H. Hoang và cs (2019) [12] nghiên cứu tại huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh.

Nhiễm giống giun móc *Ancylostoma* spp. có 12/65 mẫu (18,5%) và đồng nhiễm có 9/65 mẫu (13,8%). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của thể giới trước đây, nhấn mạnh *N. americanus* là loài giun mò nhiễm bệnh chủ yếu ở người [6, 8]. Khi nghiên cứu nhiễm giun móc và giun mò, tác nhân chính thường được nghĩ đến là *N. americanus* mà bỏ qua tác nhân *Ancylostoma* spp., nhất là ở các quốc gia thuộc vùng dịch tễ của giun là Đông Nam Á. Nghiên cứu này ghi nhận tỷ lệ đồng nhiễm cả 2 loài giun móc và mò cao (13,8%) càng cho thấy ưu điểm của kỹ thuật PCR lồng [4, 11].

Bảng 3 và 4 phân tích phá hệ trình tự gen ty thể vùng *cox1* 377 bp trong Ngân hàng gen BLAST của 12 mẫu ấu trùng trong nhóm *Ancylostoma* spp. và nhóm 9 mẫu có đồng nhiễm với *N. americanus*, kết quả chỉ xác định có 1 mẫu là *A. duodenale* (1,6%). Tất cả 20 mẫu là *A. ceylanicum* (16,9 và 13,8%), có mức độ tương đồng cao với vùng trình tự gen *cox1* (80,83-99,13%) đã được thể

giới công bố. Do đó, nghiên cứu này báo cáo được sự hiện diện của *A. ceylanicum* ở Việt Nam hiện nay, phổ biến hơn loài *A. duodenale*, trái ngược với kết quả của T.L. Luu và cs (2019) [13]. Trong nhiều năm trước đây, loài giun móc được ghi nhận trong y văn Việt Nam là *A. duodenale*, vốn dĩ mô tả từ hình thái học đơn thuần. Sự phát triển của kỹ thuật sinh học phân tử đã giúp cho các nghiên cứu viên có điều kiện xác định chính xác loài và nguồn gốc phân bố của giun móc. Kết quả phát hiện trái ngược với y văn của nghiên cứu này là điểm mới, chứng tỏ sự phân bố của *A. duodenale* tại Việt Nam đã thay đổi theo hướng không còn phổ biến như trước [1, 3]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu tại Campuchia và Thái Lan cho thấy, *A. ceylanicum* hiện nay chính là loài phổ biến, hoàn toàn tương đồng với kết quả trong nghiên cứu này. Với sự tiếp giáp về biên giới địa lý giữa 3 nước Việt Nam, Thái Lan và Campuchia đã cho thấy sự di cư của mầm bệnh là xu thế tất yếu [10, 11].

Kết quả tại bảng 3 và 4 cũng đồng cho thấy, sự hiện diện của *A. ceylanicum* có mức tương đồng cao với các chủng đã được đăng ký tại Thái Lan và Malaysia và sự hiện diện của loài *A. duodenale* có mức độ tương đồng thấp hơn với chủng giun móc do Úc đăng ký. Điều này đặt ra hướng phát triển cho nghiên cứu là việc đăng ký mã gen trên Ngân hàng gen.

Loài giun móc tại xã Thạnh Bình phù hợp cao với loài giun *N. americanus* của Malaysia (mã gen JF960391.1) và chiếm tỷ lệ 86,4%, tiếp tới là Úc với 2 mã gen (mã gen MG770104.1 và KC632569.1) với tỷ lệ 6,8 và 4,5% (bảng 5); 1 trường hợp có nguồn gốc từ Nhật Bản (mã gen LC088287.1). Kết quả này tương đồng với báo cáo của B.K. Hung và cs (2016) [14] với tỷ lệ lớn giun móc nghiên cứu tại Việt Nam có nguồn gốc từ Malaysia. Bên cạnh sự tương đồng về nguồn gốc, kết quả nghiên cứu còn tương đồng với các nghiên cứu gần đây tại Việt Nam về sự giảm dần tỷ lệ thành phần giun móc *N. americanus*, bởi có sự hiện diện và gia tăng dần tỷ lệ loài giun móc *A. ceylanicum* [12-14].

Khi phối hợp kỹ thuật PCR lồng và giải trình tự, bên cạnh loài phổ biến *N. americanus* là 67,7%, thành phần loài giun móc *A. duodenale* và *A. ceylanicum* lần lượt là 1,6 và 16,9% đối với trường hợp đơn nhiễm. Tất cả trường hợp đồng nhiễm: *N. americanus* và *A. ceylanicum* là 13,8% (bảng 6). Kết quả tỷ lệ hiện diện giun móc *A. ceylanicum* trong cả các trường hợp đơn nhiễm hoặc đồng nhiễm với *N. americanus* là cao hơn so với giun móc *A. duodenale*, đánh dấu một mốc quan trọng về việc lây nhiễm giun móc có nguồn gốc động vật cho người. Đây chính là điểm phát hiện mới của nghiên cứu này, mở ra hướng phát triển nghiên cứu về sự phân bố của loài giun móc *A. ceylanicum* tại Việt Nam.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định thành phần loài giun móc và giun móc gây bệnh ở người tại xã Thạnh Bình, huyện Tân Biên, tỉnh Tây Ninh. Tỷ lệ nhiễm giun móc *N. americanus* vẫn chiếm ưu thế (67,7%). Có sự hiện diện loài mới giun móc *A. ceylanicum* chiếm 16,9 và 13,8% trong các trường hợp đơn và đồng nhiễm. Kỹ thuật PCR lồng vẫn chưa định danh được loài giun móc *A. ceylanicum*.

Giải trình tự gen ty thể vùng *cox1* là tiêu chuẩn vàng để định danh loài. Kết quả của nghiên cứu cho thấy khả năng lây nhiễm *A. ceylanicum* ở người trở nên phổ biến. Sự tương tác giữa người và động vật trong quá trình sống đã dẫn đến lây nhiễm giun móc có nguồn gốc động vật cho người ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Sahimin, Y.A.L. Lim, B. Douadi, et al. (2015), "Hookworm infections among migrant workers in Malaysia: Molecular identification of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*", *Acta Tropica*, **173**, pp.109-111, DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.06.011.
- [2] D.V. Le (2017), *Medical Parasitology*, Practice textbook, Medical Publishing House, Ho Chi Minh City, 96pp (in Vietnamese).
- [3] T.H. Tran (2017), "Disease caused by hookworm in humans", *Medical Parasitology*, Medical Publishing House, Ho Chi Minh City, pp.141-145 (in Vietnamese).
- [4] S. Brooker, J. Bethony, P.J. Hotez (2004), "Human hookworm infection in the 21st century", *Adv. Parasitol.*, **58**, pp.197-288, DOI: 10.1016/S0065-308X(04)58004-1.
- [5] J.M. Gruijter, L. Lieshout, R.B. Gasser, et al. (2005), "Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* infections in human in northern Ghana", *Trop. Med. Int. Health*, **10**(6), pp.574-580, DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01440.x
- [6] M. Papaikovou (2018), "A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **12**(1), DOI: 10.1371/journal.pntd.0006130.
- [7] R.B. Gasser, N.B. Chilton, H. Hoste, et al. (1993), "Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths", *Nucleic Acids Research*, **21**(10), pp.2525-2526, DOI: 10.1093/nar/21.10.2525.
- [8] R. Ngui, L.S. Ching, T.T. Kai, et al. (2012), "Molecular identification of human hookworm infections in economically disadvantaged communities in Peninsular Malaysia", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **86**(5), pp.837-842, DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0446.
- [9] J.J. Verweij, D.S. Pit, L.V. Lieshout, et al. (2001), "Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples", *Tropical Medicine and International Health*, **6**(9), pp.726-731, DOI: 10.1046/j.1365-3156.2001.00770.x.
- [10] T. Inpankaew, F. Schar, A. Dalsgaard, et al. (2014), "High prevalence of *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections in humans, Cambodia, 2012", *Emerg. Infect. Dis.*, **20**(6), pp.976-982, DOI: 10.3201/eid2006.131770.
- [11] M. Papaikovou, N. Pilotte, J.R. Grant, et al. (2017), "A novel, species-specific, real-time PCR assay for the detection of the emerging zoonotic parasite *Ancylostoma ceylanicum* in human stool", *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **11**(7), DOI: 10.1371/journal.pntd.0005734.
- [12] T.H. Hoang, H.N.T. Nguyen, T.H. Nhu (2019), "Diagnostic value of stool testing techniques in determining hookworm infection in primary school students in Cu Chi district, Ho Chi Minh City in 2016", *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, **23**(3), pp.400-409 (in Vietnamese).
- [13] T.L. Luu, Q.H. Le, D.V. Le, et al. (2019), "Application of nested PCR to detect *Ancylostoma* spp. and *Necator americanus* infections in human", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **61**(7), pp.10-13 (in Vietnamese).
- [14] B.K. Hung, N.V. De, V.D. Le, et al. (2016), "Prevalence of soil-transmitted helminths and molecular clarification of hookworm species in ethnic Ede primary schoolchildren in Dak Lak province, Southern Vietnam", *Korean J. Parasitol.*, **54**(4), pp.471-476, DOI: 10.3347/kjp.2016.54.4.471.

Yếu tố ảnh hưởng đến tuân thủ điều trị ARV của trẻ vị thành niên nhiễm HIV tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2022-2023

Trịnh Thị Dung^{1*}, Đỗ Thiện Hải¹, Nguyễn Thị Vân², Hồ Thị Bích¹, Trần Thị Ngọc¹, Nguyễn Lê Chinh¹, Phùng Thị Liên Tỉnh¹, Nguyễn Thành Đồng¹, Vương Xuân Bình¹, Nguyễn Thị Bảo Ngọc¹, Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Nguyễn Thị Hồng¹, Đặng Thanh Thủy¹, Nguyễn Thị Dung¹, Lê Thị Hằng¹, Trần Thị Xuyên¹

¹Bệnh viện Nhi Trung ương, 18/879 La Thành, phường Láng Thượng, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/3/2023; ngày chuyển phản biện 16/3/2023; ngày nhận phản biện 5/4/2023; ngày chấp nhận đăng 10/4/2023

Tóm tắt:

Mục tiêu: Nghiên cứu được thực hiện nhằm: 1) Mô tả đặc điểm của bệnh nhi và tuân thủ điều trị (TTĐT) của trẻ vị thành niên (VTN) nhiễm HIV tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2022-2023; 2) Phân tích một số yếu tố ảnh hưởng đến TTĐT ARV (thuốc kháng virus) của trẻ VTN nhiễm HIV. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu được thực hiện trên 222 trẻ VTN nhiễm HIV có đáp ứng tiêu chuẩn nghiên cứu đến khám tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2022-2023 bằng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang. **Kết quả:** Tỷ lệ TTĐT của trẻ VTN chiếm 84,2%. Một số yếu tố ảnh hưởng đến TTĐT ARV của trẻ VTN nhiễm HIV gồm: trẻ được tham gia lớp tư vấn tại phòng khám TTĐT gấp 2,32 lần so với trẻ không tham gia ($p < 0,05$); trẻ có học vấn có trình độ tương đương với tuổi TTĐT ARV cao gấp 3,46 lần so với nhóm tuổi không có trình độ học vấn tương đương với nhóm tuổi ($CI_{95\%} 1,39-8,57$, $X^2=7,87$, $p=0$); trẻ được bộc lộ hoàn toàn tình trạng nhiễm HIV tại thời điểm 10-12 tuổi có tỷ lệ TTĐT cao hơn trẻ được bộc lộ tình trạng nhiễm ở các thời điểm khác, kết quả này có ý nghĩa thống kê ($X^2=10,5$, $p < 0,05$); người chăm sóc chính (NCSC) tham gia nghiên cứu biết rõ về HIV/AIDS giúp trẻ TTĐT ARV cao hơn so với những trẻ có NCSC thiếu hiểu biết về HIV/AIDS, kết quả này có ý nghĩa thống kê ($X^2=6,5$, $p < 0,05$). **Kết luận:** Tỷ lệ TTĐT ARV của trẻ VTN chiếm 84,2%, tỷ lệ này chưa cao. Một số yếu tố làm tăng tỷ lệ TTĐT là: trẻ được bộc lộ tình trạng nhiễm khi 10-12 tuổi, trẻ được tham gia lớp học tư vấn về HIV, trình độ học vấn tương đương với tuổi, sự hiểu biết về HIV của NCSC.

Từ khóa: HIV, thuốc kháng virus, trẻ vị thành niên, tuân thủ điều trị.

Chỉ số phân loại: 3.3

1. Đặt vấn đề

Virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) và Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (Acquired immune deficiency syndrome - AIDS) đã gây đại dịch trên toàn cầu, là hiểm họa đe dọa trực tiếp tới giống nòi cũng như sự tiến bộ, ổn định xã hội và phát triển của mỗi quốc gia, đồng thời là thách thức lớn cho sức khỏe y tế cộng đồng. Đã có nhiều tổ chức quốc tế tiến hành các hoạt động nhằm giúp cho người nhiễm HIV được tiếp cận điều trị tốt nhất, mang lại cuộc sống ổn định cho người nhiễm HIV/AIDS [1].

Để người nhiễm HIV có sức khỏe tốt thì TTĐT ARV là việc vô cùng quan trọng, giúp cho người nhiễm HIV ức chế được sự nhân lên của virus HIV, hồi phục chức năng miễn dịch cho người nhiễm. TTĐT ARV là phải duy trì liên tục suốt đời, do vậy mà người nhiễm HIV rất khó khăn trong TTĐT, đặc biệt là nhóm trẻ VTN nhiễm HIV. Đây là độ tuổi có nhiều những thay đổi cả về thể chất, tinh cảm, tâm sinh lý và xã hội, từ đó ảnh hưởng đến TTĐT. Vậy thì kết quả TTĐT ở trẻ VTN sẽ ra sao và có những yếu tố nào ảnh hưởng đến sự TTĐT? Để trả lời cho câu hỏi này và nhằm giúp cải thiện chất lượng chăm sóc, điều trị cho trẻ VTN nhiễm HIV chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu này với 2 mục tiêu: 1) Mô tả đặc điểm của bệnh nhi và TTĐT của trẻ VTN nhiễm HIV tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương giai đoạn 2022-2023; 2) Phân tích một số yếu tố ảnh hưởng đến TTĐT ARV của trẻ VTN nhiễm HIV.

*Tác giả liên hệ: Email: thangdungnam@gmail.com

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Trẻ VTN nhiễm HIV có độ tuổi 10-18 tuổi điều trị ARV từ 6 tháng trở lên và NCSC của trẻ tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2022-2023.

- Tiêu chuẩn lựa chọn: Trẻ VTN nhiễm HIV đang điều trị ARV tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương, trẻ có khả năng trả lời các câu hỏi và đồng ý tham gia nghiên cứu. NCSC của trẻ đồng ý cho trẻ và tự nguyện tham gia nghiên cứu.

- Tiêu chuẩn loại trừ: Trẻ đang giai đoạn cấp của bệnh, trẻ cảm điếc, rối loạn tâm thần.

Nghiên cứu được thực hiện từ ngày 1/8/2022 đến 31/1/2023 tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang có phân tích.

Cỡ mẫu: xác định cỡ mẫu theo công thức sau:

$$n = z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$$

trong đó: n: cỡ mẫu tối thiểu cần có; p: tỷ lệ ước tính trẻ TTĐT

Factors affecting adherence to ARV of HIV-infected adolescents at the Outpatient Clinic, Vietnam National Children's Hospital in 2022-2023

Thi Dung Trinh^{1*}, Thien Hai Do¹, Thi Van Nguyen², Thi Bich Ho¹, Thi Ngoc Tran¹, Le Chinh Nguyen¹, Thi Lien Tinh Phung¹, Thanh Dong Nguyen¹, Xuan Binh Vuong¹, Thi Bao Ngoc Nguyen¹, Thi Thu Hang Nguyen¹, Thi Hong Nguyen¹, Thanh Thuy Dang¹, Thi Dung Nguyen¹, Thi Hang Le¹, Thi Xuyen Tran¹

¹Vietnam National Children's Hospital, 18/879 La Thanh Street, Lang Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 13 March 2023; revised 5 April 2023; accepted 10 April 2023

Abstract:

Objectives: (1) Describe the characteristics of pediatric patients and treatment adherence of HIV-infected adolescents at the Outpatient Clinic of the Vietnam National Children's Hospital in 2022-2023; (2) Analysis of some factors affecting adherence to ARV treatment of HIV-infected adolescents. **Research subject and method:** The study was carried out on 222 HIV-infected adolescents who met the research criteria to visit the Outpatient Clinic of the Vietnam National Children's Hospital in 2022-2023 by cross-sectional descriptive research method. **Results:** The treatment adherence rate of adolescents accounted for 84.2%. Some factors affecting adherence to ARV treatment of HIV-infected adolescents include: children who attended counselling classes at the clinic were 2.32 times more compliant than children who did not ($p < 0.05$); educated children with the same level of education as the age group of ARVs are 3.46 times higher than the age group with no education equivalent to the age group (CI95% 1.39-8.57, $X^2 = 7.87$, $p = 0$); children whose HIV status was fully disclosed at 10-12 years of age had higher adherence rates than children whose HIV status was revealed at other time points, this result is statistically significant ($X^2 = 10.5$, $p < 0.05$); the primary caregivers participating in the study who knew well about HIV/AIDS helped children to adhere to ARV treatment higher than those whose primary caregivers lacked knowledge about HIV/AIDS, this result is statistically significant ($X^2 = 6.5$, $p < 0.05$). **Conclusion:** The ARV adherence rate of adolescents accounts for 84.2%, this rate is not high. A number of factors increase the rate of treatment adherence: children become infected at 10-12 years of age, children attend HIV counselling classes, educational attainment equivalent to age, caregivers' knowledge of HIV main squirrel.

Keywords: adolescents, antiretroviral, human immunodeficiency virus (HIV), treatment adherence.

Classification number: 3.3

ARV, giá trị p được lấy theo nghiên cứu của D.T.T. Linh (2011) [2] là 78,9%; d: khoảng sai lệch mong muốn ($d = 0,05$); độ tin cậy 99% thì $Z^2_{(1-\alpha/2)} = 2,58$. Cỡ mẫu tính được bao gồm 185 trẻ VTN và 185 NCSC cho trẻ. Thực tế chúng tôi có 222 trẻ VTN và NCSC tham gia nghiên cứu.

Phương pháp chọn mẫu nghiên cứu: Chọn mẫu thuận tiện. Chọn tất cả các trẻ VTN và NCSC đủ tiêu chuẩn và đồng ý tham gia nghiên cứu trong thời gian nghiên cứu.

Công cụ đánh giá: Bộ câu hỏi được xây dựng dựa trên những tiêu chí do Bộ Y tế và Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) ban hành về chăm sóc và điều trị người nhiễm HIV/AIDS [3, 4]. Cụ thể: phân chia nhóm tuổi theo WHO; tình trạng bộc lộ: bộc lộ hoàn toàn (trẻ biết rõ mình bị nhiễm HIV), bộc lộ một phần (trẻ biết mình bị bệnh nhưng không rõ là bị nhiễm HIV), trẻ chưa bộc lộ (chưa biết mình bị bệnh); TTĐT bao gồm: tái khám, xét nghiệm đúng hẹn; uống đúng loại thuốc; uống thuốc đúng giờ; uống đúng liều. TTĐT được đánh giá nhị phân TTĐT tốt và không tốt.

Phương pháp thu thập số liệu: Nghiên cứu viên đã được tập huấn kỹ về bộ câu hỏi, sau đó phỏng vấn trực tiếp đối tượng nghiên cứu. Quy trình thu thập số liệu gồm 5 bước:

Bước 1: Liên hệ Lãnh đạo Trung tâm Bệnh nhiệt đới, Bệnh viện Nhi Trung ương.

Bước 2: Thử nghiệm và hoàn thiện bộ câu hỏi.

Bước 3: Tiến hành thu thập số liệu.

Bước 4: Tổng hợp và làm sạch phiếu phỏng vấn.

Bước 5: Nhập và phân tích số liệu.

2.3. Xử lý và phân tích số liệu

Số liệu sau khi thu thập được làm sạch, nhập liệu bằng phần mềm Epidata 3.1 và phân tích bằng phần mềm SPSS 22.0. Các số liệu được mô tả dưới dạng tần số, tỷ lệ với biến định tính. Ngoài ra, nghiên cứu sử dụng kiểm định "X²" để so sánh sự khác biệt về TTĐT theo các yếu tố liên quan trong phân tích thống kê đơn biến và xây dựng mô hình hồi quy logistic.

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu được giải thích rõ về mục đích của nghiên cứu. Chỉ tiến hành phỏng vấn khi đối tượng tham gia nghiên cứu tự nguyện đồng ý. Thông tin thu thập được bảo mật, chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu.

Nghiên cứu đã được phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức nghiên cứu y sinh Bệnh viện Nhi Trung ương và Hội đồng đạo đức Trường Đại học Thăng Long.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm chung và kết quả TTĐT ARV của trẻ VTN nhiễm HIV

Trong thời gian nghiên cứu chúng tôi thu thập được 222 trẻ VTN nhiễm HIV và 222 NCSC tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương cho kết quả như sau:

Đặc điểm chung của trẻ VTN: tỷ lệ nam/nữ là 1,52/1; trẻ có trình độ học vấn tương đương với tuổi chiếm 88,2%; trẻ có độ tuổi 10-13, 14-16, 17-18 lần lượt là 37,0, 40,5, 22,5; 60,8% trẻ có

Bảng 1. Đặc điểm của trẻ VTN tham gia nghiên cứu.

Đặc điểm bệnh nhi	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Trình độ học vấn tương đương với tuổi	Có	196
	Không	26
	Tổng số	222
		100
Trình độ học vấn	Bậc học hoàn toàn	134
	Bậc học một phần	19
	Chưa học bậc	69
	Tổng số	222
Độ tuổi trẻ được học bậc học hoàn toàn trình độ nhiễm HIV	<7 tuổi	12
	7-10 tuổi	25
	10-12 tuổi	72
	13-16 tuổi	23
Ai là người học bậc học cho trẻ	≥17 tuổi	2
	Bố mẹ, NCSC	78
	Nhân viên y tế, lớp học	25
	Tự tìm hiểu qua đài, báo, internet, thuốc	31
Lý do trẻ chưa được học bậc học	Tổng số	134
		100
	Nghỉ con còn bé	38
	Không dám học bậc, NCSC cảm thấy tội lỗi	18
Sự sẵn sàng học bậc	Chưa biết nên học bậc như thế nào	19
	Đã học bậc nhưng trẻ không hiểu	13
	Có	11
	Không	123
Lý do không học bậc cho người khác	Tổng số	134
		100
	Sợ bị kì thị, xa lánh	116
	Không cần thiết phải học bậc cho người khác	4
Lý do không học bậc cho người khác	Chưa biết phải học bậc như thế nào	3
	Tổng số	123
		100

thời gian điều trị ARV trên 10 năm; 98,6% trẻ bị nhiễm HIV do lây truyền mẹ con; 10,4% trẻ còn bị kì thị; 14% trẻ có biểu hiện bất thường về tâm lý, trong đó có 12,9% có cảm giác tuyệt vọng; chỉ có 17,1% trẻ có nhu cầu chuyển tuyến; 68% trẻ được tham gia buổi sinh hoạt về HIV.

Nhận xét: nghiên cứu ghi nhận 11,8% trẻ có trình độ học vấn không tương đương với tuổi, 31% trẻ VTN chưa được học bậc học hoàn toàn trình độ nhiễm HIV, còn 1,5% trẻ được học bậc học hoàn toàn trình độ nhiễm HIV, có tới 91,8% trẻ không sẵn sàng học bậc học hoàn toàn trình độ nhiễm HIV trong đó với lý do sợ bị kì thị chiếm tới 94,3% (bảng 1).

Bảng 2. Kết quả TTĐT chung của trẻ.

Kết quả TTĐT	Số lượng	Tỷ lệ (%)
TTĐT	187	84,2
Không TTĐT	35	15,8
Tổng số	222	100

Kết quả bảng 2 cho thấy, TTĐT chung trong nghiên cứu này có 84,2% trẻ.

Bảng 3. Đặc điểm NCSC của trẻ VTN nhiễm HIV tham gia nghiên cứu.

Đặc điểm NCSC	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Tuổi	<30 tuổi	6
	30-50 tuổi	183
	>50 tuổi	33
Trình độ học vấn	Có	174
	Không	48
Mối quan hệ với trẻ	Bố mẹ ruột	172
	Không phải bố mẹ ruột	50
Hiểu biết về TTĐT ARV của NCSC	Hiểu rõ	103
	Hiểu một phần	107
	Không biết	12
	Tổng	222

Kết quả bảng 3 cho thấy, NCSC có độ tuổi chủ yếu là 30-50, chiếm tỷ lệ 82,4%; có 77,5% trẻ có NCSC là bố mẹ ruột; có 78,4% trẻ có NCSC bị nhiễm HIV. NCSC hiểu rõ về TTĐT ARV chiếm 46,4%.

3.2. Một số yếu tố ảnh hưởng đến TTĐT của trẻ VTN nhiễm HIV

Kết quả bảng 4 cho thấy, trẻ VTN ở nhóm tuổi 10-13 có tỷ lệ TTĐT cao nhất chiếm 97,6%, kết quả có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

Bảng 4. Mối liên quan giữa TTĐT ARV theo nhóm tuổi của trẻ VTN nhiễm HIV.

Nhóm tuổi	Tuân thủ		Không tuân thủ		Tổng
	n	%	n	%	
10-13	80	97,6	2	2,4	82
14-16	79	87,8	11	12,2	90
17-18	28	56	22	44	50
Tổng	187	84,2	35	15,8	222

$\chi^2=41,8$, $p<0,05$

Bảng 5. Mối liên quan giữa TTĐT ARV theo trình độ học vấn tương đương với nhóm tuổi của trẻ VTN nhiễm HIV.

Tương đương	Tuân thủ		Không tuân thủ		Tổng
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Có	170	86,7	26	13,3	196
Không	17	65,4	9	34,6	26
Tổng	187	84,2	35	15,8	222

$\chi^2=7,87$, $OR=3,46$ (CI95% 1,39-8,57), $p<0,05$.

Kết quả bảng 5 cho thấy, trẻ có trình độ học vấn tương đương với tuổi có tỷ lệ TTĐT cao gấp 3,46 lần so với trẻ không có trình độ học vấn tương đương với tuổi, kết quả có ý nghĩa thống kê $p<0,05$.

Bảng 6. Mối liên quan giữa thời điểm tuổi mà trẻ được bộc lộ hoàn toàn tình trạng nhiễm HIV và TTĐT (n=134).

Độ tuổi được bộc lộ hoàn toàn	Tuân thủ		Không tuân thủ		Tổng
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<7 tuổi	9	75	3	25	12
7-10 tuổi	23	92	2	8	25
10-12 tuổi	67	93,1	5	6,9	72
13-16 tuổi	17	73,9	6	26,1	23
≥17 tuổi	1	50	1	50	2
Tổng	117	87,3	17	12,7	134

$\chi^2=10,5$, $p=0,032<0,05$.

Kết quả bảng 6 cho thấy, trẻ được bộc lộ tình trạng nhiễm HIV ở độ tuổi 10-12 có tỷ lệ TTĐT cao nhất chiếm 93,1%, kết quả có ý nghĩa thống kê $p<0,05$.

Bảng 7. Mối liên quan giữa việc tham gia sinh hoạt tư vấn về bệnh và TTĐT ARV của trẻ VTN nhiễm HIV.

Tham gia	Tuân thủ		Không tuân thủ		Tổng
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Có	133	88,1	18	11,9	151
Không	54	76,1	17	23,9	71
Tổng	187	84,2	35	15,8	222

$OR=2,32$ (CI95% 1,02-4,5), $\chi^2=5,2$, $p<0,05$.

Kết quả bảng 7 cho thấy, trẻ được tham gia tư vấn về HIV có tỷ lệ TTĐT cao gấp 2,32 lần so với trẻ chưa được tham gia tư vấn về HIV. Kết quả có ý nghĩa thống kê $p<0,05$.

Bảng 8. Mối liên quan giữa hiểu biết của NCSC về HIV/AIDS và TTĐT ARV của trẻ VTN nhiễm HIV.

Hiểu biết của NCSC	Tuân thủ		Không tuân thủ		Tổng
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Không biết	7	58,3	5	41,7	12
Biết một phần	90	84,1	17	15,9	107
Biết rõ	90	87,4	13	12,6	103
Tổng	187	84,2	35	15,8	222

$\chi^2=6,8$, $p=0,03<0,05$.

Kết quả bảng 8 cho thấy, trẻ có NCSC hiểu biết về HIV có tỷ lệ TTĐT cao nhất chiếm 87,4%, kết quả có ý nghĩa thống kê $p<0,05$.

Bảng 9. Mô tả mối liên quan giữa các yếu tố đến tình trạng thực hiện TTĐT ARV của đối tượng tham gia nghiên cứu (n=222).

Biến số	β	OR	p	CI95%	
				Nhỏ nhất	Lớn nhất
Tham gia sinh hoạt tư vấn	1,6	4,9	0,46	0,9	25,9
NCSC hiểu biết về HIV	1,5	4,6	0,00	2,1	9,8
Sống cùng bố mẹ	1	2,9	0,02	1,1	7,5
Nhóm tuổi	3,6	38	0,00	7,9	182,4
	-17,5		0,00		

Hosmer and Lemeshow test =0,1>0,05.

Theo kết quả bảng 9, mô hình hồi quy logistic như sau:

TTĐT = -17,5 + 1,6*Tham gia sinh hoạt + 1,5*NCSC hiểu biết về HIV + 1*Sống cùng bố mẹ + 3,6*Nhóm tuổi.

Qua phân tích mô hình hồi quy logistic đa biến cho thấy, đối tượng nghiên cứu tham gia sinh hoạt tư vấn, NCSC hiểu biết về HIV, trẻ sống cùng bố mẹ và nhóm tuổi có ý nghĩa với kiểm định Hosmer and Lemeshow test =0,1>0,05. Ở nhóm cùng đặc điểm về tuổi, trẻ sống cùng bố mẹ có tham gia sinh hoạt tư vấn về bệnh TTĐT thủ cao gấp 4,9 lần so với nhóm không tham gia (khoảng tin cậy CI95% 0,9-5,9); NCSC hiểu biết về bệnh HIV giúp trẻ thực hiện TTĐT cũng cao gấp 4,6 lần so với NCSC không hiểu biết về bệnh (khoảng tin cậy CI95% 2,1-9,8).

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm chung và TTĐT của bệnh nhi

Trong thời gian nghiên cứu có 222 trẻ VTN nhiễm HIV đủ điều kiện và đã tham gia nghiên cứu. Trong đó có 44 trẻ ở độ tuổi 17-18 (chiếm tỷ lệ thấp nhất 22,5%) (bảng 4), tuy nhiên ở nhóm tuổi 17-18 có rất nhiều vấn đề cần quan tâm, đặc biệt ở độ tuổi này, phần lớn các trẻ đã có quan hệ tình dục, hoạt động tình dục mạnh mẽ. Nguy cơ nhiễm thêm các bệnh lây qua đường tình dục như giang mai, viêm gan B, viêm gan C, HIV... cũng như lây nhiễm HIV cho bạn tình của trẻ, làm lây lan HIV ra cộng đồng, có thai ngoài ý muốn, chưa có biện pháp dự phòng cho những đứa trẻ được sinh ra. Từ đó làm tăng thêm trẻ nhiễm HIV do mẹ truyền sang con. Do đó công tác tư vấn, hỗ trợ cho trẻ về kiến thức dự phòng phơi nhiễm cho trẻ VTN nhiễm HIV là vô cùng cần thiết.

Tình trạng bộc lộ: Bộc lộ tình trạng nhiễm HIV nhằm mục đích cho người nhiễm HIV hiểu đúng tích cực về tình trạng nhiễm HIV của bản thân, giúp người nhiễm có những kiến thức về tự chăm sóc bản thân, biết được những kiến thức về TTĐT ARV cũng như những kiến thức về phòng ngừa lây truyền cho người khác. Lý tưởng nhất là đến tuổi VTN nên biết tình trạng của mình. Mặc dù vậy, việc tiết lộ thường bị trì hoãn và các nghiên cứu đã báo cáo rằng, tỷ lệ trẻ lớn hơn và thanh thiếu niên biết về tình trạng nhiễm HIV của mình dao động từ mức thấp nhất là 1,2 đến 75% ở các giai đoạn chăm sóc HIV khác nhau và dường như còn thấp hơn ở các nước có thu nhập thấp và trung bình [5]. Tình trạng nhiễm HIV

được tiết lộ đã được xác định là một trong những yếu tố liên quan đến việc TTĐT tốt hơn [5, 6]. Với trẻ VTN nhiễm HIV sự bộc lộ thông báo tình trạng nhiễm HIV cho trẻ là một vấn đề vô cùng quan trọng, đòi hỏi tất cả cùng tham gia, bao gồm gia đình, nhân viên y tế, cộng đồng trong công tác chuẩn bị đầy đủ về kiến thức, thời gian, dự đoán được những phản ứng bất thường từ phía trẻ, cũng như là những giải pháp nhằm hỗ trợ cho trẻ chấp nhận, vượt qua giai đoạn khó khăn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận có 60,4% trẻ được bộc lộ hoàn toàn tình trạng bệnh; kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của N.N. Quy (2018) [7] với tỷ lệ trẻ biết bệnh của mình chiếm 50,8%. Có sự khác biệt này là do khác nhau về đối tượng nghiên cứu.

Trẻ VTN nhiễm HIV thường có xu hướng tạo vỏ bọc che giấu tình trạng nhiễm HIV của mình. Một nghiên cứu khác về rào cản đối với việc TTĐT bằng thuốc kháng virus ở thanh thiếu niên nhiễm HIV sống ở Tanzania ghi nhận thanh thiếu niên đưa ra nhiều lý do để lựa chọn không tiết lộ với người khác tình trạng nhiễm HIV của mình [8]. Trước hết, thanh thiếu niên lo lắng mọi người sẽ kỳ thị, phân biệt đối xử hoặc bị cô lập, bị đàm tiếu. Ngoài ra, thanh thiếu niên sợ khi tiết lộ với người khác họ lại tiếp tục đi nói với người khác nữa nên thanh thiếu niên nhiễm HIV thường không chia sẻ tình trạng nhiễm bệnh của mình [8, 9]. Ghi nhận trong nghiên cứu này có 8,2% trẻ VTN nhiễm HIV sẵn sàng bộc lộ tình trạng nhiễm HIV của mình cho người khác biết (đối tượng được chia sẻ là người yêu của trẻ VTN nhiễm HIV). Có 91,8% trẻ VTN nhiễm HIV không chia sẻ tình trạng nhiễm của bản thân cho người khác biết, lý do trẻ không chia sẻ là sợ bị kỳ thị (chiếm 94,3%).

Tuổi VTN là giai đoạn chuyển tiếp từ trẻ em sang người lớn. Trong giai đoạn này trẻ trải qua sự thay đổi về thể chất, cảm xúc, tinh thần; rất nhạy cảm, dễ bị tác động, ảnh hưởng bởi các yếu tố bên ngoài như sự cám dỗ bởi các chất gây nghiện, quan hệ tình dục không an toàn, tâm lý diễn biến phức tạp, chưa ổn định. Với những trẻ mắc bệnh mạn tính, phải dùng thuốc suốt đời, khám bệnh theo hẹn như bệnh Thalassemia, tiểu đường, tim bẩm sinh... sẽ bị tăng cảm giác lo lắng, sợ hãi, chán nản, tự ti, sống khép mình, đặc biệt với trẻ VTN nhiễm HIV. Trong một nghiên cứu ở Zambia, khoảng 40% trong số 127 thanh thiếu niên nhiễm HIV cho biết có vấn đề về sức khỏe tâm thần [5]. Trong một nghiên cứu của S. Musisi và cs (2009) [10] ở Uganda cũng ghi nhận 17% trẻ VTN nhiễm HIV có ý định tự tử. Trong nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận 14% trẻ có biểu hiện bất thường về tâm lý. Trong đó, có 54,8% trẻ liên tục cảm thấy lo lắng; 12,9% trẻ có cảm giác tuyệt vọng, nghĩ đến tự tử; 32,3% trẻ không hào hứng hay yêu thích khi học tập và lao động.

Kết quả TTĐT được ghi nhận trong nghiên cứu này (bảng 2) là 84,2%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của L.T. Dat và cs (2021) [11] tại quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh TTĐT chiếm 82,1%. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của N.L.

Chinh (2021) [12] khi ghi nhận tỷ lệ trẻ TTĐT đạt 91,1%. Có sự khác biệt này là do trên cùng một địa điểm nhưng lại khác nhau về đối tượng nghiên cứu.

4.2. Một số yếu tố ảnh hưởng đến TTĐT ARV

Mối liên quan giữa TTĐT ARV theo nhóm tuổi của trẻ VTN nhiễm HIV: Trẻ VTN là giai đoạn chuyển tiếp từ trẻ em sang người lớn, có nhiều thay đổi cùng sự phát triển, hoàn thiện dần cả về thể chất, trí tuệ và cảm xúc. Trẻ rất dễ nhạy cảm trước các tác động như học đường, bạn bè, bệnh tật của bản thân. Đặc biệt với những trẻ nhiễm HIV, khi biết bản thân mình nhiễm bệnh trẻ thường rơi vào tâm trạng lo lắng, sợ hãi, chán nản, bỏ uống thuốc, ngại uống thuốc trước người khác vì sợ lộ tình trạng nhiễm HIV. Từ đó ảnh hưởng đến việc uống thuốc hàng ngày. Trẻ VTN có độ tuổi 17-18 tuổi không TTĐT cao bởi một số lý do như: bận đi làm, bận học, đi chơi không mang theo thuốc, không uống thuốc nơi đông người... từ đó làm ảnh hưởng đến TTĐT. Trong nghiên cứu này ghi nhận trẻ VTN thuộc nhóm tuổi 10-13 tuổi có tỷ lệ TTĐT cao (97,6%), tỷ lệ TTĐT thấp hơn ở nhóm 14-16 tuổi (87,8%) và thấp nhất ở nhóm tuổi 17-18 tuổi (56%) (bảng 4). Sự khác biệt TTĐT giữa các nhóm tuổi có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Mối liên quan giữa TTĐT ARV theo trình độ học vấn tương đương với nhóm tuổi của trẻ VTN nhiễm HIV: Trong nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận (bảng 5) có 196 trẻ (chiếm 88,3%) có trình độ học vấn tương đương theo quy định của Luật Giáo dục, trong đó có 86,7% trẻ TTĐT; trẻ có trình độ học vấn không tương đương với tuổi chiếm 11,7%, trong đó có 65,4% trẻ TTĐT. Nghiên cứu này đã tìm thấy mối liên quan giữa trẻ có trình độ học vấn tương đương và TTĐT, trẻ có trình độ học vấn tương đương có tỷ lệ TTĐT cao gấp 3,46 lần so với TTĐT của trẻ có trình độ học vấn không tương đương (khoảng tin cậy (CI95% 1,39-8,57), kết quả này có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ ($=7,87$, OR=3,46 $p < 0,05$).

Mối liên quan giữa thời điểm tuổi mà trẻ được bộc lộ hoàn toàn tình trạng nhiễm HIV và TTĐT: Bộc lộ tình trạng nhiễm HIV sớm theo quy định thì sẽ tiếp nhận, thích nghi với tình trạng nhiễm HIV của bản thân tốt hơn, có ý thức TTĐT ARV tốt hơn [3]. Những trẻ được bộc lộ tình trạng nhiễm HIV muộn dễ bị sốc, rất khó chấp nhận khi biết mình bị nhiễm HIV, trẻ có xu hướng không chấp nhận, bỏ điều trị; đồng thời ở độ tuổi VTN lớn mới bộc lộ thì còn có nguy cơ lây truyền HIV ra ngoài cộng đồng, bởi vì nhiều trẻ VTN lớn đã có người yêu, một số đã có quan hệ tình dục trong khi không biết bản thân mình bị nhiễm HIV. Do vậy, trẻ nhiễm HIV được bộc lộ tình trạng nhiễm HIV sớm theo quy định, để trẻ tiếp nhận dần tình trạng nhiễm HIV của bản thân, TTĐT tốt, biết được các biện pháp phòng ngừa lây truyền HIV cho người khác. Trong nghiên cứu này ghi nhận trẻ được bộc lộ hoàn toàn tình trạng nhiễm HIV khi 10-12 tuổi có tỷ lệ TTĐT chiếm tỷ lệ cao nhất 93,1%; trẻ

được bộc lộ hoàn toàn tình trạng nhiễm HIV khi trẻ 17 tuổi có tỷ lệ TTĐT thấp hơn nhiều chỉ chiếm 50% (bảng 6). Kết quả này có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ ($X^2 = 10,5$, $p = 0,032$).

Mối liên quan giữa việc tham gia sinh hoạt tư vấn về bệnh và TTĐT ARV của trẻ VTN nhiễm HIV: Tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương đã tổ chức các lớp kỹ năng cho các trẻ nhằm cung cấp những kiến thức về TTĐT ARV, kiến thức về bộc lộ bệnh cho trẻ, tự chăm sóc bản thân, biện pháp phòng ngừa lây truyền cho người khác. Tại các buổi sinh hoạt này, các trẻ VTN nhiễm HIV có cơ hội giao lưu, chia sẻ, tháo gỡ những vướng mắc mà bản thân đang gặp phải. Kể từ khi có đại dịch COVID-19 các buổi sinh hoạt, các lớp kỹ năng không được tổ chức nên nhiều trẻ VTN chưa được tham gia lớp kỹ năng này, cũng như một số trẻ đã được tham gia nhưng đã quá lâu rồi nên hiện tại không còn nhớ nữa. Đồng thời thông qua những buổi sinh hoạt này sẽ làm tăng sự thân thiết giữa trẻ VTN với nhân viên y tế, tạo niềm tin của trẻ với nhân viên y tế, trẻ tin tưởng vào chăm sóc và điều trị của nhân viên y tế. Từ đó nâng cao tỷ lệ TTĐT, phục hồi chức năng miễn dịch, duy trì sức khỏe tốt cho trẻ VTN nhiễm HIV.

Trong nghiên cứu này chúng tôi ghi nhận có 151 trẻ đã từng được tham gia các lớp sinh hoạt tư vấn, trong đó có 88,1% trẻ TTĐT tốt; còn 71 trẻ chưa được tham gia lớp sinh hoạt tư vấn, trong đó tỷ lệ TTĐT chiếm 76,1% (bảng 7). Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, những trẻ đã từng được tham gia sinh hoạt tư vấn thì TTĐT gấp 2,32 lần so với trẻ chưa từng được tham gia sinh hoạt tư vấn. Kết quả này có ý nghĩa thống kê ($OR = 2,32$ ($CI_{95\%} 1,02-4,5$), $X^2 = 5,2$, $p < 0,05$).

Mối liên quan giữa hiểu biết của NCSC về HIV/AIDS và TTĐT ARV của trẻ VTN nhiễm HIV: Trẻ VTN dưới sự giám hộ, sống cùng NCSC, sự hiểu biết của NCSC vô cùng quan trọng trong hỗ trợ, giúp đỡ trẻ TTĐT ARV. Trong nghiên cứu này, trẻ VTN nhiễm HIV do lây truyền mẹ con chiếm 98,6%, bởi vậy phần lớn NCSC có những kiến thức ít hoặc nhiều về HIV. Trong nghiên cứu này ghi nhận có 77,5% trẻ có NCSC là bố hoặc mẹ hoặc bố mẹ ruột (bảng 3). Những trẻ có NCSC (nhất là những trẻ sống cùng với bố, mẹ, bố mẹ ruột) thì có tỷ lệ TTĐT ARV tốt hơn so với trẻ có NCSC ít hiểu biết hoặc không hiểu biết về HIV hoặc không sống cùng bố, mẹ, cả bố và mẹ ($X^2 = 6,8$, $p = 0,03 < 0,05$) (bảng 8).

5. Kết luận

Qua nghiên cứu 222 trẻ VTN nhiễm HIV và 222 NCSC của trẻ đang theo dõi và điều trị tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương từ ngày 1/8/2022 đến ngày 31/1/2023, chúng tôi đã ghi nhận được các kết quả sau: có 84,2% trẻ VTN

nhiễm HIV TTĐT ARV. Một số yếu tố làm tăng tỷ lệ TTĐT ARV của trẻ VTN trong nghiên cứu này là: trẻ được bộc lộ bệnh ở độ tuổi 10-12 có tỷ lệ TTĐT tốt hơn; trẻ được tham gia các lớp tập huấn về HIV có tỷ lệ TTĐT cao hơn trẻ không tham gia các lớp tập huấn về HIV; trẻ VTN có NCSC hiểu biết về HIV thì có tỷ lệ TTĐT cao hơn trẻ có NCSC không hiểu biết về HIV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] HIV.gov (2021), *Global HIV/AIDS Overview: The Global HIV/AIDS Epidemic*, <https://www.hiv.gov/federal-response/pepfar-global-aids/global-hiv-aids-overview>, accessed 1 February 2023.
- [2] D.T.T. Linh (2011), *Assess Adherence to ARV Treatment and Re-examination on Time in Pediatric HIV/AIDS Patients at The National Children's Hospital*, Master's Thesis, Hanoi University of Public Health (in Vietnamese).
- [3] Ministry of Health (2019), *Instructions for Treatment and Care HIV/AIDS, Decision No 5456/QĐ-BYT, Date 11/20/2019* (in Vietnamese).
- [4] WHO (2022), *New Guidelines from WHO Recommend a Simpler, Safer Treatment for Cryptococcal Disease in People Living with HIV*, <https://www.who.int/news/item/20-04-2022-rapid-advice-new-guidelines-for-simpler-safer-treatment-for-cryptococcal-disease-in-plhiv>, accessed 1 February 2023.
- [5] A. Menon, C. Glazebrook, N. Campain, et al. (2007), "Mental health and disclosure of HIV status in Zambian adolescents with HIV infection: Implications for peer-support programs", *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, **46(3)**, pp.349-354, DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181565df0.
- [6] J.E. Haberer, A. Cook, A.S. Walker, et al. (2011), "Excellent adherence to antiretrovirals in HIV+ Zambian children is compromised by disrupted routine, HIV nondisclosure, and paradoxical income effects", *PLOS ONE*, **6(4)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0018505.
- [7] N.N. Quy (2018), *Survey on ARV Drug Use and Treatment Compliance of Patients at HIV/AIDS Outpatient Clinics Tran Yen Medical Center - Yen Bai*, Thesis for Level 1 Specialist Pharmacist, Hanoi University of Pharmacy (in Vietnamese).
- [8] C. Audi, O. Jahanpour, G. Antelman, et al. (2021), "Facilitators and barriers to antiretroviral therapy adherence among HIV-positive adolescents living in Tanzania", *BMC Public Health*, **21(1)**, DOI: 10.1186/s12889-021-12323-1.
- [9] W.B. Kajura, E. Luyirika, D.W. Purcell, et al. (2006), "Disclosure of HIV status and adherence to daily drug regimens among HIV-infected children in Uganda", *AIDS Behav.*, **10**, Suppl. 4, pp.S85-S93, DOI: 10.1007/s10461-006-9141-3.
- [10] S. Musisi, E. Kinyanda (2009), "Emotional and behavioural disorders in HIV seropositive adolescents in urban Uganda", *East Afr. Med. J.*, **86(1)**, pp.16-24, DOI: 10.4314/eamj.v86i1.46923.
- [11] L.T. Dat, P.T.V. Phuong (2021), "Adherence to antiretroviral treatment and associated factors among people living with HIV at the Department of Community Counseling and Support in Binh Thanh district, Ho Chi Minh city in 2021", *Journal of University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City*, **26(2)**, pp.220-226 (in Vietnamese).
- [12] N.L. Chinh, P.T. Hien (2021), *Adherence to Treatment in Children with HIV/AIDS in an Outpatient Clinic, Vietnam National Children's Hospital (2020-2021)*, Vietnam National Children's Hospital (in Vietnamese).

Chế tạo và đánh giá một số đặc tính của chế phẩm gel trung bì da hướng ứng dụng trong y học tái tạo

Trần Lê Bảo Hà^{1*}, Đoàn Nguyên Vũ¹, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ¹, Tô Minh Quân¹, Lê Thị Vĩ Tuyết¹, Nguyễn Thuần Nho¹, Trương Thanh Vy¹, Nguyễn Thị Hồng Thắm¹, Vũ Thị Thanh Tâm², Phan Hữu Hùng³, Lê Quang Trí²

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bệnh viện Quân y 7A, 466 Nguyễn Trãi, phường 8, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Bệnh viện Quân dân y miền Đông, 50 Lê Văn Việt, phường Hiệp Phú, quận 9, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/9/2023; ngày chuyển phân biện 5/9/2023; ngày nhận phân biện 25/9/2023; ngày chấp nhận đăng 28/9/2023

Tóm tắt:

Mục tiêu: Mối liên hệ chặt chẽ tế bào - khung ngoại bào (ECM - Extracellular matrix) là nền tảng của quá trình phát triển và sửa chữa của mô. Khung nâng đỡ mô phỏng những tính chất sinh học của ECM trong cơ thể sinh vật. ECM của lớp trung bì da là một loại vật liệu tự nhiên, chứa thành phần lý tưởng rất thích hợp cho việc tạo ra các sản phẩm thúc đẩy quá trình chữa lành mô. Nghiên cứu này tập trung chế tạo chế phẩm gel từ ECM trung bì da người. ECM da được tạo gel bằng cách hòa tan trong dung dịch enzyme pepsin. Phương pháp nghiên cứu: Quá trình tạo gel 3D bằng cách trung hòa dung dịch enzyme và ủ ở điều kiện sinh lý. Mẫu gel được đánh giá độ nhớt, khả năng định hình. Ngoài ra, chế phẩm gel từ trung bì da được đánh giá về ảnh hưởng lên sự sống và khả năng tăng sinh của nguyên bào sợi người *in vitro* bằng thử nghiệm độc tính và thử nghiệm tăng sinh trong 10 ngày. Kết quả: Đánh giá độc tính trực tiếp và dịch chiết đã cho thấy chế phẩm gel ECM an toàn đối với sự sống của nguyên bào sợi. Đồng thời, các nguyên bào sợi thể hiện đặc tính tăng sinh sau 10 ngày trong điều kiện nuôi cấy với dịch chiết chế phẩm gel. Kết luận: Các kết quả này chỉ ra chế phẩm gel ECM có khả năng ảnh hưởng tích cực đến đặc tính sinh học của tế bào và có tiềm năng ứng dụng vào lĩnh vực y học tái tạo.

Từ khóa: khung ngoại bào, nguyên bào sợi, trung bì da, y học tái tạo.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Y học tái tạo là một nhánh của y học, tập trung phát triển các phương pháp tái tạo, sửa chữa hoặc thay thế các tế bào, mô hoặc cơ quan bị tổn thương hay khuyết hỏng. Y học tái tạo bao gồm các ứng dụng liệu pháp phân tử, tế bào, mô hay cơ quan nhân tạo. Từ đó cung cấp các giải pháp thay thế cho ghép mô, tạng tự thân hay đồng loài. Đặc biệt, công nghệ chế tạo vật liệu sinh học đóng vai trò chủ chốt trong y học tái tạo, với mục tiêu tạo ra vật liệu mang các đặc tính gần với điều kiện mô *in vivo*, vật liệu có thành phần dinh dưỡng/nhân tố tín hiệu hỗ trợ quá trình tái tạo mô. ECM là nhân tố xương sống của mô, giúp duy trì cấu trúc mô, liên kết các tế bào và giữ chúng trong cấu trúc mô, đồng thời tham gia điều hòa các hoạt động chuyên hóa và phát triển của mô. Các thành phần có hoạt tính sinh học điển hình cấu tạo nên ECM được biết đến bao gồm collagen, elastin, laminin, fibronectin và glycosaminoglycan (GAG). Chính vì vậy, ECM đã được nghiên cứu làm vật liệu sinh học cho nhiều ứng dụng tái tạo. ECM có thể được thu nhận từ quá trình khử tế bào mô, cơ quan, do đó giảm thiểu nguy cơ bị thải loại sau cấy ghép [1, 2]. Các thành phần protein hoạt tính sinh học của ECM đóng vai trò cảm ứng cho quá trình sáp nhập và tái tạo mô mới.

Vật liệu sinh học có nguồn gốc từ ECM đã được chứng minh về vai trò cung cấp vi môi trường cho sự phát triển của tế bào, cho phép duy trì hình thái, sinh lý và chức năng của tế bào. Trong số này, các chế phẩm hydrogel, gọi tắt là chế phẩm gel đã trở thành một đối tượng tiềm năng trong ứng dụng y học tái tạo, nhờ vào tính

linh hoạt của các đặc điểm vật lý, sự tương đồng về cấu trúc với ECM tự nhiên và khả năng hỗ trợ sự kết dính, tồn tại và tăng sinh của tế bào [3, 4]. Các nghiên cứu cho thấy, ECM thu nhận từ mô đã khử tế bào có thể được hóa lỏng bằng enzyme pepsin và tạo thành dạng khối gel với các đặc tính cơ học và sinh lý tương thích với quá trình nuôi cấy tế bào [3-5]. Các chế phẩm gel từ ECM được hóa lỏng bằng enzyme giữ lại các protein kết dính tế bào (collagen và elastin), glycosaminoglycans và các yếu tố tăng trưởng [6]. ECM của lớp trung bì da là một loại vật liệu tự nhiên, chứa thành phần lý tưởng rất thích hợp cho việc tạo ra các sản phẩm thúc đẩy nhanh quá trình chữa lành các vết thương, vết bỏng. Ngoài ra, cấu trúc và chức năng của ECM đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu về khả năng hỗ trợ tăng sinh của tế bào.

Dựa trên các cơ sở nêu trên, nghiên cứu này tập trung chế tạo chế phẩm gel từ ECM trung bì da người. ECM trung bì da người được khảo sát khả năng hóa lỏng trong dung dịch enzyme và hiệu quả tạo gel *in vitro*. Ngoài ra, chế phẩm gel được đánh giá về ảnh hưởng lên sự sống và tăng sinh của các tế bào *in vitro* nhằm dự đoán về tiềm năng các ứng dụng trong y học tái tạo.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

ECM từ trung bì và nguyên bào sợi da người được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: Email: tlbha@hcmus.edu.vn

Fabrication and evaluation of some characteristics of the skin's dermis gel direction to application in regenerative medicine

Le Bao Ha Tran^{1*}, Nguyen Vu Doan¹, Thi Ngoc My Nguyen¹, Minh Quan To¹, Thi Vi Tuyet Le¹, Thuan Nho Nguyen¹, Thanh Vy Truong¹, Thi Hong Tham Nguyen¹, Thi Thanh Tam Vu², Huu Hung Phan³, Quang Tri Le²

¹University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

²7A Military Hospital,

466 Nguyen Trai Street, Ward 8, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Eastern People Military Hospital,

50 Le Van Viet Street, Hiep Phu Ward, District 9, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 1 September 2023; revised 25 September 2023; accepted 28 September 2023

Abstract:

Objective: The tight connection between the cell-extracellular matrix (ECM - Extracellular matrix) is the foundation of tissue development and repair. The extracellular framework simulates the biological properties of organism-based ECM. The ECM of the skin's dermis is a natural material, containing ingredients ideal for creating products that help tissue heal. This study focuses on the production of gel products from human skin ECM. The skin ECM is gelled by dissolving in a pepsin enzyme solution. **Method:** 3D gel formation process using neutral enzyme solution and incubation under physiological conditions. Gel samples were evaluated for speed and formability. Additionally, the dermal gel preparation was evaluated for its effects on the survival and proliferation of human fibroblasts *in vitro* by toxicity testing and proliferation testing, for 10 days. **Results:** Direct and extract toxicity assessments showed that the ECM gel regimen was safe for fibroblast survival. At the same time, fibroblasts had proliferation properties after 10 days in culture conditions with gel extract. **Conclusion:** These results showed that the ECM gel product regimen has the ability to positively impact the biological properties of cells and has the potential for application in the field of regenerative medicine.

Keywords: dermis, extracellular framework, fibroblasts, regenerative medicine.

Classification number: 3.4

Nguyên bào sợi được nuôi bằng môi trường nuôi cấy đầy đủ. Thành phần môi trường nuôi cấy đầy đủ bao gồm môi trường cơ bản DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được bổ sung thêm huyết thanh bào thai bò 10% (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) và kháng sinh Penicilin 100 UI/ml, Streptomycin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp tạo chế phẩm gel từ ECM trung bì da

Mẫu ECM ở dạng khô được nghiền bằng máy nghiền mẫu (Omni, Hoa Kỳ) và rây để tạo hạt ECM có kích thước dưới 250 µm. Hạt ECM (hàm lượng 20 mg/ml) được hòa lỏng bằng cách khuấy trong dung dịch pepsin/HCl (pepsin 4 mg/ml và HCl 0,01 N) (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), kéo dài 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp ECM-pepsin được giữ lạnh 4°C trong 20 phút và bất hoạt bằng dung dịch NaOH 0,1 N (Merck, Đức) (theo tỷ lệ v/v là 10/1) và dung dịch muối đệm phosphat (Phosphate buffer saline - PBS, Merck, Đức) (pH 7,4-7,8). Dung dịch sau khi trung hòa được gọi là dung dịch tiền gel. Để tạo thành chế phẩm gel, dung dịch tiền gel được ủ ở điều kiện sinh lý 37°C (tủ ấm Panasonic, Nhật Bản).

2.3. Thử nghiệm đảo ngược đánh giá hiệu quả chế tạo chế phẩm gel

Dung dịch tiền gel ECM sau khi tạo ra được chuyển vào các lọ thủy tinh và ủ ấm ở 37°C để khảo sát thời gian gel hóa trong 20 phút. Thử nghiệm đảo ngược được thực hiện để đánh giá hiệu quả tạo gel.

2.4. Phương pháp đánh giá độc tính gián tiếp

Thử nghiệm MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) được thực hiện nhằm xác định độc tính của dịch chiết chế phẩm gel đối với nguyên bào sợi người. Các nghiệm thức bao gồm: (1) Dịch chiết chế phẩm gel (chuẩn bị theo tiêu chuẩn ISO 10993-12 (3 cm²/ml môi trường nuôi cấy) [7]); (2) Môi trường nuôi cấy tế bào có bổ sung DMSO 20% được sử dụng là đối chứng dương; (3) Môi trường nuôi cấy là đối chứng âm.

Các tế bào được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 10⁴ tế bào/giếng. Sau 24 giờ, khi tế bào phủ 80% bề mặt giếng nuôi, 100 µl dịch chiết (hoặc đối chứng âm, đối chứng dương) được bổ sung vào giếng và nuôi cấy ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ (Panasonic, Nhật Bản). Sau 24 giờ, thử nghiệm MTT được tiến hành bằng cách ủ tế bào với 100 µl MTT 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) trong 4 giờ ở điều kiện 37°C. Sự hình thành tinh thể formazan ở các giếng nuôi được quan sát và ghi nhận bằng kính hiển vi đảo ngược có liên kết hệ thống chụp ảnh (Olympus, Nhật Bản).

Tiếp theo, MTT được loại bỏ và 100 µl DMSO/Ethanol (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được bổ sung vào mỗi giếng. Dung dịch thử nghiệm được đo độ hấp thụ quang học (OD) ở bước sóng 570 nm (Biochrom EZ Read, Anh). Tốc độ tăng trưởng tương đối (RGR) được tính theo công thức: %RGR = (OD mẫu nghiệm thức)/(OD mẫu chứng âm) x 100%. Theo ISO 10993-5, mẫu thử nghiệm được cho là không gây độc cho tế bào khi giá trị % RGR từ 70% trở lên [8].

2.5. Phương pháp đánh giá độc tính trực tiếp

Chế phẩm gel được đánh giá độc tính trực tiếp bằng cách đặt mẫu tiếp xúc với các nguyên bào sợi. Các nhóm nghiệm thức bao gồm: (1) Màng cao su latex là đối chứng dương; (2) Chế phẩm gel; (3) Màng protein thương mại là đối chứng âm. Theo đó, tế bào được cấy vào đĩa 6 giếng với mật độ 5x10⁴ tế bào/giếng và nuôi 24 giờ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sau đó, chế phẩm gel được đặt trực tiếp lên bề mặt lớp tế bào (diện tích mẫu xấp xỉ 1/10 bề mặt đĩa) và

tiếp tục nuôi trong 24 giờ. Kết quả được ghi nhận bằng cách quan sát đĩa dưới kính hiển vi đảo ngược (Olympus, Nhật Bản). Mức độ gây độc tế bào dưới kính hiển vi dựa theo tiêu chuẩn ISO 10993-5:2009. Theo đó, phản ứng ở cấp độ 0-2, vật liệu xem như không gây độc đối với tế bào [2].

2.6. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm gel đến khả năng tăng sinh của tế bào *in vitro*

Dịch chiết chế phẩm gel được chuẩn bị bằng ngâm ủ mẫu trong môi trường nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh (với tỷ lệ 0,2 g/ml) theo tiêu chuẩn ISO 10993-12 [7]. Nguyên bào sợi người được cấy vào các giếng của đĩa 96 giếng với mật độ 10^4 tế bào/cm², được ủ trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ, môi trường trong các giếng được thay mới bằng dịch chiết chế phẩm gel và các nhóm đối chứng tương ứng. Sự tăng sinh của tế bào trong mỗi nghiệm thức vào các ngày 2, 4, 6, 8 và 10 được đánh giá bằng kính hiển vi đảo ngược và thử nghiệm MTT. Môi trường nuôi cấy có huyết thanh được sử dụng làm đối chứng dương (C+). Môi trường nuôi cấy không huyết thanh được dùng làm đối chứng âm (C-).

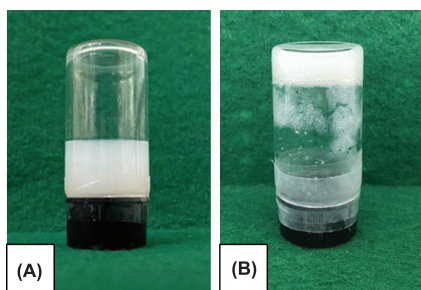
2.7. Xử lý thống kê

Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bởi phần mềm Graphpad prism 9.5.0. Dữ liệu được trình bày dưới dạng $\pm$ độ lệch chuẩn. Sự khác biệt thống kê được chấp nhận là có ý nghĩa khi giá trị $p < 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả thử nghiệm đảo ngược

Kết quả về sự chuyển đổi trạng thái lỏng - gel (sol-gel) được đánh giá trực tiếp bằng cách đảo ngược ống mẫu. Kết quả thử nghiệm đảo ngược cho thấy, sau 20 phút ủ ấm dung dịch tiền gel ECM, chế phẩm gel được hình thành. Bằng chứng là sản phẩm được ủ ấm không bị rơi sau thử nghiệm đảo ngược (hình 1) và có hình dạng của vật chứa. Sau khi được đưa trở về nhiệt độ phòng, sản phẩm vẫn bám chặt ở thành ống, chưa trở về trạng thái lỏng sau 30 phút khảo sát. Kết quả cho thấy, chế phẩm gel được hình thành sau tác động ủ ấm ở 37°C và hiện tượng tái chuyển đổi thành dạng lỏng xảy ra chậm và chưa thể đạt được trạng thái hóa lỏng sau 30 phút khảo sát. Điều này chứng minh rằng gel ECM có độ bền tốt và cấu trúc gel ổn định.



Hình 1. Kết quả thử nghiệm đảo ngược. (A) Dung dịch tiền gel (dạng lỏng trước khi ủ); **(B)** Chế phẩm gel (dạng gel sau khi ủ).

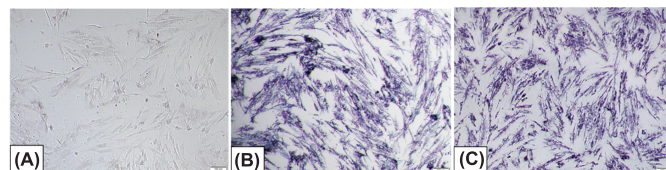
Thử nghiệm đảo ngược là phương pháp đơn giản nhất được sử dụng để nghiên cứu điểm tạo gel của dung dịch cũng như xem xét khả

năng duy trì khối gel theo thời gian [9]. Từ kết quả nghiên cứu có thể thấy, chế phẩm gel có nguồn gốc ECM trung bì da người được chế tạo thành công và duy trì cấu trúc này theo thời gian. Sự hình thành gel ECM là một quá trình tự lắp ráp dựa trên collagen được điều hòa một phần bởi sự hiện diện của các glycosaminoglycan, proteoglycan và protein ECM. Do đó, động học trùng hợp sẽ bị ảnh hưởng bởi đặc điểm sinh hóa tự nhiên của nguồn mô và của các protein còn lại sau quá trình khử tế bào thu ECM và hóa lỏng. ECM trung bì da người được cấu tạo chủ yếu từ collagen I và III, cùng với các thành phần khác như elastin, các glycoprotein và glycosaminoglycan [10]. Các thành phần này đã được chứng minh là giúp gia tăng đáng kể độ bền cơ học của gel [11].

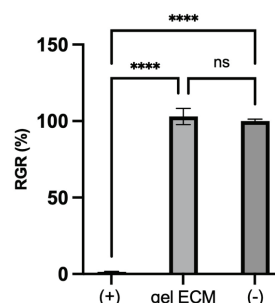
3.2. Kết quả đánh giá độc tính *in vitro*

Thử nghiệm độc tính tế bào là một trong những xét nghiệm đánh giá và sàng lọc vật liệu sinh học bằng cách sử dụng các tế bào *in vitro*. Thử nghiệm đánh giá gián tiếp thông qua dịch chiết và tiếp xúc trực tiếp là các thử nghiệm đánh giá tính độc phổ biến và được đề xuất trong tiêu chuẩn ISO 10993-5.

Trong thử nghiệm đánh giá độc tính gián tiếp thông qua dịch chiết, về mặt hình thái, tế bào được nuôi trong dịch chiết gel ECM bám trải hình thái thuần dài (hình 2B), hình thái đặc trưng của nguyên bào sợi. Hình thái này tương đồng với hình thái tế bào trong nghiệm thức đối chứng âm (hình 2C). Ngược lại, tế bào có hiện tượng bong tróc khỏi bề mặt nuôi cấy và co tròn ở nghiệm thức đối chứng dương. Hơn nữa, sự xuất hiện của tinh thể formazan cũng giúp khẳng định sự sống sót của tế bào. Cụ thể, ở nghiệm thức đối chứng âm và mẫu dịch chiết chế phẩm gel, tinh thể formazan màu tím được hình thành với mật độ cao (hình 2B và 2C); ngược lại, ở nhóm dịch chiết DMSO 20% (đối chứng dương) không xuất hiện tinh thể formazan (hình 2A). Mặt khác, kết quả tốc độ RGR cho thấy, cả chế phẩm gel và đối chứng âm đều cho tỷ lệ RGR cao trên 70% ($p < 0,05$) (hình 3). Kết quả này trái ngược với nghiệm thức đối



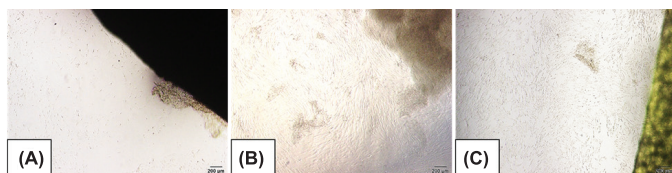
Hình 2. Hình thái tế bào sau khi nhuộm MTT. (A) Nghiệm thức đối chứng dương; **(B)** Nghiệm thức chế phẩm gel; **(C)** Nghiệm thức đối chứng âm.



Hình 3. Đồ thị tỷ lệ RGR của tế bào ở các nghiệm thức. (+): đối chứng dương; **(-):** đối chứng âm.

chứng dương. Từ đó có thể nhận định rằng, gel ECM không gây độc cho tế bào nguyên bào sợi người ở đánh giá độc tính gián tiếp thông qua dịch chiết.

Bên cạnh đó, đánh giá độc tính trực tiếp cũng đã được thực hiện, kết quả một lần nữa khẳng định tính an toàn của chế phẩm gel. Kết quả thử nghiệm cho thấy, sau 24 giờ tế bào tiếp xúc với vật liệu, tế bào tại vị trí tiếp xúc, xung quanh và ngay bên dưới vật liệu vẫn tiếp tục bám dính, không bong tróc ở 2 nghiệm thức đối chứng âm và chế phẩm gel. Về mặt hình thái, tế bào có hình dạng thuôn dài, thể hiện tế bào vẫn phát triển tốt sau khi tiếp xúc trực tiếp với gel hay đối chứng âm (hình 4B và 4C). Điều này tương đồng với mức phản ứng 0 theo tiêu chuẩn ISO 10993-5. Ngược lại, ở nghiệm thức đối chứng dương, tế bào xung quanh vật liệu có hiện tượng bong tróc. Ngay tại vị trí tiếp xúc với màng latex đối chứng dương, mật độ tế bào dần thưa sau 24 giờ, chủ yếu phân bố ở những vị trí không tiếp xúc gần với vật liệu (mức phản ứng 4, ISO 10993-5) (hình 4A). Từ quan sát này có thể nhận định rằng, chế phẩm gel không độc đối với tế bào thông qua thử nghiệm đánh giá độc tính tiếp xúc trực tiếp.

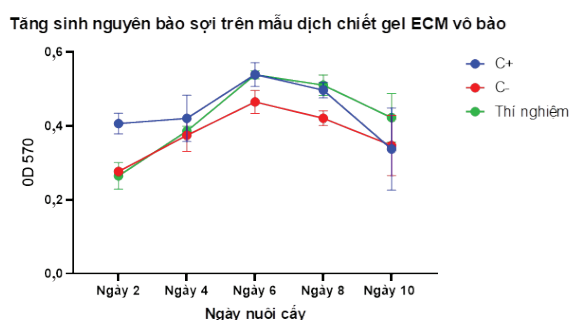


Hình 4. Thử nghiệm độc tính tiếp xúc trực tiếp. (A) Nghiệm thức đối chứng dương; (B) Nghiệm thức chế phẩm gel; (C) Nghiệm thức đối chứng âm.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, chế phẩm gel không gây độc cho nguyên bào sợi người *in vitro* trong cả 2 thử nghiệm đánh giá tính độc của vật liệu, bao gồm gián tiếp thông qua dịch chiết và tiếp xúc trực tiếp. Trên cơ sở này, chế phẩm gel được đánh giá là đạt tính an toàn trong thử nghiệm *in vitro* và tiếp tục được ứng dụng cho các nghiên cứu, đánh giá tiếp theo.

3.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm gel đến khả năng tăng sinh của tế bào

Kết quả được thể hiện ở hình 5 với mật độ quang tăng dần từ ngày 2 đến ngày 6 và giảm dần đến ngày 10 ở tất cả các mẫu. Ở ngày 2, mẫu đối chứng dương (C+) cho thấy sự tăng sinh tế bào tốt hơn 2 mẫu còn lại, do mẫu này có huyết thanh hỗ trợ tăng sinh.



Hình 5. Đồ thị biểu thị sự tăng sinh của nguyên bào sợi trong dịch chiết chế phẩm gel.

Tuy nhiên, sự tăng sinh tế bào của mẫu thí nghiệm cũng diễn ra khá nhanh và tương đương với giá trị mẫu đối chứng dương (C+) ở ngày 6 và 8 ($p > 0,05$). Trong khi đó, mẫu chứng âm (C-) có sự tăng sinh tế bào thấp hơn mẫu chứng dương (C+) và mẫu thí nghiệm ở ngày 6 và 8. Nghiên cứu của S. Uriel và cs (2009) [12] cũng cho thấy, việc tăng sinh của tế bào dưới tác động của dịch chiết gel từ ECM mô mềm trong khoảng ngày 5 đến 7 của quá trình nuôi cấy. Điều này cho thấy chế phẩm gel đã hỗ trợ cho sự tăng sinh của nguyên bào sợi người.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã chế tạo thành công chế phẩm gel từ ECM trung bì da người. Chế phẩm gel có khả năng định hình khi được ủ ở điều kiện sinh lý với nhiệt độ 37°C. Chế phẩm gel không gây độc và có tác động tích cực đến sự tăng sinh của các nguyên bào sợi người *in vitro*. Các kết quả này chỉ ra chế phẩm gel ECM trung bì da người có tiềm năng ứng dụng vào lĩnh vực y học tái tạo.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Bộ Quốc phòng trong khuôn khổ Đề tài mã số 46.46.22. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.M. Aamodt, D.W. Grainger (2016), "Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response", *Biomaterials*, **86**, pp.68-82, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.003.
- [2] T.K. Rajab, T.J. O'Malley, V. Tchanchaleishvili (2020), "Decellularised scaffolds for tissue engineering: Current status and future perspective", *Artif Organs*, **44**(10), pp.1031-1043, DOI: 10.1111/aor.13701.
- [3] L.T. Saldin, M.C. Cramer, S.S. Velankar, et al. (2017), "Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function", *Acta Biomaterialia*, **49**, pp.1-15, DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.068.
- [4] R.S. Stowers (2022), "Advances in extracellular matrix-mimetic hydrogels to guide stem cell fate", *Cells Tissues Organs*, **211**(6), pp.703-720, DOI: 10.1159/000514851.
- [5] X. Li, Q. Sun, Q. Li, et al. (2018), "Functional hydrogels with tunable structures and properties for tissue engineering applications", *Frontiers in Chemistry*, **6**, pp.1-20, DOI: 10.3389/fchem.2018.00499.
- [6] J.A. Claudio-Rizo, J. Delgado, I.A. Quintero-Ortega, et al. (2018), "Decellularized ECM-derived hydrogels: Modification and properties", *Hydrogels*, **1**, pp.1-22, DOI: 10.5772/intechopen.78331.
- [7] R.F. Wallin (1998), "A practical guide to ISO 10993-12: Sample preparation and reference materials", *Medical Device Diagnostic Industry*, <https://www.mddionline.com/materials/a-practical-guide-to-iso-10993-12-sample-preparation-and-reference-materials>, accessed 2 October 2023.
- [8] R.F. Wallin, E. Arscott (1998), "A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity", *Medical Device Diagnostic Industry*, <https://www.mddionline.com/testing/a-practical-guide-to-iso-10993-5-cytotoxicity>, accessed 2 October 2023.
- [9] M. Djabourov (1991), "Gelation - A review", *Polymer International*, **25**, pp.135-143, DOI: 10.1002/pi.4990250302.
- [10] P.S. Briquez, J.A. Hubbell, M.M. Martino (2015), "Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for skin wound healing", *Advances in Wound Care*, **4**(8), pp.479-489, DOI: 10.1089/wound.2014.0603.
- [11] B. Patel, Z. Xu, C.B. Pinnock, et al. (2018), "Self-assembled collagen-fibrin hydrogel reinforces tissue-engineered adventitia vessels seeded with human fibroblasts", *Scientific Reports*, **8**(1), DOI: 10.1038/s41598-018-21681-7.
- [12] S. Uriel, E. Labay, M.F. Sedlak, et al. (2009), "Extraction and assembly of tissue-derived gels for cell culture and tissue engineering", *Tissue Engineering Part C: Methods*, **15**(3), pp.309-321, DOI: 10.1089/ten.tec.2008.0309.

Ảnh hưởng của Demecolcine và thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Hoàng Thị Âu¹, Phạm Thị Kim Yến¹, Vũ Thị Thu Hương¹, Lê Văn Đạt¹, Nguyễn Thị Lan Anh¹,
Giang Thị Thanh Nhân¹, Phạm Doãn Lâm², Lưu Quang Minh³, Nguyễn Khánh Vân^{1*}

¹Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Chăn nuôi, 9 Tân Phong, phường Thụy Phương, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Chăn nuôi, 9 Tân Phong, phường Thụy Phương, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

³Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/9/2023; ngày chuyển phản biện 21/9/2023; ngày nhận phản biện 11/10/2023; ngày chấp nhận đăng 16/10/2023

Tóm tắt:

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, nồng độ Demecolcine ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Nhóm 4 μM Demecolcine có tỷ lệ tế bào trứng có khối hình nón cao hơn so với nhóm 0, 6 và 8 μM (tương ứng 72,03 so với 1,98, 59,42 và 51,01%, $p<0,05$). Tỷ lệ phân chia, phôi nang của nhóm 4 μM Demecolcine cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 6 và 8 μM ($p<0,05$). Thời gian xử lý với Demecolcine ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Tỷ lệ phân chia, phôi nang của nhóm 1 giờ cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 0,5, 2 và 3 giờ (tương ứng 84,68 so với 70,92, 73,86 và 60,36%; 24,91 so với 13,62%, 17,26 và 10,63%, $p<0,05$). Thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng lợn ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Tỷ lệ tế bào trứng có khối hình nón ở nhóm 20 giờ là cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 18 và 22 giờ (tương ứng 85,34 so với 60,04 và 72,03%, $p<0,05$). Tỷ lệ phân chia, phôi nang ở nhóm 18 giờ thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm 20 và 22 giờ (tương ứng 66,12 so với 85,42 và 84,68%; 13,71 so với 25,48 và 24,91%, $p<0,05$). Kết luận, Demecolcine và thời gian nuôi thành thực *in vitro* có ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Từ khóa: Demecolcine, phôi lợn Ỉ nhân bản, thành thực *in vitro*.

Chỉ số phân loại: 4.2

1. Đặt vấn đề

Mặc dù đã có nhiều báo cáo nói về việc tạo được động vật nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân tế bào soma (SCNT) ở một số loài động vật, tuy nhiên hiệu quả của phương pháp này vẫn còn thấp. Theo G.P. Malenko và cs (2015) [1], tỷ lệ tạo con non nhân bản ở các loài động vật $<5\%$. Các nhà nghiên cứu đã thực hiện nhiều thí nghiệm nhằm cải thiện hiệu quả tạo phôi và động vật nhân bản. Để nâng cao hiệu quả việc tạo phôi động vật nhân bản, các nhà nghiên cứu đã sử dụng phương pháp tạo phôi nhân bản không có màng sáng và được ứng dụng thành công ở một số động vật như bò, ngựa và lợn [2-4]. Tạo phôi nhân bản từ tế bào trứng không có màng sáng đơn giản, hiệu quả hơn từ tế bào trứng có màng sáng [5]. Số lượng phôi nang nhân bản được tạo ra bằng phương pháp tạo phôi nhân bản không có màng sáng bằng hoặc cao hơn so với phương pháp tạo phôi nhân bản có màng sáng.

Một trong những yếu tố quan trọng đảm bảo cho sự thành công của quá trình tạo phôi nhân bản SCNT không có màng sáng chính là việc loại bỏ toàn bộ vật liệu di truyền có trong nhân của tế bào trứng nhận. Nguyên nhân là do khi loại nhân thì cũng đồng thời loại bỏ một số thành phần quan trọng có trong tế bào chất, qua đó có thể làm giảm khả năng sống của tế bào trứng nhận và ảnh hưởng tới hiệu quả tạo phôi nhân bản [6]. Demecolcine là một chất hóa học thường được sử dụng trong quá trình loại nhân tế bào trứng không có màng sáng, nó có tác dụng đẩy phần nhân

ra sát ngoại vi tế bào chất tạo thành một khối hình cầu, qua đó giúp kỹ thuật viên có thể dễ dàng nhận biết được vị trí nhân tế bào trứng dưới kính hiển vi soi nổi thông thường, từ đó dễ dàng loại bỏ phần tế bào chất có chứa nhân. Việc lựa chọn được nồng độ, thời gian tiếp xúc thích hợp của tế bào trứng với Demecolcine trước khi loại nhân giúp nâng cao hiệu quả tạo phôi nhân bản SCNT không có màng sáng.

Hiệu quả tạo phôi nhân bản sẽ được nâng cao khi sử dụng tế bào trứng có nhân thành thực ở giai đoạn MII. Thêm vào đó, tế bào chất của tế bào trứng nhận cũng phải ở giai đoạn thành thực để tế bào trứng sau khi đã được loại nhân và cấy chuyển nhân tế bào soma có thể hoàn thiện được quá trình phát triển tiếp theo của mình. Sau khi được cấy chuyển nhân và kích hoạt, phôi SCNT sẽ trải qua một số quá trình như tái tạo nhân và tái lập trình nhân. Quá trình này đòi hỏi sự có mặt của một số protein đặc hiệu có trong tế bào chất thành thực. Nhiều protein nằm trong nhân tế bào cho được giải phóng vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận và ngược lại một số protein khác có trong tế bào chất của tế bào trứng nhận sẽ được nhân tế bào cho thu nhận [7]. Trong quá trình tạo phôi lợn nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân SCNT, nguồn tế bào trứng nhận có thể là tế bào trứng thành thực *in vitro* [8] hoặc được thu từ *in vivo* [9]. Tuy nhiên, do số lượng tế bào trứng cần phải dùng cho quá trình tạo phôi SCNT và lợn con nhân bản lớn nên việc sử dụng tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* là một lựa chọn hàng đầu [8]. Tế bào trứng được thu và lựa chọn từ buồng trứng lợn ở lò mổ, sau đó được lựa chọn và nuôi thành

*Tác giả liên hệ: Email: cotihin@gmail.com

Effects of demecolcine and oocyte maturation time on the efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied pig embryos

Thi Au Hoang¹, Thi Kim Yen Pham¹, Thi Thu Huong Vu¹,
Van Dat Le¹, Thi Lan Anh Nguyen¹, Thi Thanh Nhan Giang¹,
Doan Lan Pham², Quang Minh Luu³, Khanh Van Nguyen^{1*}

¹Key Laboratory of Animal Cell Technology, National Institute of Animal Science,
9 Tan Phong Street, Thuy Phuong Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Animal Science,

9 Tan Phong Street, Thuy Phuong Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

³Ministry of Science and Technology,

113 Tran Duy Hung Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 18 September 2023; revised 11 October 2023; accepted 16 October 2023

Abstract:

The results of this study showed that the concentration of Demecolcine affected efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied pig embryos. The 4 μ M Demecolcine group resulted in a greater oocyte extrusion cones rate in comparison to 0, 6, and 8 μ M groups (72.03 vs 1.98%, 59.42, and 51.01%, $p < 0.05$, respectively). The cleavage rate and blastocyst rate in the 4 μ M Demecolcine group were significantly higher than in the 6 and 8 μ M groups ($p < 0.05$). Demecolcine treatment time affected efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied cloned pig embryos. The cleavage and blastocyst rates of the 1 h group were significantly higher than that of the 0.5, 2 and 3 h (84.68 vs 70.92%, 73.86, and 60.36%; 24.91 vs 13.62%, 17.26 vs 10.63%, $p < 0.05$, respectively). The oocyte maturation time of porcine oocytes affected the production efficiency of Vietnamese pot-bellied cloned pig embryos. The oocyte extrusion cone rate of the 20 h group was significantly higher than that of the 18 and 22 h groups (85.34 vs 60.04, and 72.03%, $p < 0.05$, respectively). The cleavage rate and blastocyst rate in the 18 h group were significantly lower than that in the 20 and 22 h groups (66.12 vs 85.42, and 84.68%; 13.71 vs 25.48, and 24.91%, $p < 0.05$, respectively). In conclusion, Demecolcine and oocyte maturation time had effects on the efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied pig embryos.

Keywords: Demecolcine, maturation *in vitro*, Vietnamese pot-bellied pig embryos.

Classification number: 4.2

thực *in vitro*. Tế bào trứng nhận sử dụng cho quá trình SCNT có nguồn gốc từ lò mổ nên sẽ có nhân ở các giai đoạn khác nhau trước khi được nuôi thành thực. Chính vì vậy, việc lựa chọn thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi nhân bản. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá được ảnh hưởng của Demecolcine và thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đồng pha nguyên bào sợi lợn Ỉ: Phương pháp đồng pha nguyên bào sợi lợn Ỉ được thực hiện theo mô tả của V.K. Nguyen và cs (2021) [10]. Để đưa nhân của nguyên bào sợi lợn Ỉ về giai đoạn G0/G1 trước khi cấy chuyển, nguyên bào sợi lợn Ỉ ở lần cấy chuyển thứ 5-10 (độ phủ kín 80-90% đáy đĩa nuôi) được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 0,2% huyết thanh thai bê trong 48 giờ.

Nuôi tế bào trứng lợn thành thực *in vitro*: Buồng trứng lợn thu từ lò mổ được bảo quản ở 30-35°C trong dung dịch PBS có bổ sung 100 IU penicilin/ml, 0,1 mg streptomycin/ml và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 2-3 giờ. Thu tế bào trứng lợn từ những nang trứng có đường kính 3-6 mm trên buồng trứng bằng phương pháp chọc hút. Tế bào trứng lợn sau khi thu và lựa chọn được nuôi trong đĩa 4 giếng chứa môi trường POM1 có bổ sung EGF (10 ng/ml), eCG (1000 IU/ml), hCG (1000 IU/ml) và 1 mM dbcAMP (50 tế bào trứng/giếng) trong vòng 20-22 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, độ ẩm không khí bão hòa. Sau 20-22 giờ, tế bào trứng được chuyển sang nuôi trong môi trường POM2 có bổ sung EGF (10 ng/ml), eCG (1000 IU/ml) và hCG (1000 IU/ml) ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, độ ẩm không khí bão hòa.

Loại nhân tế bào trứng lợn: Sau 40-44 giờ nuôi thành thực *in vitro*, các tế bào trứng được loại bỏ toàn bộ lớp tế bào cận nhân trong môi trường TALP-HEPES có bổ sung 0,1% hyaluronidase và lựa chọn các tế bào trứng lợn thành thực cho quá trình loại nhân. Tế bào trứng thành thực sau nuôi thành thực *in vitro* là những tế bào trứng có sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Quá trình loại nhân được thực hiện theo phương pháp của S.M. Hosseini và cs (2013) [11] có cải biến. Tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* trước khi loại nhân sẽ được chuyển sang môi trường loại bỏ màng sáng có chứa 1,5 μ g/ml pronase trong vòng 3-6 phút. Sau khi đã loại bỏ hoàn toàn màng sáng, tế bào trứng được rửa 3 lần trong môi trường TALP-HEPES + 10% huyết thanh thai bê, sau đó chuyển sang môi trường PZM3 có bổ sung Demecolcine. Sau khi xử lý với Demecolcine, lựa chọn những tế bào trứng có khối lõi nhân hình nón để loại nhân trong môi trường TALP-HEPES có chứa 0,5 μ g/ml Cytochalasin B. Loại bỏ một phần nhỏ tế bào chất (5-10% thể tích tế bào trứng) có chứa hình nón lõi ra trên màng tế bào trứng bằng micro pipette dưới kính hiển vi soi nổi có độ phóng đại 100 lần.

Cấy chuyển nhân SCNT (nguyên bào sợi): Tế bào trứng sau loại nhân được chuyển vào dung dịch chứa 1 mg/ml Phytohemagglutinin (PHA) trong 2-3 giây để dính với 1 tế bào cho (nguyên bào sợi lợn Ỉ) và tạo cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận. Cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận sau khi đã dính với nhau được chuyển sang dung dịch dung hợp, để 2-3 phút cho đến khi tế bào chìm hẳn xuống đáy đĩa thì chuyển sang buồng dung hợp có chứa môi trường dung hợp và kết nối với máy dung hợp để dung hợp ở 1,2 kV/cm trong thời gian 30 μ s. Sau dung hợp các cặp tế

bào cho - tế bào trứng nhận được chuyển vào môi trường PZM3 ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 2 giờ lựa chọn các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận đã dung hợp được để hoạt hóa tái cấu trúc.

Hoạt hóa tế bào trứng sau cấy chuyển nhân và nuôi phôi in vitro: Các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận đã dung hợp sẽ được xung điện lại ở 1 kV/cm trong thời gian 80 μ s tại thời điểm 2 giờ sau dung hợp, sau đó chuyển sang môi trường hoạt hóa PZM3 có bổ sung 7,5 μ g/ml CyB trong vòng 3 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 3 giờ trong môi trường hoạt hóa, các hợp tử giả định sẽ được chuyển sang nuôi trong hệ thống microwell có chứa môi trường PZM3 ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Bổ sung 10% huyết thanh thai bê vào môi trường nuôi PZM3 ở ngày thứ 5 sau hoạt hóa (ngày hoạt hóa được coi là ngày 0). Đánh giá khả năng phân chia, tạo phôi nang ở ngày thứ 2 và thứ 7 sau hoạt hóa.

Phương pháp nhuộm Hoechst 33342:

- Chuẩn bị 3 loại môi trường: (1) Hoechst 33342 stock: 250 μ g Hoechst 33342/ml Ethanol tuyệt đối; (2) Dung dịch nhuộm phôi: 50 μ l Hoechst 33342 stock + 450 μ l Ethanol tuyệt đối; (3) Dung dịch rửa phôi: PBS + 0,3% PVP.

- Rửa phôi trong dung dịch PBS có bổ sung 0,3% PVP, tiếp theo chuyển phôi vào dung dịch nhuộm phôi để qua đêm ở 4°C.

- Cố định phôi sau nhuộm lên lam kính: Chuẩn bị đĩa 4 giếng: giếng 1 chứa 500 μ l Ethanol tuyệt đối; giếng 2 chứa 1 ml Glycerol. Hút phôi sau khi đã nhuộm vào giếng 1 để rửa phôi, sau đó chuyển phôi sang giếng 2 và rửa phôi trong dung dịch Glycerol. Sau khi phôi được rửa trong Glycerol, chuyển phôi sang lam kính, mỗi phôi một giọt và xếp hàng dọc theo chiều dọc lam kính. Đặt lam lên lam kính, soi kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, sự sai khác có ý nghĩa được kiểm tra bằng hàm ANOVA, sự sai khác có ý nghĩa với $p < 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng các tế bào trứng lợn được nuôi thành thực *in vitro* 22 giờ trong môi trường POM1 và 22 giờ trong môi trường POM2. Các tế bào trứng lợn sau nuôi thành thực *in vitro* và loại bỏ màng sáng sẽ được chuyển vào môi trường PZM3 có bổ sung 0, 4, 6 và 8 μ M Demecolcine trong thời gian 1 giờ. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản dựa vào tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, tế bào trứng phân chia, phôi nang và trung bình tổng số tế bào/phôi. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân (có khối hình nón) ở nồng độ 4 μ M Demecolcine cao hơn có ý nghĩa so với nồng độ 0, 6 và 8 μ M (tương ứng 72,03 so với 1,98, 59,42 và 51,01%, $p < 0,05$). Tỷ lệ tế bào trứng phân chia, phôi nang và trung bình tổng số tế bào/phôi nang ở nồng độ 4 μ M Demecolcine cao hơn có ý nghĩa so với nồng độ 6 và 8 μ M ($p < 0,05$) (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Nồng độ Demecolcine (μ M)	Số tế bào trứng được xử lý với Demecolcine	Tế bào trứng lỗi nhân (n, %, Mean $\pm$ SE)	Số tế bào trứng được cấy chuyển nhân	Tế bào trứng phân chia (n, %, Mean $\pm$ SE)	Phôi nang (n, %, Mean $\pm$ SE)	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang
0	204	4 1,98 $\pm$ 2,01	0	0	0	0
4	220	158 72,03 $\pm$ 1,86	129	110 84,68 $\pm$ 2,19	32 24,91 $\pm$ 2,05	46,03 $\pm$ 2,76
6	196	116 59,42 $\pm$ 2,32	94	70 74,71 $\pm$ 1,88	16 17,20 $\pm$ 1,76	38,24 $\pm$ 1,76
8	212	108 51,01 $\pm$ 1,78	87	61 70,23 $\pm$ 2,09	12 13,98 $\pm$ 2,34	38,42 $\pm$ 2,14

Thí nghiệm được thực hiện với 5 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các báo cáo của X.C. Li và cs (2007) [6], K. Miyoshi và cs (2008) [12]. Các tác giả này nhận thấy, việc sử dụng các nồng độ Demecolcine sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, tế bào trứng phân chia, phôi nang nhân bản. Tuy nhiên theo X.C. Li và cs (2007) [6], sử dụng Demecolcine ở nồng độ 5 μ M cho tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân cao hơn. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ Demecolcine thích hợp sử dụng cho quá trình loại nhân là 4 μ M. Sự khác nhau giữa các kết quả nghiên cứu có thể là do điều kiện thí nghiệm, nguồn gốc tế bào trứng, khả năng quan sát đánh giá của kỹ thuật viên... Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng tế bào trứng lợn còn X.C. Li và cs (2007) [6] sử dụng tế bào trứng bò.

Demecolcine là một chất ức chế hóa học có tác dụng đẩy phần nhân tế bào trứng thành thực ra sát ngoại vi tế bào trứng, tạo thành một khối hình nón giúp cho kỹ thuật viên có thể dễ dàng quan sát dưới kính hiển vi soi nổi thông thường, nhờ vậy mà quá trình loại nhân trở nên dễ dàng hơn. X.J. Yin và cs (2002) [13] nhận thấy, khi xử lý tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* với Demecolcine sẽ hình thành khối lõi hình nón của tế bào chất trên bề mặt tế bào trứng. Dưới tác động của Demecolcine tất cả nhiễm sắc thể của tế bào trứng sẽ tập trung ở trong khối hình nón, qua đó trong quá trình loại nhân kỹ thuật viên chỉ cần loại bỏ toàn bộ phần tế bào chất lõi lên [12]. Đây có thể là nguyên nhân mà B.G. Jeon và cs (2011) [14] cho rằng, khi sử dụng Demecolcine trong quá trình loại nhân tế bào trứng sẽ nâng cao được hiệu quả loại nhân, thậm chí tỷ lệ loại nhân thành công có thể lên tới 95,7%. Mặc dù cơ chế hoạt động của Demecolcine chưa được hiểu hết, nhưng sự xuất hiện của khối hình nón có thể liên quan đến sự ngưng tụ của nhiễm sắc thể [6]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chỉ có 1,98% tế bào trứng không được xử lý với Demecolcine có hiện tượng lỗi nhân, tuy nhiên kích thước của những khối hình nón này nhỏ hơn đáng kể so với hình nón của tế bào trứng được xử lý với Demecolcine.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý tế bào trứng lợn thành thực in vitro với Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Dựa vào kết quả nghiên cứu ở nội dung 3.1, chúng tôi xử lý các tế bào trứng lợn được nuôi thành thực *in vitro* 22 giờ trong môi trường POM1 và 22 giờ trong môi trường POM2 với 4 μ M Demecolcine để đánh giá ảnh hưởng của thời gian xử lý tế bào

trứng lợn thành thực *in vitro* với Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản ở các mức thời gian: 0,5, 1, 2 và 3 giờ. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian xử lý tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* với Demecolcine đến quá trình loại nhân tạo phôi lợn Ỉ nhân bản dựa vào tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, tế bào trứng phân chia, phôi nang và trung bình tổng số tế bào/phôi. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* với Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Thời gian (giờ)	Số tế bào trứng được xử lý với Demecolcine	Tế bào trứng lỗi nhân (n, %, Mean $\pm$ SE)	Số tế bào trứng được cấy chuyển nhân	Tế bào trứng phân chia (n, %, Mean $\pm$ SE)	Phôi nang (n, %, Mean $\pm$ SE)	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang
0,5	231	118 51,34 $\pm$ 1,56	96	68 70,92 $\pm$ 2,33	13 13,62 $\pm$ 2,14	45,77 $\pm$ 2,21
1	220	158 72,03 $\pm$ 1,86	129	110 84,68 $\pm$ 2,19	32 24,91 $\pm$ 2,05	46,03 $\pm$ 2,76
2	226	185 81,96 $\pm$ 1,67	148	109 73,86 $\pm$ 1,91	16 17,26 $\pm$ 1,76	38,24 $\pm$ 1,76
3	242	194 80,26 $\pm$ 1,55	156	94 60,36 $\pm$ 1,82	16 10,63 $\pm$ 2,11	38,42 $\pm$ 2,14

Thí nghiệm được thực hiện với 5 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả bảng 2 cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân ở nhóm 2 giờ (81,96%) và 3 giờ (80,26%) cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 0,5 giờ (51,34%) và 1 giờ (72,03%) (bảng 2, $p < 0,05$), sự sai khác giữa nhóm 2 và 3 giờ là không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Kết quả này tương tự như báo cáo của X.C. Li và cs (2007) [6] nhưng lại khác so với K. Miyoshi và cs (2008) [12]. Theo X.C. Li và cs (2007) [6], tế bào trứng được xử lý với Demecolcine trong vòng 2 giờ cho tỷ lệ lỗi nhân cao nhất, trong khi đó theo K. Miyoshi và cs (2008) [12], tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân cao nhất khi tế bào trứng được xử lý với Demecolcine trong vòng 1 giờ. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ tế bào trứng phân chia, phôi nang ở nhóm 1 giờ cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 0,5, 2 và 3 giờ (tương ứng 84,68 so với 70,92%, 73,86 và 60,36%; 24,91 so với 13,62, 17,26 và 10,62%, $p < 0,05$). Trung bình tổng số tế bào/phôi nang của nhóm 0,5 và 1 giờ cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 2 và 3 giờ (tương ứng 45,77 và 46,03 so với 38,24 và 38,42, bảng 2). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, thời gian tế bào trứng lợn tiếp xúc với Demecolcine ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân cũng như tỷ lệ phôi nang lợn Ỉ nhân bản.

Kết quả của chúng tôi khác so với nghiên cứu X.C. Li và cs (2007) [6]. Theo nhóm tác giả này, thời gian tế bào trứng tiếp xúc với Demecolcine chỉ ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, không ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng phân chia và tạo phôi nang sau cấy chuyển nhân; không có sự sai khác có ý nghĩa về tỷ lệ tế bào trứng phân chia và tạo phôi nang, nhưng tỷ lệ tế bào trứng phân chia và tạo phôi nang cao nhất là ở nhóm 0,5 giờ.

Demecolcine tác động đến tế bào trứng và làm gia tăng số lượng tế bào trứng lỗi nhân tại thời điểm 0,5 giờ. Sự xuất hiện của các khối hình nón sẽ hỗ trợ cho quá trình loại nhân trở nên hiệu quả

hơn mà không cần phải sử dụng kính hiển vi huỳnh quang. Theo M. Kawakami và cs (2003) [15], sợi thoi vô sắc của tế bào trứng sau giảm phân dưới tác động của Demecolcine sẽ bị xáo trộn và làm cho các nhiễm sắc thể bị cô đặc lại. Các nhiễm sắc thể cô đặc sẽ tạo thành một khối và di chuyển ra sát phần ngoại vi của tế bào trứng, hình thành nên khối lỗi dạng hình nón.

Bản chất của Demecolcine là chất gây đứt gãy các vi ống, chính vì thế khi tế bào trứng tiếp xúc quá lâu với Demecolcine có thể gây ra những ảnh hưởng bất lợi đến khả năng phát triển tiếp theo của tế bào trứng sau cấy chuyển nhân [12]. Đây có thể là một trong những nguyên nhân giải thích cho hiện tượng thời gian tế bào trứng tiếp xúc với Demecolcine càng lâu sẽ làm giảm tỷ lệ hình thành phôi nang trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 2).

3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Với kết quả đạt được của nội dung 3.1 và 3.2, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến quá trình loại nhân tạo phôi lợn Ỉ nhân bản với các tế bào trứng được xử lý với 4 μ M Demecolcine trong vòng 1 giờ. Các tế bào trứng lợn trước khi xử lý sẽ được nuôi thành thực trong POM1 22 giờ, sau đó nuôi thành thực trong POM2 trong 18, 20 và 22 giờ. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến quá trình loại nhân tạo phôi lợn Ỉ nhân bản dựa vào tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, tế bào trứng phân chia, phôi nang và trung bình tổng số tế bào/phôi. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Thời gian nuôi thành thực <i>in vitro</i> trong POM2	Số tế bào trứng được xử lý với Demecolcine	Tế bào trứng lỗi nhân (n, %, Mean $\pm$ SE)	Số tế bào trứng được cấy chuyển nhân	Tế bào trứng phân chia (n, %, Mean $\pm$ SE)	Phôi nang (n, %, Mean $\pm$ SE)	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang
18 giờ	214	128 60,04 $\pm$ 1,88	103	68 66,12 $\pm$ 1,97	14 13,71 $\pm$ 1,64	39,29 $\pm$ 1,99
20 giờ	241	205 85,34 $\pm$ 2,06	174	148 85,42 $\pm$ 1,93	44 25,48 $\pm$ 1,78	46,86 $\pm$ 2,42
22 giờ	220	158 72,03 $\pm$ 1,86	129	110 84,68 $\pm$ 2,19	32 24,91 $\pm$ 2,05	46,03 $\pm$ 2,76

Thí nghiệm được thực hiện với 5 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân ở nhóm tế bào trứng được nuôi thành thực *in vitro* 20 giờ trong POM2 là cao hơn có ý nghĩa so với nhóm được nuôi thành thực *in vitro* 18 và 22 giờ trong POM2 (tương ứng 85,34% so với 60,04 và 72,03%, $p < 0,05$). Tỷ lệ tế bào trứng phân chia, phôi nang, trung bình tổng số tế bào/phôi nang ở nhóm tế bào trứng được nuôi thành thực *in vitro* 18 giờ trong POM2 là thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm được nuôi thành thực *in vitro* 20 và 22 giờ trong POM2 (tương ứng 66,12% so với 85,42 và 84,68%; 13,71 so với 25,48 và 24,91%; 39,29 so với 46,86 và 46,03, $p < 0,05$). Kết quả bảng 3 cho thấy, mặc dù không có sự khác biệt về tỷ lệ tạo phôi nang ở nhóm

20 và 22 giờ, tuy nhiên tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân ở nhóm 20 giờ cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 22 giờ.

Kết quả này cho thấy, thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Kết quả này của chúng tôi tương tự như nghiên cứu của X.C. Li và cs (2007) [6]. Theo đó, thời gian nuôi thành thực *in vitro* ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng bò lỗi nhân và hiệu quả tạo phôi bò nhân bản. Nhóm tác giả này cũng cho rằng, thời gian nuôi thành thực *in vitro* quá dài sẽ làm giảm tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, tỷ lệ tế bào trứng phân chia và phôi nang. Hiện tượng tế bào trứng lợn không cùng đạt tới giai đoạn MII thường xảy ra trong quá trình thành thực *in vitro* [16]. Theo K. Miyoshi và cs (2003) [16], có tới 36% tế bào trứng lợn đạt tới giai đoạn MII tại thời điểm nuôi 24 giờ. Thời gian nuôi thành thực *in vitro* ảnh hưởng đến việc tế bào chất tế bào trứng nhận hỗ trợ cho sự phát triển của phôi nhân bản [17]. Giai đoạn thành thực của tế bào trứng nhận ảnh hưởng đến khả năng phát triển *in vitro* của tế bào trứng nhận sau cấy chuyển nhân SCNT và tỷ lệ hình thành phôi nang.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, việc sử dụng tế bào trứng lợn được nuôi thành thực *in vitro* 20 hoặc 22 giờ trong POM2 cho tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân cũng như tạo phôi nang cao. Nguyên nhân có thể là do tại thời điểm này, tỷ lệ tế bào trứng lợn đạt tới giai đoạn MII nhiều nhất. Các tế bào trứng thành thực ở giai đoạn MII thường được sử dụng để làm tế bào chất nhận trong các nghiên cứu tạo phôi nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân SCNT. Ở giai đoạn MII, các yếu tố liên quan đến quá trình giảm phân và thúc đẩy quá trình hình thành nguyên phân của tế bào trứng giảm hoạt động, tế bào chất của tế bào trứng nhận sẽ ở giai đoạn nghỉ ngơi và điều này làm cho tế bào trở nên phù hợp cho quá trình cấy chuyển nhân tạo phôi nhân bản. Tỷ lệ tế bào trứng nhận ở giai đoạn MI phát triển đến phôi nang thấp hơn có ý nghĩa so với tế bào trứng nhận ở giai đoạn MII [16]. Theo E. Ibanez và cs (2003) [18], có thể tạo được phôi nang nhân bản từ các tế bào trứng nhân đã được loại bỏ nhân ở giai đoạn Telophase I. Tuy nhiên, việc giảm các yếu tố thúc đẩy sự thành thực có thể làm giảm khả năng sống của tế bào trứng sau loại nhân và cấy chuyển SCNT [19].

4. Kết luận

Việc xử lý tế bào trứng nhận được nuôi thành thực *in vitro* 20 giờ trong POM2 với 4 μ M Demecolcine trong vòng 1 giờ nâng cao hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản với tỷ phôi nang lên đạt 25,48%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Chăn nuôi với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu hoàn thiện quy trình tạo lợn Ỉ nhân bản”, thuộc Đề án phát triển công nghệ sinh học ngành nông nghiệp đến năm 2030. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G.P. Malenko, A.V. Komissarov, O.I. Stepanov, et al. (2015), “Perspective of Zona-free method use in farm animal cloning”, *Agricultural Biology*, **50**(4), pp.420-430, DOI: 10.15389/agrobiology.2015.4.420eng.
- [2] P.J. Booth, B.J. Tan, R. Relpurth, et al. (2001a), “Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique”, *Cloning Stem Cells*, **3**(3), pp.139-150, DOI: 10.1089/153623001753205098.
- [3] C. Galli, I. Lagutina, G. Crotti, et al. (2003), “Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin”, *Nature*, **424**(6949), DOI: 10.1038/424635a.
- [4] P.J. Booth, P. Holm, H. Callesen (2001b), “Application of the zona-free manipulation technique to porcine somatic cells nuclear transfer”, *Cloning Stem Cells*, **3**(4), pp.191-197, DOI: 10.1089/15362300152725909.
- [5] I. Lagutina, G. Lazzari, R. Duchi, et al. (2007), “Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep”, *Theriogenology*, **67**(1), pp.90-98, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.011.
- [6] X.C. Li, Y. Zhang, S. Hua, et al. (2007), “The use of demecolcine enucleation of bovine oocytes”, *Belg. J. Zool.*, **137**(2), pp.209-214.
- [7] K.M. Whitworth, R.S. Prather (2010), “Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodelling and reprogramming”, *Molecular Reproduction Development*, **77**(12), pp.1001-1015, DOI: 10.1002/mrd.21242.
- [8] J. Betthausen, E. Forsberg, M. Augenstein, et al. (2000), “Production of cloned pigs from *in vitro* systems”, *Nature Biotechnology*, **18**(10), pp.1055-1059, DOI: 10.1038/80242.
- [9] A. Onishi, M. Iwamoto, T. Akita, et al. (2000), “Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei”, *Science*, **289**(5482), pp.1188-1190, DOI: 10.1126/science.289.5482.1188.
- [10] V.K. Nguyen, T. Somfai, D. Salamone, et al. (2021), “Optimization of donor cell cycle synchrony, maturation media and embryo culture system for somatic cell nuclear transfer in the critically endangered Vietnamese I pig”, *Theriogenology*, **166**, pp.21-28, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.008.
- [11] S.M. Hosseini, F. Moulavi, V. Asgari, et al. (2013), “Simple, fast, and efficient method of manual oocyte enucleation using a pulled Pasteur pipette”, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **49**(8), pp.569-575, DOI: 10.1007/s11626-013-9630-4.
- [12] K. Miyoshi, H. Mori, H. Yamamoto, et al. (2008), “Effects of Demecolcine and sucrose on the incidence of cytoplasmic protrusions containing chromosomes in pig oocytes matured *in vitro*”, *Journal of Reproduction and Development*, **54**(2), pp.117-121, DOI: 10.1262/jrd.19142.
- [13] X.J. Yin, T. Tani, I. Yonemura, et al. (2002), “Production of cloned pig from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes”, *Biology Reproduction*, **67**(2), pp.442-446, DOI: 10.1095/biolreprod67.2.442.
- [14] B.G. Jeon, D.H. Betts, W.A. King, et al. (2011), “*In vitro* developmental potential of nuclear transfer embryos cloned with enucleation methods using pre-denuded bovine oocytes”, *Reproduction Domestic Animal*, **46**(6), pp.1035-1042, DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01781.x.
- [15] M. Kawakami, A. Yabuuchi, T. Kobayashi, et al. (2003), “Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the development potential of nuclear transferred porcine oocytes”, *Cloning Stem. Cells*, **5**(4), pp.379-387, DOI: 10.1089/153623003772032871.
- [16] K. Miyoshi, J. Rzuclidlo, S. Pratt, et al. (2003), “Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells”, *Biology of Reproduction*, **68**(4), pp.1079-1086, DOI: 10.1095/biolreprod.102.010876.
- [17] K. Miyoshi, J. Rzuclidlo, S. Pratt, et al. (2002), “Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig”, *Biology Reproduction*, **67**(2), pp.540-545, DOI: 10.1095/biolreprod67.2.540.
- [18] E. Ibanez, D.F. Albertini, E.W. Overstrom (2003), “Demecolcine induced oocytes enucleation for somatic cell cloning: Coordination between cell cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion”, *Biology Reproduction*, **68**(4), pp.1249-1258, DOI: 10.1095/biolreprod.102.008292.
- [19] T. Tani, Y. Kato, Y. Tsunoda (2001), “Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming”, *Biology Reproduction*, **64**(1), pp.324-330, DOI: 10.1095/biolreprod64.1.324.

Biến động các thông số môi trường nước cơ bản nguồn cấp nuôi tôm nước lợ khu vực phía Bắc giai đoạn 2017-2021

Nguyễn Hữu Nghĩa*, Phan Trọng Bình, Nguyễn Thị Minh Nguyệt,
Nguyễn Đức Bình, Phạm Thái Giang, Phạm Thị Thanh

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, phường Đình Bảng, thị xã Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/7/2022; ngày chuyển phản biện 21/7/2022; ngày nhận phản biện 12/8/2022; ngày chấp nhận đăng 16/8/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu này tổng hợp và phân tích những kết quả quan trắc một số thông số môi trường nước cơ bản là nguồn cấp nuôi tôm nước lợ tại một số tỉnh miền Bắc trong giai đoạn 2017-2021 nhằm đánh giá và tìm ra quy luật biến động, từ đó đưa ra các khuyến cáo phù hợp cho các bên liên quan. Có 7 thông số môi trường nước được phân tích và đánh giá bao gồm: nhiệt độ nước, oxy hòa tan (DO), độ mặn, pH, độ kiềm, nhu cầu oxy hóa học (COD), nitrite (N-NO_2) với tần suất quan trắc 2 lần/tháng, thời gian quan trắc 10 tháng/năm, tại 13 điểm quan trắc nguồn cấp nuôi tôm nước lợ thuộc 6 tỉnh: Nam Định, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế. Kết quả cho thấy, nhiệt độ nước thấp đầu năm, tăng dần và đạt cao nhất vào tháng 6, sau đó giảm dần về cuối năm. Nhiệt độ biến động mạnh giai đoạn đầu năm và cuối năm và có xu hướng tăng dần từ Bắc vào Nam. DO có xu hướng giảm dần từ đầu năm đến cuối năm. Độ mặn thấp hơn vào mùa mưa, đặc biệt ở Nghệ An và Quảng Trị so với các tỉnh còn lại. Độ pH và độ kiềm cơ bản nằm trong ngưỡng phù hợp cho nuôi tôm nước lợ. COD ở Hà Tĩnh và Nam Định, NO_2 ở Nam Định thường xuyên cao, thể hiện nguồn nước cấp bị ô nhiễm hữu cơ cần có giải pháp khắc phục lâu dài.

Từ khóa: nuôi tôm nước lợ, quan trắc, thông số môi trường nước.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Mở đầu

Nuôi trồng thủy sản (NTTS) đóng vai trò quan trọng trong nền kinh tế của nước ta, trong đó tôm thẻ chân trắng là một đối tượng nuôi chính tập trung ở các tỉnh/thành phố ven biển Quảng Ninh, Hải Phòng, Thái Bình, Nam Định, Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế. Tuy nhiên, hiện nay môi trường nuôi thủy sản ở các vùng NTTS chủ lực đang bị suy thoái và có chiều hướng gia tăng, khó kiểm soát với các nguyên nhân như ô nhiễm nguồn nước do nước thải sinh hoạt, nông nghiệp và công nghiệp, cũng như hoạt động NTTS không ngừng phát triển đã làm gia tăng dịch bệnh thủy sản. Kết quả quan trắc NTTS hàng năm cho thấy, môi trường vùng NTTS trọng điểm ở các tỉnh khu vực phía Bắc vẫn tồn tại nhiều mối nguy ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của động vật thủy sản như các thông số vượt ngưỡng cao. Nước ta nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, chịu tác động lớn của biến đổi khí hậu. Thời tiết trong những năm gần đây và dự báo trong thời gian tới có nhiều biến động bất thường, ảnh hưởng lớn đến hoạt động của ngành NTTS. Nhiều vấn đề về môi trường và bệnh đe dọa đến năng suất, sản lượng ngành NTTS, bao gồm sự biến động vượt ngưỡng của các thông số nhiệt độ, độ mặn, độ kiềm, N-NO_2 , N-NH_4 , P-PO_4 , TSS, COD. Mẫu nước nguồn cấp vẫn phát hiện các tác nhân gây bệnh nguy hiểm như virus hội chứng đốm trắng (WSSV), Vp_{AHPND} và *Enterocytozoon hepatopenaei*. Để đáp ứng kịp thời yêu cầu chỉ đạo và điều hành sản xuất trong

NTTS, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã giao Viện Nghiên cứu NTTS I thực hiện nhiệm vụ quan trắc môi trường nước nuôi một số đối tượng thủy sản chủ lực ở khu vực miền Bắc, nhằm kịp thời cảnh báo và khuyến cáo những yếu tố môi trường bất lợi cho đối tượng nuôi và sự có mặt của tác nhân gây bệnh trên đối tượng thủy sản nuôi, giúp cơ sở NTTS có biện pháp phòng tránh kịp thời, đáp ứng yêu cầu chỉ đạo và điều hành sản xuất của cơ quan quản lý. Bên cạnh đó, chương trình quan trắc phục vụ NTTS còn xây dựng cơ sở dữ liệu về chất lượng môi trường và tình hình dịch bệnh phục vụ công tác lưu trữ, cung cấp trao đổi thông tin, làm cơ sở cho việc đánh giá, dự báo diễn biến môi trường và dịch bệnh trong NTTS. Dữ liệu quan trắc môi trường và bệnh thủy sản còn có vai trò quan trọng để các cơ quan chức năng ở các lĩnh vực khác nhau sử dụng làm cơ sở đánh giá và ra quyết định khi có các sự cố môi trường xảy ra.

Nhiệm vụ được thực hiện hàng năm tại một số tỉnh miền Bắc với các đối tượng nuôi được quan trắc là tôm nước lợ, ngao, hào, cá rô phi, cá lồng. Số lượng điểm, thông số và tần suất quan trắc có điều chỉnh hàng năm. Kết quả quan trắc sử dụng để cảnh báo và khuyến cáo những yếu tố môi trường bất lợi cho đối tượng nuôi và sự có mặt của tác nhân gây bệnh trên đối tượng thủy sản nuôi, giúp người nuôi có biện pháp phòng tránh kịp thời và đáp ứng yêu cầu chỉ đạo, điều hành sản xuất của cơ quan quản lý. Đã có một số nghiên cứu trước đây tổng hợp và phân tích kết quả nhiệm vụ theo từng năm,

*Tác giả liên hệ: Email: nghia@ria1.org

Changes in basic water environmental parameters of the water intake of brackish water shrimp farming in Northern Vietnam period 2017-2021

Huu Nghia Nguyen*, Trong Binh Phan,
Thi Minh Nguyet Nguyen, Duc Binh Nguyen,
Thai Giang Pham, Thi Thanh Pham

Research Institute for Aquaculture No. 1,
Dinh Bang Ward, Tu Son Town, Bac Ninh Province, Vietnam

Received 18 July 2022; revised 12 August 2022; accepted 16 August 2022

Abstract:

This study synthesised and analysed water environmental parameters data of water supply of brackish water shrimp farming in Northern Vietnam over 5 years from 2017 to 2021 to find out the changing patterns of the parameters, thereby making appropriate recommendations for stakeholders. There were 7 analysed and evaluated water environment parameters, including water temperature, dissolved oxygen (DO), salinity, pH, alkalinity, chemical oxygen demand (COD), nitrite (N-NO₂), with monitoring frequency of 2 times/month, 10 months/year at 13 monitoring locations for brackish water shrimp farming in 6 provinces: Nam Dinh, Nghe An, Ha Tinh, Quang Binh, Quang Tri, and Thua Thien Hue. Water temperature was low at the beginning of the year, gradually increased to the highest level in June, then gradually decreased to the end of the year. The temperature fluctuated strongly at the beginning and end of the year and tended to increase gradually from the North to the South. DO tended to decrease from the beginning of the year to the end of the year. Salinity was lower in the rainy season, especially in Nghe An and Quang Tri, compared to the others. The pH and alkalinity levels were suitable for brackish shrimp farming. COD in Ha Tinh and Nam Dinh, NO₂ in Nam Dinh were often high, indicating that the supply water was contaminated with organic matter and needed a long-term solution.

Keywords: brackish water shrimp farming, monitoring, water parameters.

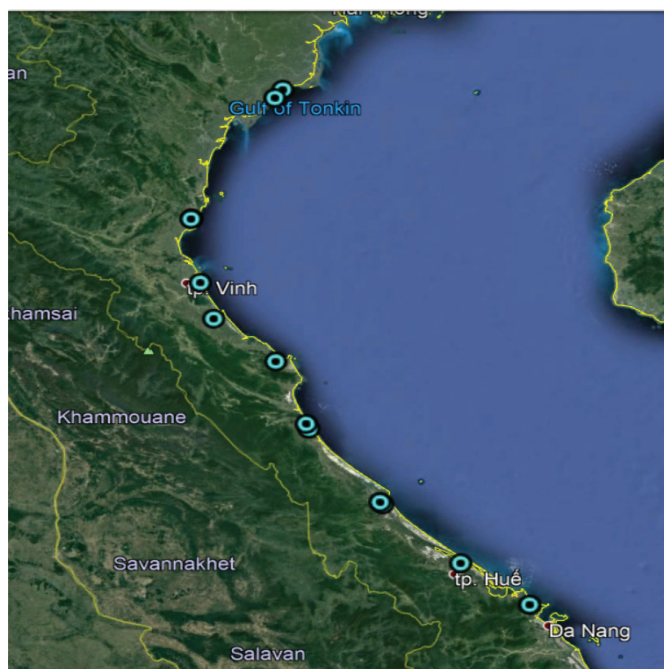
Classification number: 4.5

tuy nhiên việc phân tích diễn biến môi trường nguồn nước cấp nuôi tôm nước lợ trong nhiều năm chưa được thực hiện. Vì thế mục tiêu của nghiên cứu này là phân tích, so sánh sự biến động của các thông số môi trường nước cơ bản trong 5 năm qua ở nguồn cấp nuôi tôm nước lợ tại một số tỉnh miền Bắc để tìm ra quy luật biến động các thông số đó, từ đó đưa ra các khuyến cáo cho tổ chức và cá nhân tham gia NTTS cũng như các cơ quan quản lý.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chọn điểm quan trắc

Điểm quan trắc được chọn thuộc vùng nuôi thủy sản tập trung, đại diện về diện tích, sản lượng, thường xảy ra dịch bệnh hoặc có nguy cơ ô nhiễm môi trường; vùng quan trắc phải phục vụ lợi ích cho cộng đồng. Điểm quan trắc thuộc các sông hoặc nguồn nước cấp trực tiếp vào vùng nuôi; có tính ổn định và đại diện cho toàn vùng; xác định được tọa độ và đánh dấu trên bản đồ. Các điểm quan trắc không trùng lặp với các chương trình quan trắc môi trường khác của Trung ương và địa phương (hình 1, bảng 1).



Hình 1. Bản đồ các điểm quan trắc định kỳ phục vụ nuôi tôm nước lợ.

Bảng 1. Địa điểm, thời gian quan trắc nguồn nước cấp vùng nuôi tôm nước lợ.

STT	Điểm quan trắc	Tọa độ	Thời gian
1	Quất Lâm, Giao Thủy, Nam Định	20.183718, 106.361037	2017-2021
2	Hải Chính, Hải Hậu, Nam Định	20.119703, 106.304792	2017-2021
3	Quỳnh Bảng, Quỳnh Lưu, Nghệ An	19.184829, 105.715998	2018-2021
4	Quỳnh Liên, Hoàng Mai, Nghệ An	19.191252, 105.722760	2018-2021
5	Xuân Phổ, Nghi Xuân, Hà Tĩnh	18.693056, 105.791359	2017-2021
6	Hộ Độ, Lộc Hà, Hà Tĩnh	18.414960, 105.890051	2018-2021
7	Kỳ Hà, Kỳ Anh, Hà Tĩnh	18.086999, 106.334698	2018-2021
8	Nhật Lệ, Quảng Bình	17.609037, 106.550648	2017-2021
9	Sông Gianh, Quảng Bình	17.571889, 106.569051	2017-2021
10	Trung Hải, Gio Linh, Quảng Trị	16.994511, 107.082706	2017-2021
11	Hiển Thành, Vĩnh Linh, Quảng Trị	17.010626, 107.064172	2017-2021
12	Thuận An, Phú Vang, Thừa Thiên Huế	16.543708, 107.617387	2017-2021
13	Lăng Cô, Phú Lộc, Thừa Thiên Huế	16.225890, 108.087017	2017-2021

2.2. Thông số và tần suất quan trắc

Nhiệm vụ triển khai quan trắc 26 thông số môi trường nước và bệnh. Thông số và tần suất quan trắc được điều chỉnh qua các năm. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi phân tích 7 thông số môi trường nước cơ bản cho nuôi tôm nước lợ bao gồm: nhiệt độ nước, ôxy hòa tan (DO), độ mặn, pH, độ kiềm, nhu cầu ôxy hóa học (COD), nitrite (N-NO_2). Tần suất quan trắc 2 lần/tháng, thời gian quan trắc 10 tháng/năm, từ năm 2017 đến năm 2021. Một số điểm có thể có thời gian quan trắc ngắn hơn tùy theo từng năm.

2.3. Phương pháp thu và bảo quản mẫu

Thu mẫu nước nguồn cấp các khu vực nuôi tôm nước lợ theo TCVN 6663-6:2018. Thu mẫu nước biển cấp cho các khu vực nuôi tôm trên cát theo TCVN 5998:1995. Bảo quản mẫu nước theo TCVN 6663-3:2016.

2.4. Phương pháp phân tích mẫu

Nhiệt độ nước, DO, pH đo bằng máy YSI Pro 1020 (Mỹ). Độ mặn đo bằng khúc xạ kế. Độ kiềm đo bằng SMEWW 2320 B:2011, N-NO_2 đo bằng SMEWW 4500- NO_2 B:2011, COD đo bằng SMEWW 5220 C:2011.

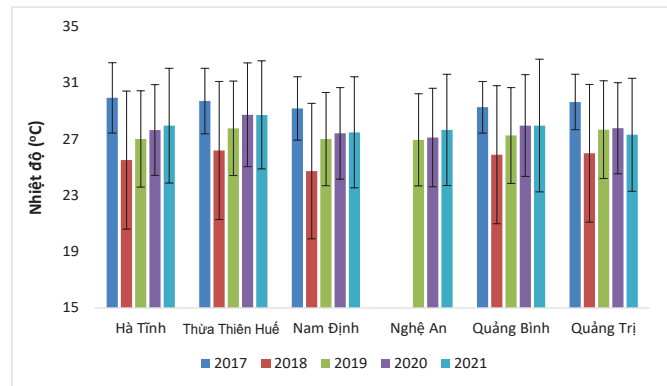
2.5. Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu quan trắc được tổng hợp và phân tích theo thời gian và không gian. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, để có một cái nhìn tổng quan về biến động các thông số môi trường nước, số liệu thời gian được tổng hợp theo tháng hoặc năm, số liệu không gian được tổng hợp theo tỉnh. Dữ liệu được xử lý và phân tích thống kê mô tả bằng công cụ Pivot table của phần mềm Excel. Phân tích sự khác biệt về biến động giá trị trung bình của các thông số giữa các năm được thực hiện bằng mô hình hồi quy tuyến tính trên phần mềm XLSTAT 2021, $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa.

3. Kết quả và bàn luận

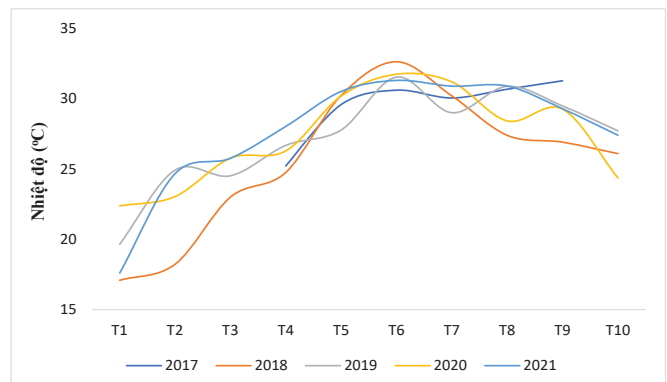
3.1. Nhiệt độ nước

Nhiệt độ thích hợp cho các loài thủy sản nước ấm là 25-30°C [1]. Theo Chanratchakool (1995) [2] và J. Wyban và cs (1995) [3], khi nhiệt độ lớn hơn 33°C hay thấp hơn 25°C thì khả năng bắt mồi của tôm giảm 30-50%, tôm sẽ giảm hoạt động tạo điều kiện cho mầm bệnh tấn công. Đối với tôm nhỏ (<5 g/cá thể), nhiệt độ tối ưu là 30°C, trong khi đối với tôm trưởng thành, nhiệt độ tối ưu là khoảng 27°C. Khi nhiệt độ ao thấp hơn 23°C và cao hơn 30°C thì tốc độ sinh trưởng và sức ăn sẽ giảm. Giới hạn nhiệt độ cho sự sinh trưởng của tôm thẻ chân trắng theo E.M. Christopher (2008) [4] dao động 14,5-35,0°C.



Hình 2. Nhiệt độ nước trung bình năm nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021 gộp theo tỉnh.

Kết quả hình 2 cho thấy, nhiệt độ trung bình các năm tại các điểm quan trắc nước cấp vùng nuôi tôm nước lợ dao động $24,73 \pm 4,81^\circ\text{C}$ (Nam Định, 2018) đến $29,94 \pm 2,50^\circ\text{C}$ (Hà Tĩnh, 2017). Nhiệt độ trung bình của tất cả các điểm trong toàn bộ thời gian nghiên cứu là $27,48 \pm 3,95^\circ\text{C}$, cao nhất $34,2^\circ\text{C}$, thấp nhất $12,1^\circ\text{C}$. Nhiệt độ trung bình tại các điểm quan trắc của Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Nam Định, Nghệ An, Quảng Bình và Quảng Trị trong giai đoạn nghiên cứu tương ứng là $28,12 \pm 3,97$, $27,42 \pm 4,00$, $27,01 \pm 3,93$, $27,24 \pm 3,62$, $27,55 \pm 4,12$ và $27,52 \pm 3,89$, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nhiệt độ trung bình giữa các tỉnh. Nhiệt độ trung bình của tất cả các điểm quan trắc năm 2017, 2018, 2019, 2020 và 2021 tương ứng là $29,58 \pm 2,25$, $25,65 \pm 4,92$, $27,26 \pm 3,40$, $27,76 \pm 3,45$ và $27,86 \pm 4,13^\circ\text{C}$. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nhiệt độ trung bình hàng năm của các điểm quan trắc giữa 2018, 2019, 2020, 2021, 2017 ($p < 0,0001$). Giá trị trung bình nhiệt độ tương tác giữa biến thời gian và tỉnh khác biệt có ý nghĩa thống kê là 8 nhóm/28 tổ hợp ($p < 0,0001$).



Hình 3. Nhiệt độ trung bình theo tháng nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021.

Nhiệt độ biến động theo quy luật thấp nhất vào đầu năm tăng dần lên đạt cao nhất vào tháng 6 sau đó giảm dần đến cuối năm. Năm 2018 và 2021 có sự chênh lệch nhiệt độ lớn

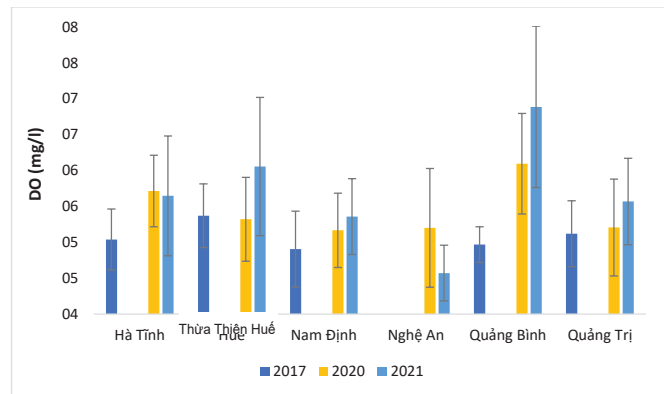
hơn trong thời gian đầu năm và cuối năm so với các năm 2017, 2019 và 2020. Nhiệt độ nước nguồn cấp trong các tháng đầu năm thấp, đặc biệt trong tháng 01 chỉ dao động 17,09-22,37°C (hình 3). Nhiệt độ thấp và biến động mạnh giữa thời gian đầu năm trước và cuối năm sau không theo quy luật đã ảnh hưởng đến kế hoạch dự báo về thời gian bắt đầu mùa vụ nuôi. Do đó, người nuôi cần có các biện pháp dự phòng như xây dựng thêm hệ thống ương nuôi tôm trên bể xi măng kết hợp trong nhà, ở giai đoạn đầu tại thời điểm đầu năm trước khi đưa ra ao nuôi, hoặc lùi kế hoạch bắt đầu vụ nuôi ra tháng 2-3, khi nhiệt độ nước cao và ổn định.

Mùa đông ở miền Bắc nhiệt độ thường thấp nằm ngoài khoảng thích hợp cho tôm nuôi, vì thế việc duy trì ao sâu nước để ổn định nhiệt độ là cần thiết. Nhiệt độ có ảnh hưởng đến các quá trình sinh hóa xảy ra trong nước, nhiệt độ cứ tăng 10°C thì phản ứng sinh học tăng gấp đôi. Điều này cũng có nghĩa sinh vật trong nước sẽ sử dụng lượng oxy gấp đôi ở 30°C so với 20°C [1]. Nhiệt độ tăng 28 lên 34°C sẽ làm giảm khả năng miễn dịch và sức đề kháng. Trong khi đó, nhiệt độ giảm đến từ 28 đến 20°C không làm giảm khả năng miễn dịch và đề kháng của tôm đối với vi khuẩn [5]. Các điều kiện tối ưu để tôm nuôi có trọng lượng tối đa lúc thu hoạch, tỷ lệ chuyển đổi thức ăn FCR thấp nhất, tốc độ tăng trưởng nhanh là nhiệt độ 27,25°C kết hợp với nước có độ mặn 25,5‰ [6]. Enzyme tiêu hóa có hiệu quả hoạt động khác nhau dưới các điều kiện nhiệt độ khác nhau. Nghiên cứu cho thấy, khi nhiệt độ giảm liên tục từ 28 xuống 20°C hoặc thấp hơn thì cần giảm lượng thức ăn, vì hiệu năng hoạt động của enzyme tiêu hóa giảm [7], tuy nhiên thí nghiệm làm lạnh từ 28 xuống 13°C và sau đó làm ấm lại 28°C cho thấy, tôm thẻ chân trắng có thể thích nghi với một mức độ dao động nhiệt độ nhất định bằng cách tự điều chỉnh [8].

Kết quả quan trắc cho thấy, nhiệt độ tại các điểm quan trắc kênh cấp vùng nuôi tôm nước lợ cơ bản phù hợp cho sự phát triển của tôm. Mặc dù vậy, nhiệt độ nước giai đoạn đầu năm và cuối năm thấp ảnh hưởng đến sự phát triển của tôm. Đây là giai đoạn có nhiệt độ bất lợi nhất đối với nuôi tôm ở khu vực miền Bắc mà các cơ sở nuôi cần có giải pháp để nâng nhiệt.

3.2. Hàm lượng oxy hòa tan (DO)

DO là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tăng trưởng và sức khỏe của tôm nuôi. Nó cũng là một yếu tố quan trọng để sinh vật sống dưới nước tồn tại và phát triển. Độ hòa tan của oxy trong tự nhiên phụ thuộc vào các đặc tính vật lý, hóa học và các hoạt động sinh hóa trong nước. Oxy hòa tan thấp có thể làm giảm hoạt động kiếm ăn, thậm chí gây chết các sinh vật sống dưới nước. DO điều chỉnh các quá trình sinh hóa khác nhau của chất lượng nước, chẳng hạn như quá trình nitrat hóa, khử nitơ và phân hủy hợp chất hữu cơ.



Hình 4. Hàm lượng DO trung bình hàng năm nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021 gộp theo tỉnh.

Giá trị DO trung bình năm tại các tỉnh nghiên cứu nằm trong khoảng $4,57 \pm 0,39$ mg/l (Nghệ An, 2021) đến $6,89 \pm 1,13$ mg/l (Quảng Bình, 2021) (hình 4). Giá trị DO trung bình nguồn cấp giai đoạn 2017-2021 tại các điểm quan trắc là $5,48 \pm 0,86$ mg/l. DO trung bình tại các điểm quan trắc của Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Nam Định, Nghệ An, Quảng Bình và Quảng Trị trong giai đoạn nghiên cứu tương ứng là $5,62 \pm 0,82$, $5,55 \pm 0,69$, $5,19 \pm 0,55$, $4,89 \pm 0,72$, $6,18 \pm 1,10$ và $5,33 \pm 0,64$ mg/l, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về DO trung bình theo nhóm tỉnh Nghệ An, Nam Định, Quảng Trị, Hà Tĩnh, Thừa Thiên Huế, Quảng Bình ($p < 0,0001$). DO trung bình hàng năm 2017, 2020 và 2021 tương ứng là $5,08 \pm 0,46$, $5,47 \pm 0,72$ và $5,68 \pm 1,04$ mg/l. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về DO trung bình hàng năm của các điểm quan trắc giữa năm 2017, 2020, 2021 ($p < 0,0001$). Giá trị trung bình DO tương tác giữa biến thời gian và tỉnh khác biệt có ý nghĩa thống kê là 9 nhóm/17 tổ hợp ($p < 0,0001$). Mặc dù giá trị DO trung bình vẫn ở mức cao hơn so với ngưỡng cảnh báo ($< 3,5$ mg/l), tuy nhiên cũng có những thời điểm thấp hơn nên vẫn cần được tiếp tục quan trắc để có giải pháp xử lý.

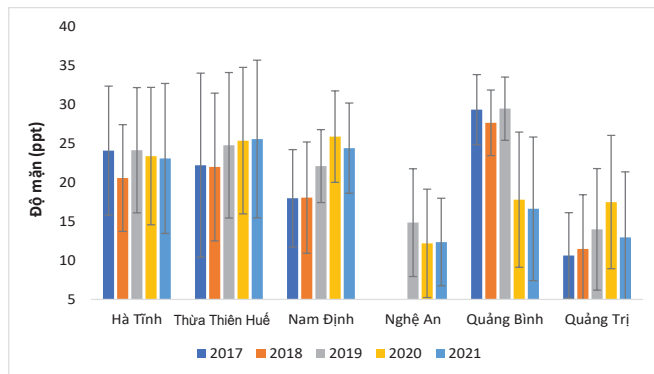
Hàm lượng DO trong nước nguồn cấp năm 2020 và 2021 nhìn chung không có sự biến động lớn trong thời gian từ tháng 1-10. Hàm lượng DO trung bình tại các điểm nguồn cấp giảm dần từ đầu năm đến cuối năm (hình 5).



Hình 5. Hàm lượng DO trung bình theo tháng nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021.

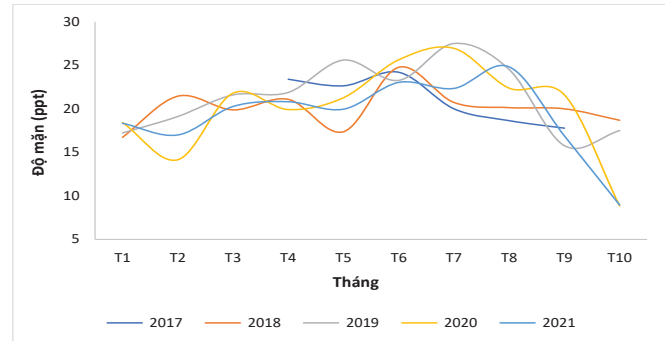
3.3. Độ mặn

Theo C.E. Boyd và cs (1998) [1], tôm thẻ chân trắng và tôm sú có thể thích nghi với độ mặn 1-40‰, tuy nhiên phù hợp nhất trong khoảng 20-25‰. Theo W.M. Wanninayate và cs (2001) [9], độ mặn tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của tôm là 15-25‰. Theo P. Chanratchakool và cs (2003) [10], tôm nuôi có độ mặn cao hơn 30‰ dễ nhiễm mầm bệnh, đặc biệt là bệnh đốm trắng và đầu vàng, ở độ mặn thấp thì bệnh ít xảy ra nhưng độ mặn không nhỏ hơn 7‰. Nếu độ mặn thấp hơn tôm dễ bị còi, mềm vỏ, tỷ lệ sống thấp. Khu vực ven biển Bắc Bộ và Bắc Trung Bộ do có địa hình đa dạng phức tạp, có vùng chịu ảnh hưởng rất lớn từ nguồn nước ngọt từ nội đồng đổ ra biển, ngược lại có vùng lại chịu ảnh hưởng nhiều bởi nguồn nước mặn do thủy triều và nước biển nên độ mặn các điểm quan trắc có sự khác nhau đáng kể.



Hình 6. Độ mặn trung bình hàng năm nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021 gộp theo tỉnh.

Độ mặn trung bình nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ của các tỉnh nghiên cứu là $20,54 \pm 9,42\%$, thấp nhất 0‰, cao nhất 39‰. Độ mặn trung bình của các tỉnh theo năm nằm trong khoảng $10,63 \pm 4,05$ đến $29,46 \pm 11,80\%$ (hình 6). Độ mặn trung bình tại các điểm quan trắc của Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Nam Định, Nghệ An, Quảng Bình và Quảng Trị trong giai đoạn nghiên cứu tương ứng là $24,22 \pm 10,01$, $23,00 \pm 8,53$, $22,18 \pm 6,71$, $13,12 \pm 6,66$, $23,50 \pm 8,95$ và $13,64 \pm 8,10\%$. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về trung bình độ mặn giữa nhóm Nghệ An và Quảng Trị với nhóm các tỉnh còn lại ($p < 0,0001$). Độ mặn trung bình của các năm 2017, 2018, 2019, 2020 và 2021 tương ứng là $21,14 \pm 9,88$, $20,00 \pm 8,72$, $21,74 \pm 8,92$, $20,57 \pm 9,51$ và $19,45 \pm 9,97\%$. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị trung bình độ mặn của năm 2019 với năm 2021 và giữa năm 2019 với 2021 ở các năm 2017, 2018, 2020 ($p = 0,039$). Giá trị độ mặn tương tác giữa biến thời gian và tỉnh khác biệt có ý nghĩa thống kê là 11 nhóm/28 tổ hợp ($p < 0,05$).



Hình 7. Độ mặn trung bình theo tháng nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021.

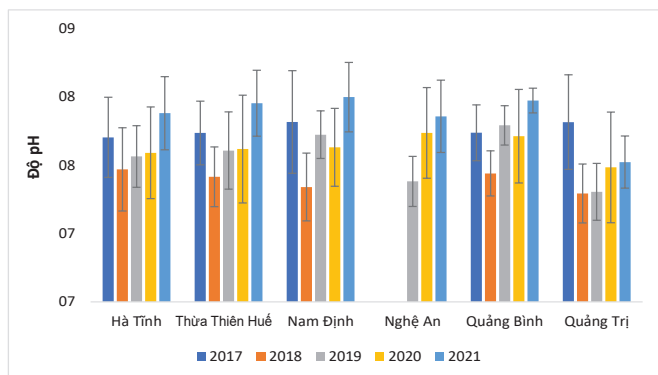
Trong giai đoạn năm 2017-2021, độ mặn ở các điểm quan trắc thường tăng cao trong từ tháng 4 đến tháng 7 và giảm ở các tháng cuối năm (tháng 9 và 10) (hình 7). Khi độ mặn tăng lên tạo ra sự gia tăng đáng kể về độ kiềm, tổng chất rắn lơ lửng, nitrite và phosphate. Tỷ lệ sống, khả năng giữ protein, hàm lượng chất béo trong tôm cũng bị ảnh hưởng bởi độ mặn [11]. Độ mặn thấp thì tỷ lệ tôm bị nhiễm các bệnh có tác nhân là vi khuẩn và virus trong môi trường nước lợ mặn sẽ giảm [12]. Tuy nhiên, thí nghiệm giảm độ mặn từ 22 xuống 18 và 14‰ cho thấy thay đổi độ mặn trên một phạm vi cụ thể có thể dẫn đến giảm khả năng miễn dịch và tăng sinh WSSV rõ rệt ở tôm, dẫn đến hội chứng đốm trắng phát triển từ nhiễm trùng tiềm ẩn sang bùng phát cấp tính [13]. Một điểm đáng lưu ý là độ mặn giảm thì độc tính các hợp chất nitơ (nitrite, nitrate, ammonia) trong nước lại tăng [14-16].

3.4. Độ pH

Độ pH là chỉ số xác định nước mang tính axit hay kiềm, pH có giá trị 0-14, trong đó pH bằng 7 là trung tính, lớn hơn 7 nước mang tính kiềm, nhỏ hơn 7 nước mang tính axit. Theo Chanratchakool (1995) [2] thì pH rất quan trọng và ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến tôm nuôi. pH thích hợp cho tôm nuôi là 7,5-8,35 và khoảng dao động trong ngày không vượt quá 0,5 đơn vị pH. Ngoài ra, pH còn có khả năng ảnh hưởng đến việc giải phóng các dạng khí gây độc cho môi trường như H_2S , NH_3 .

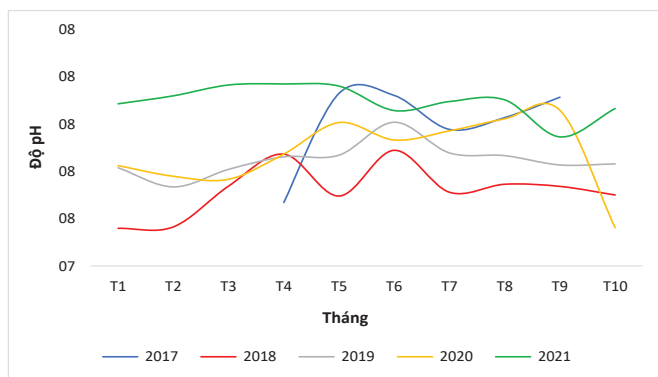
Giá trị trung bình pH của tất cả các điểm quan trắc trong thời gian nghiên cứu là $7,91 \pm 0,27$, cao nhất 8,7, thấp nhất 6,94. Độ pH trung bình của các tỉnh theo năm nằm trong khoảng $7,64 \pm 0,07$ (Quảng Trị, 2019) đến $8,20 \pm 0,32$ (Nam Định, 2021) (hình 8). Giá trị pH trung bình tại các điểm quan trắc của Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Nam Định, Nghệ An, Quảng Bình và Quảng Trị trong giai đoạn nghiên cứu tương ứng là $7,93 \pm 0,27$, $7,91 \pm 0,26$, $7,96 \pm 0,28$, $7,93 \pm 0,27$, $7,99 \pm 0,22$ và $7,76 \pm 0,26$. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị trung bình pH của Quảng Bình, Nam Định, Thừa Thiên Huế, Nghệ An, Hà Tĩnh và Quảng Trị ($p < 0,0001$). Độ pH trung bình của các năm 2017, 2018, 2019, 2020 và 2021 tương ứng là $8,01 \pm 0,24$, $7,72 \pm 0,20$, $7,85 \pm 0,21$, $7,90 \pm 0,29$

và $8,09 \pm 0,22$. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị trung bình pH giữa các năm 2021, 2017, 2020 và 2019, 2018 ($p < 0,0001$). Giá trị trung bình pH tương tác giữa biến thời gian và tỉnh khác biệt có ý nghĩa thống kê là 12 nhóm/28 tổ hợp ($p < 0,05$).



Hình 8. Độ pH trung bình hàng năm nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021 gộp theo tỉnh.

Có sự biến động về giá trị pH trung bình giữa các tháng, tuy nhiên các giá trị đều nằm trong khoảng phù hợp cho nuôi tôm nước lợ. Độ pH trung bình theo tháng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa năm 2021 với các năm từ 2018 đến 2020 và không có sự khác biệt với năm 2017. Thời gian quan trắc năm 2017 cũng ít hơn, chỉ từ tháng 4 đến tháng 9 (hình 9).



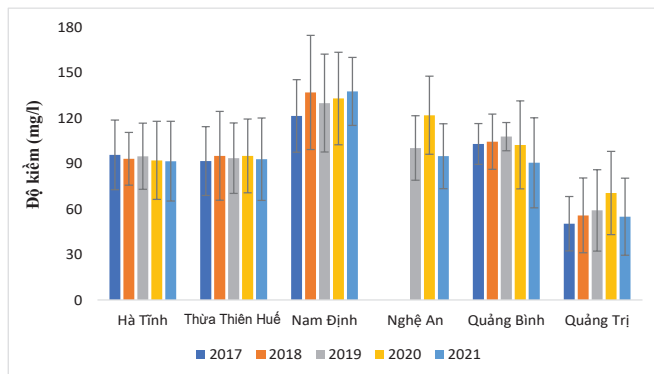
Hình 9. Độ pH trung bình theo tháng nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021.

Độ pH thủy vực nước lợ thường nằm trong khoảng 8-9, thay đổi pH trong ngày do tảo và các thực vật thủy sinh khác quang hợp. Ban đêm, khi tảo không quang hợp, CO_2 tăng thì pH giảm. Ban ngày, khi tảo quang hợp CO_2 giảm thì pH tăng. Như vậy, thường thì pH sẽ thấp nhất vào buổi sáng sớm và cao nhất vào buổi trưa và chiều. Khi pH quá thấp chúng ta có thể sử dụng vôi bột để tăng pH. Thông thường, nước ao mang tính axit do ảnh hưởng của độ kiềm thấp và bùn axit là sản phẩm của sinh vật phù du và sinh vật đáy [1]. Trong hệ thống nuôi biofloc, độ pH và độ kiềm có thể giảm do sự hình thành biofloc và nitrate hóa. Vì thế đối

với hệ thống này duy trì pH và độ kiềm cao là cần thiết cho sự phát triển của tôm và sự ổn định của biofloc [17]. Một số khu vực ven biển, đất có chứa 1-5% lưu huỳnh dưới dạng pyrite sắt. Nếu ao nuôi được xây dựng trong khu vực đó, đất tiếp xúc với không khí sẽ oxy hóa pyrite sắt dẫn đến sự hình thành axit sulfuric. Axit này có thể xâm nhập vào ao và gây ra pH rất thấp [1].

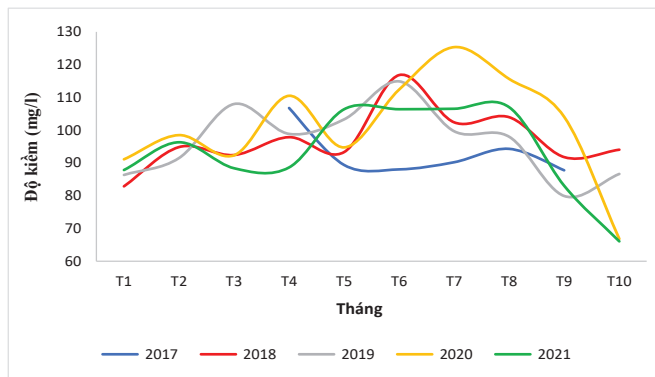
3.5. Độ kiềm

Độ kiềm tổng (Total alkalinity) là tổng hàm lượng các ion HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^- có trong nước. Độ kiềm trong nước tự nhiên thường gây nên bởi các muối của acid yếu, đặc biệt là các muối carbonat và bicarbonat. Độ kiềm cũng có thể gây nên bởi sự hiện diện của các ion silicat, borat, phosphat... và một số acid hoặc bazơ hữu cơ trong nước, nhưng hàm lượng của những ion này thường rất ít so với các ion HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^- nên thường được bỏ qua.



Hình 10. Độ kiềm trung bình hàng năm nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021 gộp theo tỉnh.

Độ kiềm trong nước nguồn cấp trong giai đoạn nghiên cứu có giá trị trung bình là $96,87 \pm 33,42$, lớn nhất 306 mg/l, nhỏ nhất 11 mg/l. Giá trị trung bình năm lớn nhất $137,57 \pm 37,63$ mg/l (Nam Định, 2021), nhỏ nhất $50,33 \pm 9,31$ (Quảng Trị, 2017) (hình 10). Nhìn chung phần lớn giá trị kiềm nằm trong khoảng phù hợp cho tôm nước lợ (60-180 mg/l). Giá trị kiềm trung bình tại các điểm quan trắc của Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Nam Định, Nghệ An, Quảng Bình và Quảng Trị trong giai đoạn nghiên cứu tương ứng là $93,83 \pm 25,75$, $93,23 \pm 23,31$, $132,70 \pm 30,73$, $105,66 \pm 25,77$, $101,35 \pm 23,25$ và $59,06 \pm 26,27$ mg/l. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị độ kiềm của các tỉnh nghiên cứu Nam Định, Nghệ An, Quảng Bình, Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Quảng Trị ($p < 0,0001$). Giá trị kiềm trung bình năm 2017, 2018, 2019, 2020 và 2021 tương ứng là $92,69 \pm 30,61$, $96,70 \pm 35,86$, $97,35 \pm 30,99$, $101,67 \pm 33,60$ và $93,55 \pm 34,50$ mg/l. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về trung bình giá trị kiềm của các năm 2017, 2018, 2019, 2021, 2020 ($p = 0,024$). Giá trị trung bình độ kiềm tương tác giữa biến thời gian và tỉnh có ý nghĩa thống kê là 7 nhóm/28 tổ hợp ($p < 0,0001$).



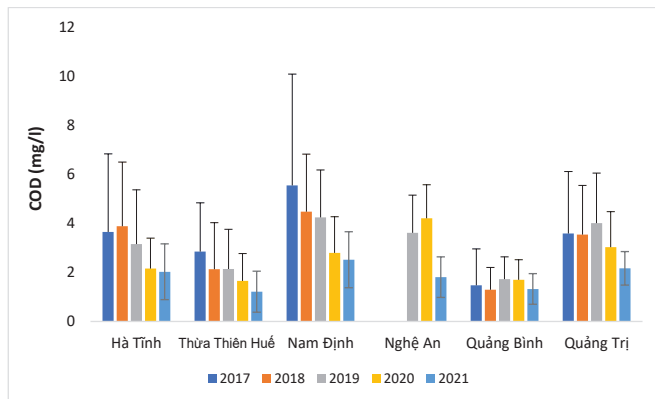
Hình 11. Độ kiềm trung bình theo tháng nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021.

Diễn biến trong 5 năm gần đây cho thấy, độ kiềm cao hơn vào các tháng mùa hè (tháng 5-8) và thấp ở các tháng đầu năm và cuối năm (tháng 1-3 và tháng 9-10). Độ kiềm trung bình theo tháng 6, 7 và 8 khác biệt có ý nghĩa thống kê trong giai đoạn nghiên cứu ($p < 0,05$) (hình 11).

Trong các thủy vực nước lợ giá trị kiềm tổng nằm trong khoảng 75-125 mg/l [1]. Trong hệ thống biofloc, độ kiềm cao hơn sẽ tạo điều kiện tốt hơn cho sự hình thành biofloc và phát triển vi khuẩn nitrat hóa [18].

3.6. Nhu cầu oxy hóa học (COD)

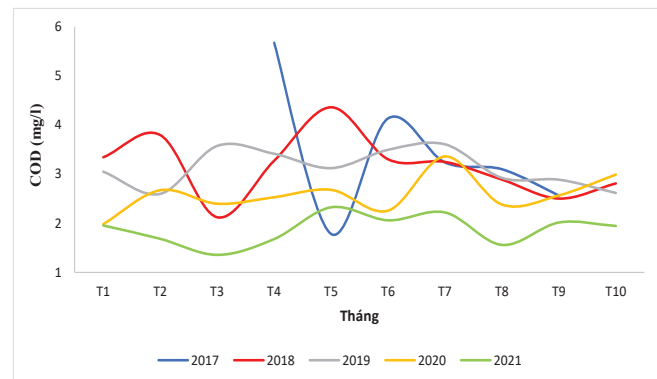
Nhu cầu oxy hóa học là lượng oxy cần thiết để oxy hóa các chất hữu cơ trong nước. Chỉ số COD được dùng để đánh giá mức độ ô nhiễm của nước.



Hình 12. COD trung bình hàng năm nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021.

COD trong nước nguồn cấp giai đoạn 2017-2021 tại các nghiên cứu có giá trị trung bình là $13,17 \pm 7,53$, tối đa 41,9, tối thiểu 1,44 mg/l. Giá trị trung bình năm lớn nhất là $5,56 \pm 4,55$ mg/l (Nam Định, 2017), giá trị trung bình năm nhỏ nhất là $1,22 \pm 0,84$ mg/l (Thừa Thiên Huế, 2021) (hình 12). Giá trị COD trung bình tại các điểm quan trắc của Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Nam Định, Nghệ An, Quảng Bình và Quảng Trị trong giai đoạn nghiên cứu tương ứng là

$8,37 \pm 4,30$, $18,97 \pm 7,86$, $16,38 \pm 6,98$, $14,80 \pm 7,41$, $6,56 \pm 2,98$ và $13,97 \pm 6,16$ mg/l. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị COD trung bình của tỉnh Quảng Bình, Thừa Thiên Huế, Quảng Trị, Nghệ An, Nam Định, Hà Tĩnh ($p < 0,0001$). Giá trị COD trung bình năm 2017, 2018, 2019, 2020, 2021 tương ứng là $15,18 \pm 9,78$, $13,84 \pm 8,11$, $15,72 \pm 8,00$, $12,78 \pm 6,53$ và $9,28 \pm 4,00$ mg/l. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về trung bình giá trị COD của các nhóm năm 2021, 2020, 2018, 2017, 2019 ($p < 0,0001$). Giá trị trung bình COD tương tác giữa biến thời gian và tỉnh khác biệt có ý nghĩa thống kê là 15 nhóm/28 tổ hợp ($p < 0,0001$).



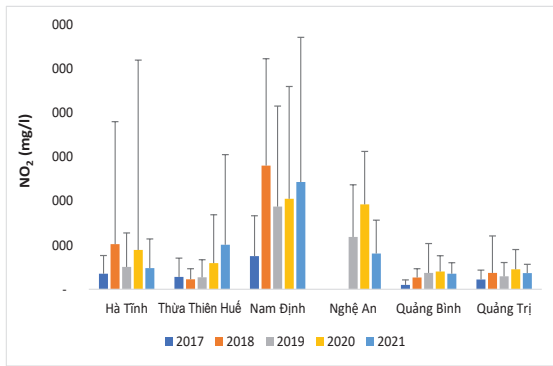
Hình 13. COD trung bình theo tháng nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021

Xu hướng biến động cho thấy, COD thường tăng lên vào các tháng 4 đến tháng 7, thời gian này cũng trùng vào giữa mùa hè và thường có mưa lớn ở miền Bắc, nên các chất thải có nguồn gốc hữu cơ từ hoạt động nông nghiệp, chăn nuôi, công nghiệp, sinh hoạt trước đó bị tích tụ đã được giải phóng và khuếch tán vào nguồn nước, kênh, sông, biển. COD trung bình theo tháng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các năm (hình 13).

Giá trị COD 0-50 mg/l được xem là chất lượng nước tốt phục vụ cho NTTS [1]. Do vậy, COD các điểm quan trắc nước nguồn cấp trong các năm trở lại đây đều nằm trong khoảng phù hợp cho NTTS và đạt tiêu chuẩn cấp vào vùng nuôi tôm.

3.7. Hàm lượng nitrite ($N-NO_2$)

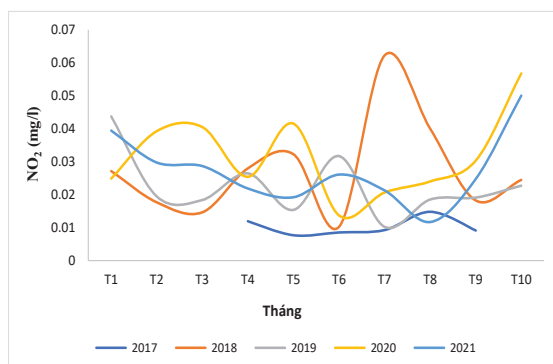
Trong nước các vi khuẩn thuộc chi *Nitrosomonas* oxy hóa amonia tổng (NH_4 và NH_3) tạo thành NO_2 theo công thức: $NH_4 + 1,5O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$. Sau đó, NO_2 tiếp tục bị oxy hóa tạo ra NO_3^- bởi các vi khuẩn thuộc chi *Nitrobacter* theo công thức: $NO_2^- + 0,5O_2 \rightarrow NO_3^-$ [1]. Các bước trên được gọi quá trình nitrate hóa, rất quan trọng và có lợi cho NTTS vì làm giảm khí độc NH_3 trong nước. Tuy nhiên, quá trình này tiêu hao oxy cho quá trình oxy hóa, dẫn đến hàm lượng oxy trong nước giảm.



Hình 14. Hàm lượng nitrite trung bình hàng năm nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021 gộp theo tỉnh.

Nitrite trung bình các năm tại các điểm quan trắc nước cấp vùng nuôi tôm nước lợ các tỉnh nghiên cứu là $0,025 \pm 0,055$ mg/l, tối đa $1,087$ mg/l, tối thiểu 0 mg/l. Nitrite trung bình các năm lớn nhất là $0,084 \pm 0,129$ mg/l (Nam Định, 2018), nhỏ nhất bằng 0 (Quảng Bình, 2017) (hình 14). Giá trị $N-NO_2$ trung bình tại các điểm quan trắc của Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Nam Định, Nghệ An, Quảng Bình và Quảng Trị trong giai đoạn nghiên cứu tương ứng là $0,015 \pm 0,035$, $0,020 \pm 0,074$, $0,063 \pm 0,078$, $0,039 \pm 0,001$, $0,010 \pm 0,012$ và $0,011 \pm 0,014$ mg/l. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị $N-NO_2$ trung bình của nhóm tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Hà Tĩnh, Nghệ An, Nam Định ($p < 0,0001$). Giá trị NO_2 trung bình năm 2017, 2018, 2019, 2020 và 2021 tương ứng là $0,010 \pm 0,016$, $0,028 \pm 0,061$, $0,022 \pm 0,038$, $0,031 \pm 0,075$ và $0,026 \pm 0,052$ mg/l. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về trung bình giá trị $N-NO_2$ của các nhóm năm 2017, 2019, 2021, 2018, 2020 ($p = 0,004$). Giá trị trung bình $N-NO_2$ tương tác giữa biến thời gian và tỉnh khác biệt có ý nghĩa thống kê là 8 nhóm/28 tổ hợp

Nitrite các điểm quan trắc kênh cấp vùng nuôi tôm tại các tỉnh Nam Định và Thừa Thiên Huế tăng dần từ năm 2019 đến 2021 (hình 15). Các tỉnh Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình và Quảng Trị có giá trị nitrite năm 2021 thấp hơn so với 2020. Giá trị nitrite trung bình hàng năm của nguồn cấp tỉnh Hà Tĩnh, Nam Định, Nghệ An có sự khác biệt có ý nghĩa ($p = 0,05$ và $p < 0,0001$).



Hình 15. Giá trị nitrite trung bình theo tháng nguồn cấp vùng nuôi tôm nước lợ giai đoạn 2017-2021.

Theo J. Whetstone và cs (2002) [19], nồng độ nitrite trong các ao nuôi tôm nhỏ hơn $0,23$ mg/l được xem là an toàn. Theo C.E. Boyd và cs (1998) [1], nitrite cho tôm cá phụ thuộc hàm lượng Cl, độc tính của nitrite giảm khi độ mặn tăng. Theo J.C. Chen và cs (1988) [20], nồng độ an toàn của nitrite đối với hậu ấu trùng của tôm sú là $4,5$ mg/l. Theo C.E. Boyd và cs (1998) [1], chất lượng nước cho NTTS có hàm lượng nitrite $< 0,5$ mg/l được xem là tốt và $0,5-2$ mg/l được xem là trung bình. Như vậy, hầu hết các đợt quan trắc có hàm lượng nitrite có giá trị phù hợp cho nuôi tôm nước lợ. Nitrite gây độc cho tôm, tiếp xúc với nồng độ cao có thể gây chậm tăng trưởng và tử vong. Nồng độ $N-NO_2$ an toàn cho nuôi tôm trong ao $< 0,45$ mg/l. Phơi nhiễm tôm với nồng độ $N-NO_2$ 4 mg/l trong 2 ngày làm giảm sự tăng trưởng của chúng nhưng không gây chết [21]. Tôm ở độ mặn thấp dễ bị tổn thương hơn với các hợp chất độc có chứa nitơ như NH_3 và NO_2 [12]; tương đồng với kết quả nghiên cứu của G.V. Castañeda và cs (2018) [16] khi cho rằng, ở vùng nước có độ mặn thấp, độc tính của các hợp chất nitơ tăng lên. Ở độ mặn thấp nitrite độc hơn ammonia và nitrate. Mức an toàn cho hậu ấu trùng tôm thẻ chân trắng ước tính cho độ mặn 1 và 3‰ lần lượt là $0,54$ và $0,81$ mg/l, đối với tổng $N-NH_3$, $0,17$ và $0,25$ mg/l, đối với $N-NO_2$ là $5,6$ và $21,5$ mg/l đối với $N-NO_3$. J.R. Rochín và cs (2017) [22] thì cho rằng, nồng độ $N-NO_2$ an toàn cho hậu ấu trùng tôm thẻ chân trắng ở độ mặn 0,6, 1, 2‰ lần lượt là $0,28$, $0,35$ và $0,62$ mg/l.

3.8. Chỉ số chất lượng nước WQI

Để đánh giá tổng thể chất lượng nước của các điểm quan trắc trong thời gian 5 năm (2017-2021), chúng tôi đã sử dụng công cụ tính WQI của Hội đồng Bộ trưởng Môi trường Canada (CCME) dựa trên số liệu quan trắc của 7 thông số nêu trên. Trong nghiên cứu này chúng tôi không sử dụng phương pháp tính WQI của Bộ Tài nguyên và Môi trường, vì phương pháp tính đòi hỏi phải có 1 thông số vi sinh, trong khi đó, trong khuôn khổ nghiên cứu này chúng tôi chỉ phân tích số liệu của 7 thông số lý hóa môi trường nước. Kết quả đã tính được chỉ số WQI của 10/13 điểm quan trắc, một số điểm không tính được chỉ số WQI do một số thông số không được quan trắc tại một số điểm trong một số năm. Kết quả cho thấy, 1 điểm quan trắc đạt mức tốt, 4 điểm đạt mức trung bình, 4 điểm đạt kém và 1 điểm đạt rất kém (bảng 2). Cần lưu ý rằng, chỉ số WQI chỉ để tham khảo, chúng tôi tính toán chỉ số WQI trên bộ dữ liệu tổng hợp 5 năm, mục đích chỉ để thể hiện một bức tranh tổng thể so sánh giữa các điểm với nhau. Điều này không thể hiện điều kiện môi trường nước tốt hay xấu tại một thời điểm cụ thể. Chỉ số chất lượng nước tại 1 thời điểm cụ thể cần được đánh giá dựa trên số liệu đo của nhiều chỉ số tại thời điểm đó.

Bảng 2. Kết quả tính chỉ số chất lượng nước WQI theo phương pháp của CCME - Canada.

Điểm quan trắc	CCME WQI	Phân loại WQI
Đại Trạch, Quảng Bình	83,5	Tốt
Hải Chính, Nam Định	66,4	Trung bình
Hộ Độ, Hà Tĩnh	42,1	Rất kém
Kỳ Hà, Hà Tĩnh	67	Trung bình
Lăng Cô, Thừa Thiên Huế	66,9	Trung bình
Quất Lâm, Nam Định	49,9	Kém
Quỳnh Bàng, Nghệ An	58,4	Kém
Quỳnh Liên, Nghệ An	58,5	Kém
Trung Trạch, Quảng Bình	75,2	Trung bình
Xuân Phổ, Hà Tĩnh	58,6	Kém

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhiệt độ nước trung bình không có khác biệt giữa các tỉnh nhưng có khác biệt theo năm. Nhiệt độ trung bình nằm trong khoảng phù hợp cho nuôi tôm nước lợ, tuy nhiên có những thời điểm ngoài giới hạn cho phép, ví dụ như tối đa 34,2°C, tối thiểu 12,1°C là những thời điểm cần phải lưu ý. Nhiệt độ thấp nhất từ tháng 1, tăng dần và đạt đỉnh vào tháng 6 và giảm dần đến cuối năm là quy luật cần nắm vững để cơ sở nuôi tôm có những điều chỉnh quản lý ao nuôi thích hợp. Hàm lượng DO nhìn chung nằm trong ngưỡng cho phép, nhưng giảm dần từ đầu vụ đến cuối vụ. Có thời điểm giá trị DO nguồn cấp chỉ 2 mg/l, đây là thời điểm các cơ sở nuôi được khuyến cáo không lấy nước vào ao nuôi. Có sự khác biệt về giá trị DO giữa các tỉnh và các năm, tuy nhiên mức độ chênh lệch không cao và cơ bản đều nằm trong khoảng cho phép. Độ mặn khá thấp ở Nghệ An và Quảng Trị do nguồn cấp của vùng nuôi nằm sâu trong nội đồng, có những khi độ mặn giảm xuống 0‰ trong mùa mưa lũ là những thời điểm cần lưu ý không lấy nước vào ao nuôi tôm. Độ pH và độ kiềm cơ bản dao động trong phạm vi cho phép. COD cao thể hiện ô nhiễm hữu cơ nguồn cấp ở Hà Tĩnh và Nam Định. 2 địa phương cần lưu ý để có giải pháp lâu dài hoặc lựa chọn thời điểm phù hợp trong cấp nước cho ao nuôi. Hàm lượng NO₂ trung bình cao hơn từ 2 đến 6 lần ở Nam Định so với các địa phương khác là điểm cần đặc biệt lưu ý, từ đó áp dụng các phương pháp giảm hàm lượng khí độc này trong nguồn nước cấp nuôi tôm của địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.E. Boyd (1998), *Water Quality for Pond Aquaculture*, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 482pp.
- [2] Chanratchakool (1995), *White Patch Disease of Black Tiger Shrimp (Penaeus monodon)*, AAHRI Newsletter 4.
- [3] J. Wyban, W.A. Walsh, D.M. Godin (1995), "Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*)", *Aquaculture*, **138**(1-4), pp.267-279, DOI: 10.1016/0044-8486(95)00032-1.
- [4] E.M. Christopher (2008), *Evaluation of Ground Water From The Lajas Valley For Low salinity Culture of The Pacific White Shrimp Litopenaeus Vannamei*, University Of Puerto Rico Mayagüez Campus, 100pp.
- [5] W. Cheng, L.U. Wang, J.C. Chen (2005), "Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*", *Aquaculture*, **250**(3-4), pp.592-601, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.04.060.
- [6] J.T.P. Palafox, A.A. Pavia, D.G.M. López, et al. (2019), "Response surface analysis of temperature-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *Penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production", *Aquaculture*, **503**, pp.312-321, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.020.
- [7] P. He, P. Wei, Y. Zhao, et al. (2017), "Effects of different low temperature stress on activities of digestive enzymes in *Penaeus vannamei*", *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, **30**(1), pp.233-237.
- [8] Z. Wang, Y. Qu, M. Yan, et al. (2019), "Physiological responses of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to temperature fluctuation in low-salinity water", *Frontiers in Physiology*, **10**, DOI: 10.3389/fphys.2019.01025.
- [9] W.M. Wanninayate, T.B. Ratnayate, R.M.T.K. Edirisinghe (2001), *Experiment Culture of Tiger Shrimp (Penaeus monodon) in Low Salinity Environment in Sri Lanka*, Asian Fisheries Forum, Kaohsiung (Taiwan), 365pp.
- [10] P. Chanratchakool, J.F. Turnbull, S.J.F. Smith, et al. (2003), *Shrimp Health Management Extension Manual*, Fourth Edition, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, 46pp.
- [11] P.F. Maicá, M.R.D. Borba, T.G. Martins, et al. (2014), "Effect of salinity on performance and body composition of Pacific white shrimp juveniles reared in a super-intensive system", *Revista Brasileira De Zootecnia*, **43**(7), pp.343-350, DOI: 10.1590/S1516-35982014000700001.
- [12] F. López, M.G.M. Covarrubias, M.S.F. Nava, et al. (2018), "Effect of nitrogen compounds on shrimp *Litopenaeus vannamei*: Histological alterations of the antennal gland", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **100**(6), pp.772-777, DOI: 10.1007/s00128-018-2349-x.
- [13] B. Liu, Z. Yu, X. Song, et al. (2006), "The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*", *Aquaculture*, **253**(1-4), pp.163-170, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.08.022.
- [14] Y.C. Lin, J.C. Chen (2001), "Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **259**(1), pp.109-119, DOI: 10.1016/S0022-0981(01)00227-1.
- [15] D.J. Schuler, G.D. Boardman, D.D. Kuhn, et al. (2010), "Acute toxicity of ammonia and nitrite to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities", *Journal of the World Aquaculture Society*, **41**(3), pp.438-446, DOI: 10.1111/j.1749-7345.2010.00385.x.
- [16] G.V. Castañeda, M.F. Espericueta, C. Vanegas, et al. (2018), "Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae in low-salinity water", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **70**, 1-6, DOI: 10.1016/j.etap.2019.05.002.
- [17] K. Zhang, L. Pan, W. Chen, et al. (2017), "Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks", *Aquaculture Research*, **48**(3), pp.1194-1208, DOI: 10.1111/are.12961.
- [18] P. Furtado, L. Poersch, W. Wasielesky (2014), "The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT)", *Aquaculture International*, **23**(1), pp.345-358, DOI: 10.1007/s10499-014-9819-x.
- [19] J. Whetstone, G. Treece, C. Browdy, et al. (2002), *Opportunities and Constraints in Marine Shrimp Farming*, Southern Regional Aquaculture Center, 8pp.
- [20] J.C. Chen, T.S. Chin (1988), "Acute toxicity of nitrite to tiger prawn, *Penaeus monodon* larvae", *Aquaculture*, **69**(3-4), pp.253-262, DOI: 10.1016/0044-8486(88)90333-X.
- [21] A. Gross, S. Abutbul, D. Zilberg (2004), "Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water", *Journal of The World Aquaculture Society*, **35**(3), pp.315-321, DOI: 10.1111/j.1749-7345.2004.tb00095.x.
- [22] J.R. Rochin, M.G.F. Espericueta, J.F.F. Sañudo, et al. (2017), "Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water", *Aquaculture Research*, **48**(5), pp.2337-2343, DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00220-5.

Đánh giá hàm lượng estradiol, progesterone của dê Bách Thảo và dê Boer theo chu kỳ động dục

Nguyễn Thị Thu Hiền*

Khoa Y dược, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ôn, phường Phú Hoà, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/2/2023; ngày chuyển phản biện 3/2/2023; ngày nhận phản biện 16/2/2023; ngày chấp nhận đăng 20/2/2023

Tóm tắt:

Bài báo trình bày kết quả phân tích hàm lượng estradiol và progesterone theo chu kỳ động dục của 2 giống dê Bách Thảo và Boer tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển chăn nuôi gia súc lớn (Bình Dương). Sau khi theo dõi có động dục, dê được lấy mẫu máu mỗi ngày vào 6-8 giờ sáng, trong 24 ngày liên tiếp. Hàm lượng hormone được xác định bằng phương pháp xét nghiệm điện hóa phát quang với hệ thống máy miễn dịch Cobas E601. Kết quả cho thấy, sự gia tăng estradiol cao nhất được quan sát thấy vào ngày 2 của chu kỳ với giá trị $8,73 \pm 0,60$ pg/ml ở dê Bách Thảo và $13,45 \pm 1,26$ pg/ml ở dê Boer. Nồng độ progesterone đạt giá trị đỉnh $7,93 \pm 0,49$ ng/ml vào ngày 14 ở dê Bách Thảo và $8,46 \pm 0,34$ ng/ml vào ngày 13 ở dê Boer. Kết quả nghiên cứu này giúp xác định thời gian động dục, chọn ghép đôi kịp thời nhằm quản lý quá trình sinh sản hiệu quả, đồng thời dùng làm tham chiếu đáng tin cậy khi sử dụng các công cụ hỗ trợ sinh sản và các chiến lược nhằm nâng cao năng suất sinh sản trên dê.

Từ khóa: chu kỳ động dục, dê, điện hoá phát quang, estradiol, progesterone, sinh sản.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Dê Bách Thảo là một giống dê nhà, nuôi lấy thịt của Việt Nam, được nuôi ở nhiều tỉnh nhưng tập trung ở các tỉnh Ninh Thuận và Bình Thuận. Dê Boer là giống dê chuyên thịt có nguồn gốc Nam Phi, nhập vào Việt Nam năm 2002. Ở Việt Nam, các đặc điểm sinh học của dê đã được nghiên cứu nhưng chỉ dừng lại ở mức đánh giá về đặc điểm ngoại hình, khả năng sinh trưởng, sinh sản của chúng [1]. Trong khi đó, các chỉ số nội tiết sinh sản chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều. Cùng với các phương pháp chẩn đoán của thú y học hiện đại, việc thu thập và nghiên cứu sinh lý sinh sản của dê cần được thực hiện nhằm hỗ trợ sinh sản hiệu quả.

Sinh sản là một yếu tố chính góp phần vào tăng hiệu quả sản xuất thịt và sữa của dê. Nhiều yếu tố di truyền, môi trường và sinh lý có ảnh hưởng đến hiệu quả sinh sản trên dê [2]. Estradiol (E2) là một loại hormone steroid được tạo ra từ cholesterol và là hormone mạnh nhất trong ba loại estrogen (estradiol, estrone và estriol). Estradiol được sản xuất chính ở buồng trứng. Sự gia tăng nồng độ estradiol giúp trứng trưởng thành và được giải phóng [3]. Ngoài ra, Estradiol còn làm dày niêm mạc tử cung để trứng có thể làm tổ nếu được thụ tinh, đồng thời thúc đẩy sự phát triển của mô vú [3]. Progesterone (P4) là một hormone steroid nội sinh, được sản xuất bởi thể vàng, nhau thai và một phần nhỏ bởi tuyến thượng thận; có vai trò quan trọng trong chu kỳ động dục và duy trì phát triển bào thai. Trong khi mang thai, progesterone cũng kích thích sự phát triển của tuyến vú [3]. Việc xác định hàm lượng hormone estradiol và progesterone cho biết tình trạng sinh lý sinh sản của vật nuôi và có ý nghĩa trong việc chọn, ghép đôi giao phối, hỗ trợ sinh sản hiệu quả. Để mô tả chính xác sự thay đổi hormone sinh dục của dê đã có nhiều nghiên cứu bằng cách bằng cách sử dụng phương pháp đo phóng xạ hoặc sử dụng xét nghiệm miễn dịch enzyme (EIA). Các biến thể progesterone, estrogen, LH, FSH và

PRL trong huyết tương được đo bằng RIA [4]. Một số nghiên cứu đã báo cáo nồng độ progesterone huyết tương trong chu kỳ động dục đối với các giống dê khác nhau [5-7]. M.G. Khadiga và cs (2005) [2] đã nghiên cứu những thay đổi về nồng độ progesterone trong huyết tương trong các giai đoạn khác nhau của chu kỳ động dục ở dê Damascus.

Tuy nhiên, hiện nay có rất ít thông tin về những thay đổi của estradiol, progesterone trong huyết tương ở giai đoạn động dục của dê so với các loài gia súc khác đang nuôi ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi theo dõi hàm lượng estradiol và progesterone huyết tương theo chu kỳ động dục bằng phương pháp xét nghiệm điện hóa phát quang (ECLIA) nhằm cung cấp dữ liệu 2 hormone này ở giống dê Bách Thảo và Boer, làm tham chiếu để xác định từng giai đoạn trong chu kỳ động dục. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp này có thể sử dụng để xác định thời kỳ động dục chính xác ở dê và cũng có thể dùng trong các nghiên cứu tương tự để xác định sự mang thai, tuổi thai, dự đoán ngày sinh ở các giống dê khác.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Động vật thí nghiệm

40 con dê cái (20 dê Bách Thảo và 20 Boer) trưởng thành, tuổi 12-36 tháng, được chọn trên cơ sở lịch sử đã biết về: bố mẹ, tuổi, hồ sơ sinh sản, khoẻ mạnh dựa trên theo dõi lâm sàng, đã phối giống thành công. Đàn dê được nuôi trong điều kiện bán thâm canh tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển chăn nuôi gia súc lớn (xã Lai Hưng, huyện Bàu Bàng, tỉnh Bình Dương). Tất cả các con dê đều được xác định bằng số thẻ tai. Việc tiêm phòng, tẩy giun cho đàn dê được thực hiện theo lịch trình của Trung tâm. Mỗi cá thể thu mẫu trên 1 chu kỳ động dục.

*Email: hienntt@tdmu.edu.vn

Evaluation of estradiol and progesterone contents of Bach Thao and Boer goats during the oestrous cycle

Thi Thu Hien Nguyen*

Faculty of Medicine and Pharmacy, Thu Dau Mot University,
6 Tran Van On Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City,
Binh Duong Province, Vietnam

Received 1 February 2023; revised 16 February 2023; accepted 20 February 2023

Abstract:

This paper presents the results of the analysis of estradiol and progesterone contents during the oestrous cycle of Bach Thao and Boer goats at the Center for Research and Development of Large Cattle in Binh Duong province. Blood samples were taken every day between 6 and 8 a.m. for 24 consecutive days. Hormone contents were determined by electroluminescence assay with the Cobas E601 immunoassay system. The results showed that the highest increase in estradiol was observed on day 2 of the cycle with a value of 8.73 ± 0.60 pg/ml in Bach Thao goats and a value of 13.45 ± 1.26 pg/ml in Boer goats. Progesterone concentration reached a peak value of 7.93 ± 0.49 ng/ml on day 14 in Bach Thao goats and reached a peak value of 8.46 ± 0.34 ng/ml on day 13 in Boer goats. The results of this study help determine the time of estrus, choose a timely pairing for effective reproductive management, and serve as a reliable reference when using assisted reproductive tools and strategies to improve reproductive performance in goats.

Keywords: electroluminescence, estradiol, goat, oestrous cycle, progesterone, reproduction.

Classification number: 4.6

2.2. Thời gian

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 8/2021 đến tháng 8/2022. Đặc điểm khí hậu khu vực nghiên cứu: Nhiệt độ trung bình là $26,5^\circ\text{C}$, dao động $17-39^\circ\text{C}$; chế độ gió tương đối ổn định, tốc độ gió bình quân khoảng $0,7$ m/s; độ ẩm trung bình $80-90\%$.

2.3. Thức ăn, nước uống, vệ sinh chuồng trại

Mật độ nuôi 2 m²/con. Chuồng thiết kế kiểu nhà sàn, sàn gỗ cách nền xi măng 1 m, mái che bằng tôn xi măng. Đàn dê được chăn thả vào ban ngày và cho ăn trong chuồng khi đàn trở về chuồng. Dê được cho ăn 2 bữa/ngày đêm, gồm 1 bữa sáng (khoảng 7-8 giờ) và 1 bữa chiều (khoảng 4-5 giờ), gồm cỏ voi xanh, cám tổng hợp (De Heus), lá cây (bình linh, lá mít hoặc xà cừ). Trung bình mỗi con là 2-4 kg cỏ, 0,5-0,8 kg cám, 0,5 kg lá/ngày. Rơm khô cuộn để lên máng sẵn cho dê ăn vào ban đêm. Nước uống là nước sạch, cho vào máng sạch đặt trong chuồng để dê uống tự do. Máng nước được vệ sinh hàng ngày và thay nước 1 lần/ngày. Chuồng trại được rửa sạch bằng vòi nước xịt hàng ngày. Công tác vệ sinh sát trùng

được tiến hành 2 tuần/lần. Dung dịch sát trùng được sử dụng là BESTAQUAM-SR với thành phần: didecyl dimethyl ammonium bromide, pha với nước máy theo tỷ lệ 1/400.

2.4. Quy trình thu và xử lý mẫu

- Dê được theo dõi có biểu hiện động dục: Dê biếng ăn, có khi bỏ ăn, bồn chồn, nháo nhác, ngoắc đuôi, đi tiểu nhiều, kêu be be tìm đực, ve vãn, quấy rầy, hay nhảy chồm lên lưng con khác, sau đó đứng yên cho con khác nhảy lên, âm hộ sưng to, mọng đỏ, nước nhờn chảy ra được xem là ngày 1 của chu kỳ động dục. Chu kỳ động dục được tính từ ngày biểu hiện động dục lần này đến quan sát thấy biểu hiện động dục lần kế tiếp. Tất cả cá thể theo dõi 2 chu kỳ động dục liên tiếp, không cho giao phối.

- Mẫu máu được thu kể từ ngày 1 đến ngày thứ 24 vào khoảng 6-8 giờ sáng. Lấy 2 ml máu tĩnh mạch đùi kỹ thuật, mẫu được đưa nhanh vào ống chống đông (EDTA-K2), dán barcode trên ống mẫu, lắc nhẹ, bảo quản và chuyển đến phòng thí nghiệm, tiến hành ly tâm mẫu máu. Ly tâm mẫu trong 15 phút ở $1.000 \times g$ ở 4°C trong vòng 60 phút sau khi thu thập. Sau khi ly tâm, thu 1 ml huyết tương chiết vào ống Eppendorf loại 1,5 ml bảo quản mẫu ở nhiệt độ -20°C . Không lặp lại các chu kỳ đông lạnh/rã đông.

- Khi xét nghiệm: Rã đông một lần, để mẫu ở nhiệt độ phòng ($20-25^\circ\text{C}$) và lắc đều trước khi tiến hành xét nghiệm. Để tránh ảnh hưởng đến kết quả, mẫu được phân tích ngay trong vòng 2 giờ.

- Xét nghiệm hormone: Lượng estradiol (E2) và progesterone (P4) được xác định bằng phương pháp xét nghiệm điện hóa phát quang, với hệ thống máy miễn dịch Cobas E601 (Roche Diagnostics, Thụy Sĩ). Quy trình xét nghiệm theo hướng dẫn của bộ kit Estradiol và Progesterone (DRG International, Inc., Đức).

2.5. Xử lý số liệu

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình (Mean $\pm$ SD). Hàm lượng hormone cực đại được xác định là những giá trị lớn hơn trung bình của tất cả các giá trị còn lại từ nhóm nghiên cứu. Số liệu được xử lý bằng phần mềm MS-Excel 2020.

3. Kết quả

Kết quả theo dõi sự thay đổi hormone estradiol và progesterone của giống dê Bách Thảo ($n=20$ cá thể) và dê Boer ($n=20$ cá thể) theo chu kỳ động dục, được trình bày ở bảng 1 và 2. Hình 1 và hình 2 thể hiện đường biểu diễn sự thay đổi của estradiol và progesterone của 2 cá thể F1BT (Bách Thảo) và F1BO (dê Boer).

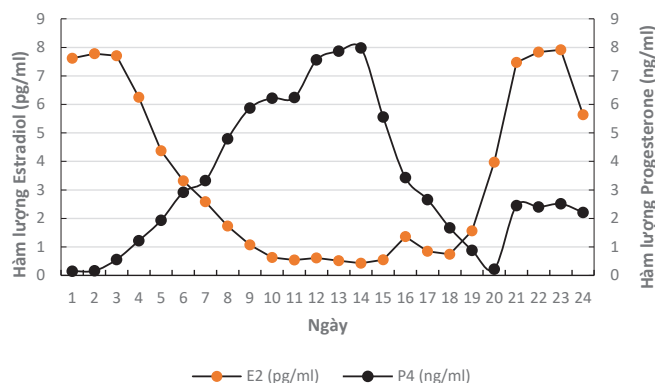
Ở dê Boer, khi bắt đầu chu kỳ vào ngày 1, mức tăng estradiol đầu tiên là $11,19 \pm 1,28$ pg/ml đã được quan sát thấy giảm xuống mức thấp hơn trong vòng 3-4 ngày ở giai đoạn sau động dục. Khi mức estradiol giảm, mức progesterone bắt đầu tăng, từ $0,54 \pm 0,3$ ng/ml ở ngày 1 tăng lên $1,43 \pm 0,46$ ng/ml ở ngày thứ 4 (bảng 2). Điều này được quan sát thấy rõ ràng theo chiều giảm estradiol và tăng progesterone ở hình 1, thể hiện sự thay đổi hormone của cá thể dê F1BT trong chu kỳ động dục. Tương tự, sự thay đổi theo chu kỳ này cũng xảy ra ở dê Boer F1BO (hình 2).

Bảng 1. Chỉ số hormone của dê Bách Thảo theo chu kỳ động dục.

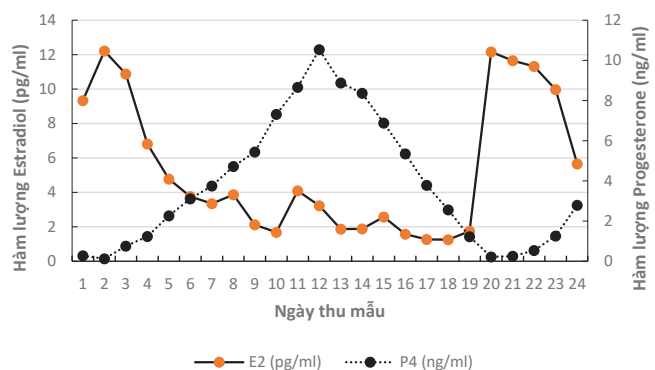
Ngày	Estradiol (pg/ml)			Progesterone (ng/ml)		
	Mean±SD	Min	Max	Mean±SD	Min	Max
1	7,88±0,34	7,53	8,27	0,25±0,10	0,15	0,41
2	8,73±0,60	7,78	9,43	0,50±0,19	0,16	0,62
3	7,67±0,27	7,25	7,98	0,66±0,33	0,25	1,06
4	6,60±0,59	6,01	7,56	1,03±0,44	0,25	1,35
5	5,17±0,90	4,34	6,55	1,78±0,48	1,15	2,36
6	3,97±0,68	3,22	4,79	2,93±0,37	2,67	3,57
7	3,10±0,64	2,36	3,78	3,17±0,50	2,52	3,72
8	2,67±0,77	1,73	3,79	3,98±0,76	3,22	4,79
9	1,79±0,51	1,07	2,28	5,03±0,68	4,27	5,87
10	1,04±0,55	0,56	1,79	5,77±0,43	5,31	6,22
11	0,96±0,43	0,45	1,32	6,87±0,69	6,24	7,85
12	0,99±0,49	0,34	1,45	7,61±0,42	7,27	8,32
13	0,88±0,63	0,46	1,97	7,90±0,48	7,37	8,52
14	0,96±0,42	0,43	1,54	7,93±0,49	7,35	8,55
15	1,23±0,91	0,55	2,78	6,68±0,91	5,56	8,02
16	1,67±0,88	1,13	3,23	5,21±1,15	3,43	6,47
17	1,67±1,04	0,85	3,26	3,85±0,96	2,66	5,13
18	4,17±2,42	0,74	6,36	2,96±0,89	1,67	4,02
19	5,18±2,70	1,56	8,02	1,84±0,68	0,88	2,66
20	6,30±1,38	3,97	7,47	1,00±0,52	0,22	1,56
21	7,65±0,64	7,01	8,65	1,45±0,87	0,35	2,45
22	7,48±1,48	5,78	9,55	1,13±0,86	0,13	2,4
23	6,53±1,19	5,26	7,92	1,06±0,83	0,54	2,51
24	4,86±1,46	3,04	6,25	0,88±0,79	0,22	2,21

Bảng 2. Chỉ số hormone của dê Boer theo chu kỳ động dục.

Ngày	Estradiol (pg/ml)			Progesterone (ng/ml)		
	Mean ±SD	Min	Max	Mean ±SD	Min	Max
1	11,19±1,28	9,34	12,85	0,54±0,30	0,26	0,89
2	13,45±1,26	12,05	14,79	0,31±0,16	0,12	0,55
3	11,13±0,49	10,53	11,87	0,61±0,19	0,36	0,81
4	7,46±0,79	6,72	8,35	1,43±0,46	1,04	2,22
5	5,63±0,80	4,78	6,55	2,54±0,37	2,26	3,02
6	3,90±0,95	2,62	4,93	3,36±0,37	2,88	3,85
7	2,94±0,24	2,73	3,35	3,03±0,80	2,04	3,78
8	2,69±1,13	1,43	3,87	3,89±1,39	2,33	5,11
9	1,96±0,26	1,59	2,22	4,46±0,61	3,95	5,44
10	1,42±0,24	1,16	1,68	5,57±1,25	4,17	7,31
11	2,03±1,18	1,15	4,09	7,47±0,98	6,33	8,66
12	2,02±0,90	1,21	3,22	8,46±1,25	7,38	10,54
13	2,00±0,29	1,85	2,52	8,46±0,34	8,05	8,88
14	1,93±0,55	1,36	2,81	8,13±0,63	7,01	8,52
15	1,97±0,40	1,56	2,57	8,16±0,74	6,88	8,76
16	1,70±0,24	1,35	1,95	7,66±1,46	5,35	9,22
17	1,97±1,01	1,27	3,55	5,80±1,52	3,78	7,76
18	1,30±0,41	0,72	1,87	3,51±1,29	2,01	5,14
19	3,01±2,64	0,82	7,58	2,04±0,68	1,22	2,77
20	8,99±3,33	3,95	12,16	0,94±0,81	0,22	2,17
21	11,78±1,23	10,45	13,35	0,84±0,41	0,25	1,34
22	12,38±0,65	11,32	13,01	0,54±0,29	0,22	0,96
23	10,04±1,85	8,18	12,45	0,55±0,40	0,33	1,26
24	6,89±1,09	5,66	8,35	1,50±0,85	0,67	2,79



Hình 1. Sự thay đổi hàm lượng hormone của dê Bách Thảo F1BT trong chu kỳ động dục.



Hình 2. Sự thay đổi hàm lượng hormone của dê Boer F1BO trong chu kỳ động dục.

Ở dê Boer, nồng độ progesterone tăng dần từ giá trị cơ bản trung bình $0,54 \pm 0,3$ ng/ml vào ngày 1 lên $3,03 \pm 0,8$ ng/ml vào ngày 7 và đạt giá trị đỉnh $8,46 \pm 0,34$ ng/ml vào ngày 13 (bảng 2). Các mức cao này được duy trì cho đến ngày 16 và sau đó sự suy giảm được quan sát thấy cho đến cuối chu kỳ trước khi xuất hiện đợt động dục tiếp theo. Nồng độ estradiol trung bình duy trì dưới 4 pg/ml và không có sự thay đổi đáng kể trong giai đoạn từ ngày 6-19 (giai đoạn hoàng thể). Đợt gia tăng estradiol thứ hai được quan sát thấy bắt đầu vào ngày 18 với giá trị $4,17 \pm 2,42$ pg/ml ở dê Bách Thảo (bảng 1) và ở ngày 20 của chu kỳ với giá trị $8,99 \pm 3,33$ pg/ml ở dê Boer (bảng 2). Chiều dài chu kỳ trung bình được tìm thấy là $18,2 \pm 2,1$ ngày. Có thể kết luận rằng, mức progesterone khác nhau đáng kể trong mỗi giai đoạn của chu kỳ động dục và đạt đỉnh điểm trong giai đoạn động dục.

4. Bàn luận

Có 4 giai đoạn của chu kỳ động dục: giai đoạn trước động dục, giai đoạn động dục, giai đoạn sau động dục và giai đoạn nghỉ ngơi (proestrus, estrus, diestrus and anestrus). Giai đoạn động dục đi kèm với sự phát triển nang trứng và nồng độ đỉnh của estradiol. Trong thời kỳ sau động dục, một hoặc nhiều thể vàng sản xuất progesterone duy trì một mức độ cao trong một thời gian dài [3].

Mô hình và mức độ gia tăng nồng độ progesterone và sau đó là sự suy giảm sau giai đoạn hoàng thể ở dê Boer và Bách Thảo là tương tự nhau. Theo các nghiên cứu của M. Zarkawi và cs

(2001) [8], M.G. Khadiga và cs (2005) [2] nồng độ progesterone ở mức cơ bản trong suốt thời kỳ động dục. Ở dê Damascus, mức progesterone trong giai đoạn hoàng thể dao động từ 2,6 đến 5,4 ng/ml [2]. Nồng độ progesterone trung bình trong giai đoạn nang trứng của chu kỳ động dục được báo cáo là 0,19 và 0,26 ng/ml ở dê Dorset [9]. Trong giai đoạn hoàng thể, nồng độ tương ứng là 2,33 và 2,94 ng/ml. Nồng độ estradiol vào thời điểm động dục lần lượt là 15,3±5,0 và 12,2±3,8 pg/ml trong và ngoài mùa sinh sản [9].

Độ dài của chu kỳ động dục trong nghiên cứu này tương tự với các báo cáo ở các nghiên cứu trên các giống dê khác. A.F. Alwan và cs. (2010) [9] đã báo cáo độ dài chu kỳ trung bình là 18,3±1,6 ngày ở dê lùn Tây Phi. Ở dê Damascus, độ dài chu kỳ động dục được báo cáo là 21,2±1,5 ngày [10]. Kết quả nghiên cứu trên giống dê Dwarf ở Pakistan cũng có kết quả về sự thay đổi của hai hormone theo chu kỳ tương tự trong nghiên cứu này. Khi bắt đầu chu kỳ, estradiol đạt mức cao hơn (7,7±1,7 pg/ml) ở giai đoạn động dục và giảm xuống mức thấp hơn trong vòng 3 đến 4 ngày sau động dục. Đồng thời, progesterone bắt đầu tăng từ giá trị trung bình cơ bản là 0,1±0,03 ng/ml vào ngày 0 lên 3,0±0,9 ng/ml vào ngày thứ 6 của chu kỳ động dục và đạt giá trị cao nhất là 7,7±0,6 ng/ml ở ngày 12. Từ ngày 15, giá trị progesterone giảm xuống cho đến cuối chu kỳ [11].

Nghiên cứu gần đây về 2 hormone này ở giai đoạn mang thai của dê Boer và Bách Thảo cho thấy, sau khi thụ thai, mức progesterone cao 3,02±0,34-12,20±0,50 ng/ml ở dê Boer; 3,26±0,47-11,88±0,92 ng/ml ở dê Bách Thảo. Khoảng giá trị cao được duy trì trong suốt thời kỳ mang thai và giảm nhanh chóng trong 19 ngày trước khi sinh, đạt 0,87-0,94 ng/ml vào ngày sinh. Mức progesterone tối đa trung bình trong thời kỳ mang thai là 12,20±0,50 ng/ml ở dê Boer và 11,88±0,92 ng/ml ở dê Bách Thảo. Estradiol duy trì ở nồng độ thấp hơn từ 0,96±0,44 đến 1,42±0,68 pg/ml (ở dê Bách Thảo) trong 14 ngày đầu; từ 0,81±0,46 đến 2,62±1,28 pg/ml (ở dê Boer) trong 21 ngày đầu và sau đó tăng dần lên ở mức trên 10 pg/ml (ở cả 2 giống dê) vào ngày 28. Estradiol tiếp tục tăng và đạt mức tối đa 204,48±36,68 pg/ml ở dê Boer vào ngày 126 và giảm dưới 10 pg/ml trong vòng 1-2 ngày sau khi sinh. Kết quả nghiên cứu này giúp chẩn đoán mang thai, dự đoán tuổi thai nhằm quản lý quá trình sinh sản hiệu quả [12].

Như vậy, nghiên cứu về nồng độ hormone estradiol và progesterone theo chu kỳ động dục cho thấy mức hormone khác nhau đáng kể trong mỗi giai đoạn của chu kỳ động dục, mức progesterone đạt đỉnh điểm trong giai đoạn động dục, giúp xác định đúng thời điểm động dục để ghép đôi hiệu quả. Cần tiếp tục có những nghiên cứu tương tự trên các giống dê khác cũng như đánh giá ảnh hưởng của di truyền, môi trường đến sinh lý sinh sản của dê.

5. Kết luận

Theo dõi hormone sinh sản bằng cách sử dụng phương pháp ECLIA cho thấy, dê Bách Thảo và Boer thể hiện cấu hình thay đổi progesterone và estradiol tương đương với các giống dê khác. Hàm lượng estradiol tăng cao ở đầu chu kỳ, progesterone đạt đỉnh vào những ngày giữa chu kỳ động dục. Việc theo dõi động thái

hormone này giúp xác định chính xác thời gian động dục, góp phần ghép đôi giao phối kịp thời, quản lý quá trình sinh sản hiệu quả. Các biến số như di truyền, dinh dưỡng, căng thẳng, biến đổi khí hậu... có thể ảnh hưởng đến các thông số sinh lý sinh sản, vì vậy cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu tương tự trên các giống dê khác đang nuôi ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả trân trọng cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển chăn nuôi gia súc lớn đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ trong quá trình thu mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.V. Binh (2006), *Results of Evaluating The Production Ability of F1 Crossbreeds Between Male Boer Goats and Female Beetal, Jumnapari, Bach Thao Goats and Bach Thao - Grass Hybrids Under Breeding Conditions in Our Country*, Scientific Report, National Institute of Animal Science (in Vietnamese).
- [2] M.G. Khadiga, K.G. Mohamed, F.T. Doaa (2005), "The hormonal profile during the estrous cycle and gestation in Damascus goats", *Small Rumin. Res.*, **57(1)**, pp.85-93, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.07.009.
- [3] N.D. Giao, N.C. Mai, T.T.V. Hong (2000), *Human and Animal Physiology*, Vietnam National University Ho Chi Minh City Publishing House, 665pp (in Vietnamese).
- [4] S. Zamfirescu, I. Topoleanu, D. Nadolu (2009), "Observations concerning haematological profile in goat", *Lucrari Seria Stiintifice*, **52**, pp.86-91.
- [5] N.L. Kanuya, B.M. Kessy, R. Nkya, et al. (2000), "Plasma progesterone concentrations and fertility of indigenous small East African goats bred after treatment with cloprostenol", *Small Rumin. Res.*, **35(2)**, pp.157-161, DOI: 10.1016/S0921-4488(99)00064-4.
- [6] T.G. Marcin, W. Jacek, K. Przemyslaw, et al. (2004), "Concentrations of progesterone and 17 β -estradiol in blood and milk and those of natural inhibitors in milk of goats in various physiological stages", *Arch. Tierz.*, **47**, pp.90-96.
- [7] G. Najafi, F. Cedden, S.A. Maleki (2014), "The determination of plasma progesterone, estradiol-17 β hormone level in Ghezel sheep treated with CIDR and various doses of PMGS during the breeding season", *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, **3** Spl Issue V, pp.118-122.
- [8] M. Zarkawi, A. Soukouti (2001), "Serum progesterone levels using radioimmunoassay during oestrous cycle of indigenous Damascus does", *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **44(2-3)**, pp.165-169, DOI: 10.1080/00288233.2001.9513473.
- [9] A.F. Alwan, F.A.M. Amin, N.S. Ibrahim (2010), "Blood progesterone and estrogen hormones level during pregnancy and after birth in Iraqi sheep and goat", *Basrah Journal of Veterinary Research*, **10(2)**, pp.153-157.
- [10] K.M. Gaafar, M.K. Gabar, D.F. Teleb (2005), "Hormonal profile during the estrous cycle and gestation in Damascus goats", *Small Ruminant Research*, **57(1)**, pp.85-93, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.07.009.
- [11] S. Khanum, M. HusSaenenin, R. KauSaenenr (2008), "Progesterone and estradiol profiles during estrous cycle and gestation in Dwarf goats (*Capra hircus*)", *Pakistan Vet. J.*, **28(1)**, pp.1-4.
- [12] N.T.T. Hien, N.T. Binh (2022), "Monitoring the estradiol and progesterone content of Bach Thao goats and Boer goats during pregnancy", *National Biotechnology Conference 2022*, Natural Science and Technology Publishing House, pp.768-773 (in Vietnamese).

Nghiên cứu nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16) thông qua phát sinh phôi soma và sử dụng công nghệ Bioreactor

Khổng Ngân Giang*, Lê Thị Như

Viện Di truyền Nông nghiệp, đường Phạm Văn Đồng, phường Cổ Nhuế 1, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/11/2022; ngày chuyển phân biện 2/12/2022; ngày nhận phân biện 23/12/2022; ngày chấp nhận đăng 27/12/2022

Tóm tắt:

Trong bài báo này, nghiên cứu tập trung vào việc xác định một số thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy nhằm tối ưu 4 bước chính của quá trình tạo phôi soma và tái sinh phôi bằng Bioreactor của 2 giống cà phê *Arabica* F1 Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16), bao gồm: hình thành mô sẹo phôi, nhân tế bào phôi, biệt hóa phôi và tái sinh phôi soma trong Bioreactor ngâm tằm thời RITA 1L. Kết quả cho thấy, sử dụng Kinetin 2 mg/l và Phytigel 4 g/l cho tỷ lệ hình thành mô sẹo từ mẫu lá các giống cà phê nghiên cứu đạt 94,2% ở giống H1 và 92,1% ở giống H16. Bên cạnh đó, việc bổ sung Glycine 20 mg/l vào môi trường nuôi cấy làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa lên 58,1% ở cả 2 giống. Thử nghiệm ảnh hưởng của Trichostatin A (TSA) 0,03 mg/l trong 7 ngày đầu nuôi cấy đến quá trình biệt hóa phôi cho thấy số lượng phôi ngưng tạo ra từ 1 g mô sẹo ban đầu đạt 1287 phôi ở giống H1 và 1635 phôi ở giống H16. Cuối cùng, sử dụng Bioreactor 1L-RITA, ngâm 1 phút trong khoảng thời gian 6 giờ cho hiệu quả tái sinh chồi từ phôi ngưng tạo đạt 75,02% ở giống H1 và 82,03% ở giống H16.

Từ khóa: *Arabica*, Bioreactor, *in vitro*, mô sẹo phôi hóa.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Coffea Arabica được trồng chủ yếu ở khu vực Mỹ Latinh và theo chiếm hơn 80% sản lượng cà phê thế giới theo Tổ chức Cà phê quốc tế (International Coffee Organization). Cây cà phê *Arabica* có tính đa dạng di truyền thấp và trước áp lực của biến đổi khí hậu các giống cà phê chè đang mất dần khả năng kháng các stress sinh học và phi sinh học, có sức sống yếu và năng suất thấp [1]. Do đó, từ những năm 1990, Trung tâm Quốc tế nghiên cứu nông nghiệp và phát triển của Pháp (CIRAD) phối hợp cùng Công ty Thương mại Cà phê ECOM (Thụy Sĩ) đã lai tạo giữa các dòng giống cà phê *Arabica* của Mỹ với các giống cà phê *Arabica* hoang dã từ Ethiopia và Sudan để tạo ra các giống lai F1 có tính đa dạng di truyền cao hơn [2]. Năng suất và chất lượng của các giống cà phê F1 đã được đánh giá trong khuôn khổ của dự án BREEDCAFS (Nghiên cứu lai tạo các giống cà phê cho các hệ thống nông lâm kết hợp) tại 4 quốc gia khác nhau, trong đó có Việt Nam. Kết quả cho thấy, 2 trong số các giống lai F1 bao gồm Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16) được đánh giá là có năng suất cao hơn 10-20% so với các giống địa phương. Hơn nữa, khả năng kháng bệnh gỉ sắt của các giống này cũng cao hơn, giúp giảm việc sử dụng thuốc trừ sâu 15-20%. Đặc biệt, các giống này có hương vị thơm ngon hơn các giống địa phương (<https://cordis.europa.eu/article/id/435693-climate-change-resilient-hybrid-coffee-with-added-profits>). Tuy vậy, các con lai mang cấu trúc di truyền dị hợp tử phải được nhân giống vô tính để bảo tồn tất

cả các đặc tính của cây mẹ. Do vậy, nhân giống từ phôi vô tính (Somatic embryogenesis - SE) được coi là công cụ hứa hẹn nhất để đảm bảo việc phổ biến rộng rãi các giống lai [3].

Từ những nghiên cứu tiên phong của G. Staritsky (1970) [4], M.R. Söndhal và cs (1977) [5], E.S. Pierson và cs (1983) [6] và P. Dublin (1981) [7], công nghệ tạo phôi soma (SE) đã được đề xuất như một phương pháp thay thế để nhân giống các giống cà phê ưu tú từ 2 loài cà phê *Coffea arabica* và *C. canephora*. Nuôi cấy mô của 2 loài cà phê này thể hiện tiềm năng tạo phôi cao. Sự phát triển phôi soma trực tiếp từ mẫu lá cà phê đã được báo cáo lần đầu tiên bởi G. Staritsky (1970) [4] và tỷ lệ tạo phôi từ mô sẹo cao được ghi nhận trong nghiên cứu của M.R. Söndhal và cs (1977) [5]. Các đặc điểm hình thái và mô học của cả mô sẹo có phôi và không có phôi cũng như các sự kiện mô học dẫn đến sự tái sinh phôi trong các công nghệ tạo phôi vô tính trực tiếp và gián tiếp đã được nhiều tác giả mô tả chi tiết. Ngoài ra, các nghiên cứu cũng cho thấy một số vấn đề vốn gây cản trở sự phát triển của phôi vô tính ở các loại cây trồng khác như: khó tái tạo các mô sinh phôi và hiệu ứng kiểu gen mạnh lại rất hạn chế ở cà phê [8-10].

Trong quá trình biệt hóa phôi, những khó khăn trong việc kéo dài sự phát triển của phôi đến giai đoạn hình thành phôi ngưng trong môi trường lỏng đã được báo cáo đối với hầu hết các loài, kể cả cà phê [11, 12]. K. Boutilier và cs (2002) [13] đã chỉ ra rằng, việc biệt hóa tạo phôi đơn bội ở thực

*Tác giả liên hệ: Email: ngangiang.khong2010@gmail.com

Study on rapid multiplication of two hybrid *Arabica* coffee varieties F1 Centroamericano (H1) and Mundo Maya (H16) through somatic embryogenesis and Bioreactor technology

Ngan Giang Khong*, Thi Nhu Le

Agricultural Genetics Institute, Pham Van Dong Street,
Co Nhue 1 Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

Received 29 November 2022; revised 23 December 2022; accepted 27 December 2022

Abstract:

In this paper, the research focuses on determining some components and culture conditions in order to optimise the 4 main steps of somatic embryogenesis and embryo regeneration by Bioreactor of two *Arabica* F1 coffee varieties H1 and H16, including: (1) formation of embryogenic callus, (2) multiplication of embryogenic cells, (3) embryonic differentiation, and (4) regeneration of somatic embryo using the temporary immersion Bioreactor RITA 1L. The results showed that on the medium supplemented with Kinetin 2 mg/l and Phytigel 4 g/l, the callus formation rate reached 94.2 and 92.1% for 2 varieties H1 and H16, respectively. Besides, the addition of Glycine 20 mg/l to the culture medium increased the embryogenic callus rate by 58.1% in both varieties. Adding Trichostatin A 0.03 mg/l in the embryo differentiation medium in the first 7 days of culture showed that the number of torpedo embryos was scored from 1g of initial callus up to 1287 in H1 and 1635 in H16. Finally, using Bioreactor 1L-RITA, soaking for 1 min every 6 hours, the regeneration efficiency reached 75.02% in H1 and 82.03% in H16.

Keywords: *Arabica*, Bioreactor, *in vitro*, somatic embryogenesis.

Classification number: 4.6

vật được kiểm soát bởi hoạt động của Histone deacetylase (HDAC). Ngăn chặn hoạt động của HDAC bằng chất ức chế HDAC (HDACi) dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ phôi biệt hóa [12]. R. Awada và cs (2020) [14] đã thử nghiệm ảnh hưởng của chất ức chế hoạt động của HDAC-TSA đến quá trình biệt hóa phôi ở *Arabica*, kết quả cho thấy số lượng phôi ngưng tạo ra tăng gấp 3 lần so với môi trường đối chứng không bổ sung TSA.

Nuôi cấy mô thực vật bằng công nghệ Bioreactor (lò phản ứng sinh học) là cách mở rộng quy mô hứa hẹn nhất cho quy trình vi nhân giống, đặc biệt là thông qua quá trình

phát sinh phôi soma. 20 dòng vô tính của *C. Arabica* lai F1 đã được nhân giống thành công bằng cách sử dụng lò phản ứng sinh học ngâm tạm thời 1 L-RITA® [15]. Tùy thuộc vào kiểu gen, sản lượng dao động từ 15.000 đến 50.000 phôi soma trên mỗi gram huyền phù phôi. Việc điều chỉnh thời gian ngâm là rất quan trọng với loại lò phản ứng sinh học này. J. Albarrán và cs (2005) [16] đã báo cáo rằng, việc tăng tần suất ngâm trong thời gian ngắn (ngâm 1 phút sau mỗi 24, 12 và 4 giờ) đã kích thích quá trình sản xuất phôi và cải thiện chất lượng phôi ngưng. Mặt khác, việc tăng thời gian ngâm (1, 5 và 15 phút) đã ức chế quá trình tái tạo phôi và ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng hình thái của chúng.

Ở Việt Nam, quy trình nhân nhanh cà phê bằng phôi soma đã được nghiên cứu hoàn thiện cho một số giống cà phê Robusta [17, 18]. Trong khi đó, các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi vô tính nuôi cấy trong hệ thống Bioreactor - RITA cũng đã được nghiên cứu cho giống cà phê *Arabica* TN1, tuy nhiên hệ số nhân phôi chỉ đạt 1-2 lần, quy trình nhân nhanh cho giống cà phê *Arabica* TN1 bằng công nghệ Bioreactor hoàn thiện vẫn chưa được báo cáo [18].

Trong bài báo này, các thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố như chất điều hòa sinh trưởng, thành phần môi trường nuôi cấy, bình nuôi cấy hay mật độ nuôi cấy đến việc tạo mô sẹo và phôi, nhân nhanh, biệt hóa và tái sinh phôi, cung cấp thông tin cần thiết cho việc hoàn thiện một quy trình nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* F1 tiềm năng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, địa điểm, thời gian nghiên cứu

Hai giống cà phê *Arabica* lai F1: Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16) được lai tạo bởi CIRAD và Công ty Thương mại Cà phê ECOM và được nhập nội trong khuôn khổ dự án BREEDCAFS (2017-2021), hiện đang lưu giữ tại Viện Di truyền Nông nghiệp.

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp từ tháng 7/2021 đến 9/2022.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu lá và khử trùng mẫu

Cây cà phê *Arabica* lai F1 H1 và H16 1 năm tuổi được trồng trong vườn thí nghiệm của Viện Di truyền Nông nghiệp. Các cặp lá thứ 2 hoặc 3 tính từ đỉnh chồi được sử dụng làm vật liệu thí nghiệm. Rửa lá dưới vòi nước, sau đó tiến hành khử trùng bằng 100 ml dung dịch Javen NaClO 2% bổ sung 2 giọt Tween 20%, trong thời gian 20 phút, rửa nhanh và ngâm trong nước cất vô trùng trong 20 phút.

2.2.2. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo

Mẫu lá sau khi khử trùng được cắt thành các mẫu hình vuông có kích thước 0,5-1 cm², đặt vào đĩa Petri (ø6 cm) chứa 10 ml môi trường tạo mô sẹo T1 [1/2 MS + đường 30 g/l + D-Myo inositol 0,1 g/l + Malt extract 0,4 g/l + 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 0,5 mg/l + Agar 5,5 g/l] bổ sung 2-iP (6-(γ,γ -Dimethylallylamino)-Purine) (2 mg/l) hoặc Kinetin (2-3 mg/l) [17, 19]. Mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 28°C, trong điều kiện tối. Khả năng tạo mô sẹo của các mẫu ở các công thức khác nhau được đánh giá sau 1 tháng nuôi cấy: Tỷ lệ tạo mô sẹo = Số mảnh lá xuất hiện mô sẹo/Tổng số mảnh lá thí nghiệm x 100%.

2.2.3. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất làm đặc môi trường đến khả năng tạo mô sẹo

Các mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường T1 với chất điều hòa sinh trưởng tối ưu từ thí nghiệm trước. Tiến hành đánh giá các chất làm đặc môi trường khác nhau bao gồm Agar 5,5 g/l, Gelrite 3,2 g/l hoặc Phytigel 4,0 g/l. Các mẫu được nuôi cấy trong cùng điều kiện như trên và đánh giá khả năng tạo mô sẹo của các mẫu sau 1 tháng nuôi cấy.

2.2.4. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của một số axit amin đến khả năng tạo mô sẹo phôi hóa

Sau 1 tháng nuôi cấy trên môi trường T1, những mẫu lá tạo mô sẹo được chuyển sang bình nuôi cấy chứa 50 ml môi trường tạo mô sẹo phôi hóa T2 (1/2 MS + đường 30 g/l + Cysteine 40 mg/l + D-Myo inositol 0,2 g/l + Malt extract 0,8 g/l + BAP (6-Benzylaminopurine) 4 mg/l + 2,4-D 1 mg/l) bổ sung axit amin Glycine (20 mg/l) hoặc Proline (20 mg/l) hay kết hợp cả 2 loại (Glycine 20 mg/l + Proline 20 mg/l). Mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 28°C, trong điều kiện tối. Sau 5-6 tháng nuôi cấy, đánh giá khả năng tạo mô sẹo phôi hóa thông qua: Tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa = Số mô sẹo phôi hóa/Số mô sẹo nuôi cấy x 100%.

2.2.5. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của bình nuôi cấy và mật độ nuôi cấy đến khả năng nhân phôi

Các mô sẹo phôi hóa là những mô sẹo hình thành trên bề mặt mô sẹo sơ cấp, có hình tròn, nhẵn, màu sắc từ vàng đến nâu nhạt khi quan sát dưới kính hiển vi. Các mô sẹo phôi hóa được chọn lọc để tiếp tục nhân lên trong môi trường lắc lỏng M (1/4 MS + đường 30 g/l + D-Myo inositol 0,1 g/l + BAP 1 mg/l + 2,4-D 0,3 mg/L). Tiến hành thử nghiệm nuôi cấy phôi ở 3 nồng độ 10-15-20 g/l với 2 loại bình: bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường M hoặc đĩa nuôi cấy 24 giếng, mỗi giếng chứa 1 ml môi trường M. Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, tối, tần số lắc 120 vòng/phút. Cây chuyển phôi sang môi trường mới 3 tuần/lần. Hệ số nhân phôi được đánh giá sau 3 tháng nuôi cấy :

Hệ số nhân phôi = Khối lượng tươi của phôi sau quá trình nuôi cấy/Khối lượng tươi của phôi ban đầu.

2.2.6. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất ức chế tăng sinh tế bào TSA đến sự phân hóa phôi

Sau 3 tháng nuôi cấy trong môi trường nhân nhanh, phôi được chuyển sang bình tam giác 250 ml, chứa 100 ml môi trường phân hóa phôi DIF (MS + đường 30 g/l + D-Myo inositol 0,1 g/l + BAP 1 mg/l), mật độ phôi 1 g/l. Nhằm ức chế sự tăng sinh và thúc đẩy sự biệt hóa của tế bào, tiến hành bổ sung vào môi trường hoạt chất TSA (Sigma) ở các nồng độ 0,03-0,3-3 mg/l trong thời gian 7 ngày hoặc 14 ngày đầu nuôi cấy, sau đó phôi được chuyển trở lại nuôi cấy trong môi trường DIF. Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, tối, tần số lắc 120 vòng/phút. Cây chuyển mẫu 3 tuần/lần trong vòng 3-4 tháng, sau đó tiến hành đánh giá và đếm số phôi ngưng đọng hình thành từ 1 g mô sẹo phôi hóa. Phôi ngưng đọng được xác định có hình dạng thon dài về phía hai đầu, với một đầu phân chia thành hai phần rõ rệt, có hình dạng giống chiếc ngư lôi.

2.2.7. Nghiên cứu đánh giá chu kỳ sục khí đến sự tái sinh phôi

Phôi được nuôi cấy tái sinh chồi trong hệ thống nuôi cấy bán ngập chìm Bioreactor RITA 1L (Sigma) chứa 200 ml môi trường tái sinh "DEV" (MS + Cysteine 10 mg/l + đường 30 g/l + BAP 0,5 mg/l). Mật độ nuôi cấy 500 phôi/bình RITA, thử nghiệm 4 tần suất bán ngập chìm khác nhau: 1 phút/6 giờ, 1 phút/8 giờ, 1 phút/10 giờ và 1 phút/12 giờ ở điều kiện nuôi cấy như trên. Sau 3 tháng nuôi cấy, tiến hành đánh giá tỷ lệ tái sinh của phôi: số phôi tái sinh/tổng số phôi nuôi cấy ban đầu x 100%.

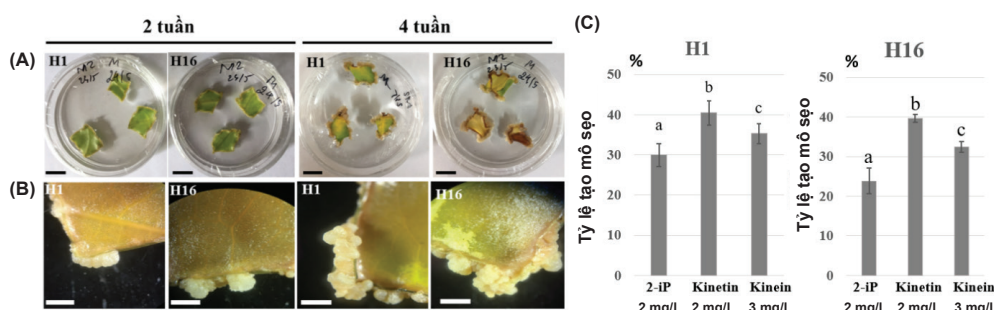
2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Mỗi thí nghiệm lặp lại 5 lần, số liệu được xử lý thống kê bằng phương pháp kiểm định phương sai ANOVA, sử dụng phần mềm R.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo

Mẫu lá cà phê được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo T1, bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng 2-iP 2 mg/l hoặc Kinetin 2-3 mg/l. Sau 2 tuần nuôi cấy, mô sẹo đã bắt đầu xuất hiện tại các cạnh của mảnh lá. Sau 4 tuần, số lượng mô sẹo tăng lên, kích thước đạt khoảng 3-5 mm (hình 1A và 1B). Tỷ lệ tạo mô sẹo trên môi trường bổ sung 2-iP (2 mg/l) là 29,99 và 23,88%, tương ứng với giống H1 và H16. Trên môi trường chứa Kinetin 2 mg/l, tỷ lệ tạo mô sẹo ở H1 và H16 lần lượt là 40,44 và 39,67%. Khi tăng nồng độ Kinetin lên 3 mg/l, tỷ lệ tạo mô sẹo giảm xuống còn 35,29 và 32,45%, tương ứng với 2 giống H1 và H16. Sự khác



Hình 1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo của 2 giống cà phê H1 và H16. (A) Mẫu lá cà phê H1, H16 trên môi trường tạo mô sẹo T1 bổ sung Kinetin 2 mg/l sau 2 tuần và 1 tháng nuôi cấy; thước: 1 cm; **(B)** Hình ảnh mô sẹo quan sát dưới kính hiển vi; thước: 1 mm; **(C)** Tỷ lệ tạo mô sẹo của 2 giống H1 và H16 trên các môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Trong cùng một giống, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

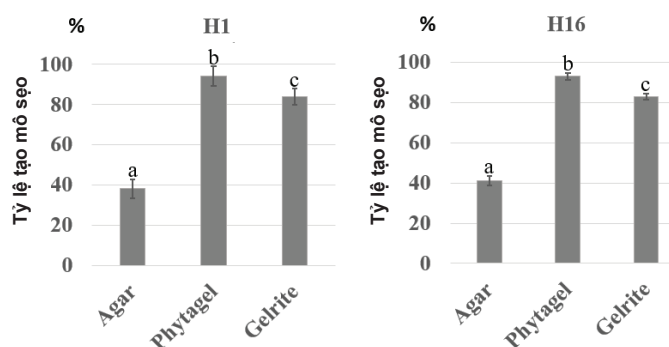
biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức thí nghiệm cho từng giống (hình 1C). Như vậy, sử dụng Kinetin ở nồng độ 2 mg/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo tốt nhất đối với cả 2 giống cà phê nghiên cứu. Trong nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo của nhóm tác giả N.T. Hau và cs (2013) [17] đã báo cáo sử dụng kết hợp 2,4-D (2 mg/l) và 2-IP (2 mg/l) cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất (33%) ở giống cà phê với cao sản. Còn trong nghiên cứu trên giống cà phê chè TN1, nhóm tác giả N.V. Thuong và cs (2017) [19] đã cho thấy công thức bổ sung 2,4-D 1 mg/l và Kinetin 2 mg/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo tốt nhất (47,8%). Các tác giả cũng chỉ ra rằng, không bổ sung Kinetin vào môi trường nuôi cấy thì tỷ lệ tạo mô sẹo chỉ đạt 14,2-16,3%.

3.2. Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của chất làm đặc môi trường đến khả năng tạo mô sẹo

Một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến các đặc tính hóa học và vật lý của môi trường nuôi cấy mô thực vật là các chất làm đặc môi trường. Các chất này làm cho môi trường cứng lại và ảnh hưởng đến các đặc tính khuếch tán của môi trường. Do đó, các chất làm đặc có tác động đáng kể đến phản ứng, sự tăng trưởng và phát triển của nguyên liệu nuôi cấy mô [20]. Hơn nữa, chúng có thể góp phần vào sự xuất hiện của hiện tượng cường nước (còn được gọi là quá trình thủy tinh hóa), là một rối loạn sinh lý phổ biến khiến lá trở nên giòn [21]. 2 loại chất tạo gel thường được sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật là Agar và Gellan gum. Agar là một loại polysaccharit được chiết xuất từ rong biển, trong khi Gellan gum (như Gelrite và Phytigel) là một loại polysaccharit của vi khuẩn. Do đó, tác động của các chất làm đặc môi trường đối với các quy trình nuôi cấy mô từ giai đoạn hình thành mô sẹo cho đến giai đoạn tái sinh chồi và ra rễ là khác nhau [22].

Sau khi chọn được chất điều hòa sinh trưởng tốt nhất cho việc phát sinh mô sẹo là Kinetin 2 mg/l, tiến hành thử nghiệm các chất làm đặc môi trường khác nhau: Agar 5,5 g/l, Phytigel 4 g/l và Gelrite 3,2 g/l. Quan sát cho thấy, trên môi trường sử dụng Agar 5,5 g/l, mô sẹo chỉ được hình thành ở vết cắt gân lá và một số điểm rải rác của vết cắt bản lá, số lượng mô sẹo ít, nhỏ, mảnh lá bắt đầu xuất hiện các đốm nâu sau 2 tuần nuôi cấy

và sau 1 tháng các đốm nâu đã lan rộng ra phần lớn diện tích bản lá. Ngược lại, sử dụng phytigel 4 g/l hoặc Gelrite 3,2 g/l, mô sẹo được hình thành ở toàn bộ vết cắt bản lá, số lượng mô sẹo nhiều và lớn, mảnh lá ít bị hóa nâu. Tỷ lệ tạo mô sẹo trên môi trường sử dụng Gelrite 3,2 g/l là 83,75 và 83,04%, tương ứng với giống H1 và H16. Trên môi trường bổ sung Phytigel 4 g/l tỷ lệ mô sẹo đạt cao nhất tới 94,2% đối với giống H1 và 92,1% cho giống H16, không có lần lặp nào có tỷ lệ thấp hơn 85%. Trên môi trường sử dụng Agar 5,5 g/l, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo thấp nhất, ở H1 là 38% và H16 là 41% (hình 2). Sự khác biệt về tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.



Hình 2. Tỷ lệ tạo mô sẹo của 2 giống cà phê H1 và H16 trên các môi trường sử dụng các chất làm đặc khác nhau. Thước: 1 cm. Trong cùng một giống, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

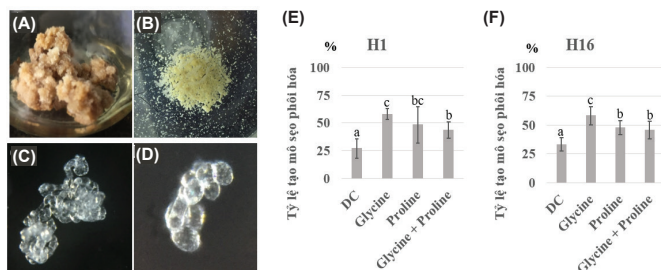
Trong số các chất làm đặc môi trường, Agar thường tạo ra môi trường gel ổn định trong thời gian dài và không liên kết quá mức với các thành phần môi trường, tuy nhiên thường có nhiều tạp chất. Mặt khác, Gelrite/Phytigel tạo ra gel cứng ở nồng độ thấp hơn nhiều so với Agar, gần như trong suốt, giúp dễ dàng xác định sự lây nhiễm ở giai đoạn đầu. Gelrite/Phytigel không chứa các hợp chất Phenolic [23] và đã được báo cáo là mang lại kết quả tốt hơn Agar

trong: tái sinh và nhân chồi [24], sản xuất phôi soma và sự phát triển của mô sẹo [25, 26]. Kết quả từ thí nghiệm này đã củng cố sự tin cậy cho các kết luận này.

Như vậy, kết quả đánh giá ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng và chất làm đặc môi trường đến khả năng tạo mô sẹo của 2 giống cà phê H1 và H16 cho thấy, sử dụng chất điều hòa sinh trưởng Kinetin 2 mg/l và chất làm đặc môi trường Phytigel 4 g/l cho hiệu quả tạo mô sẹo tốt nhất đối với cả 2 giống nghiên cứu, tỷ lệ tạo mô sẹo đạt trên 90% ở cả 2 giống H1 (94,2%) và H16 (92,1%).

3.3. Đánh giá ảnh hưởng của một số axit amin đến khả năng tạo mô sẹo phôi hóa

Tạo mô sẹo phôi hóa là bước quan trọng để tạo dịch huyền phù tế bào. Tiêu chí để chọn lọc mô sẹo phôi hóa là: mô sẹo toir xộp, màu sắc từ vàng đến nâu nhạt và có một số phôi soma quan sát được trên bề mặt của nó (hình 3A). Các cụm mô sẹo sẽ nhanh chóng tách rời trong dung dịch lỏng (hình 3B). Quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy các mô sẹo phôi hóa có hình dạng tròn, nhân nổi rõ, tỷ lệ nhân/tế bào chất cao, không bào nhỏ, trong tế bào chất có nhiều dạng cấu trúc hình cầu nhỏ (hình 3C và 3D).



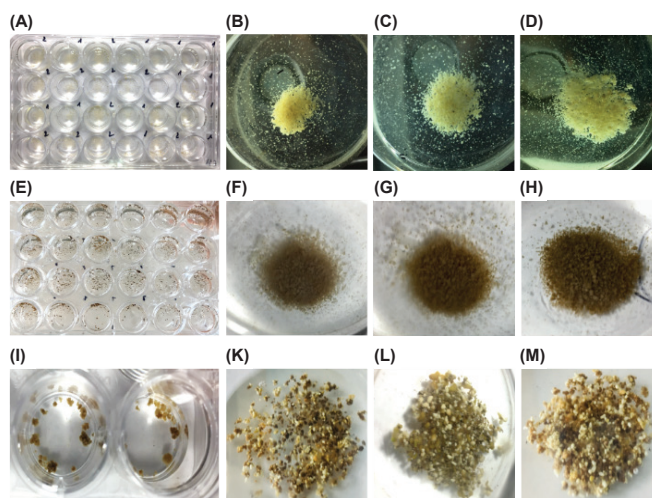
Hình 3. Hình ảnh mô sẹo phôi hóa và tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa của 2 giống cà phê H1 và H16 trên môi trường bổ sung các axit amin khác nhau. (A) Mô sẹo của giống H16 trên môi trường tạo mô sẹo phôi hóa T2, bổ sung Glycine 20 mg/l, sau 6 tháng nuôi cấy; (B) Mô sẹo phôi hóa của giống H16 được phân tách ngay sau khi chuyển sang môi trường nhân nhanh lỏng M; (C, D) Mô sẹo phôi hóa của giống H16 quan sát dưới kính hiển vi, 10X (C), 70X (D); (E, F) Tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa của 2 giống H1 và H16 trên các môi trường bổ sung các axit amin khác nhau. DC: đối chứng (môi trường T2 không bổ sung axit amin). Trong cùng một hình các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Đánh giá khả năng phôi hóa mô sẹo trên các môi trường thử nghiệm cho thấy, trên môi trường đối chứng T2 không bổ sung axit amin, tỷ lệ phôi hóa mô sẹo đạt 27,1 và 33,2%, tương ứng cho 2 giống H1 và H16. Trong khi đó, việc bổ sung các axit amin làm tăng tỷ lệ mô sẹo phôi hóa ở cả 2 giống thí nghiệm. Đối với môi trường bổ sung Proline, tỷ lệ phôi hóa đạt 43,7 và 45,7%, lần lượt ở giống H1 và H16. Trên môi trường chỉ bổ sung Glycine, tỷ lệ mô sẹo phôi hóa của giống H1 và H16 đều đạt 58,1%. Khi sử dụng kết hợp

Proline và Glycine, tỷ lệ mô sẹo phôi hóa lần lượt là 48,5 và 48,1% ở 2 giống H1 và H16 (Hình 3E, 3F). Như vậy có thể thấy, sử dụng Glycine 20 mg/l hay Proline 20 mg/l đơn lẻ hoặc kết hợp đều mang lại hiệu quả tốt hơn trong việc tạo mô sẹo phôi hóa, tỷ lệ phôi hóa đạt cao nhất trên môi trường bổ sung Glycine 20 mg/l ở cả 2 giống nghiên cứu.

3.4. Đánh giá ảnh hưởng của bình nuôi cấy và mật độ nuôi cấy đến khả năng nhân phôi

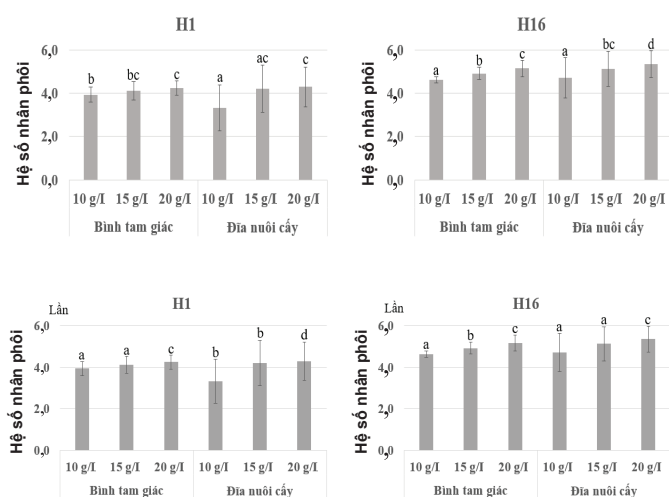
Các mô sẹo phôi hóa được chọn lọc và nuôi cấy trong môi trường nhân phôi lỏng M, sử dụng bình tam giác 250 ml hoặc đĩa 24 giếng. Mật độ nuôi cấy 10, 15, 20 g/l mô sẹo (hình 4A-4D). Sau 3 tuần nuôi cấy, các tế bào chuyển sang màu nâu sẫm và bắt đầu nhân lên (hình 4E-4H). Sau 3 tháng nuôi cấy trong môi trường nhân nhanh M, các tế bào mới được hình thành và tăng lên về kích thước. Các tế bào mới có màu vàng hoặc vàng nhạt, có hoặc không bám vào các phôi màu nâu tối (hình 4I-4M).



Hình 4. Hình ảnh nhân nhanh phôi của giống cà phê H16 trong bình tam giác hoặc đĩa 24 giếng. (A, E, I) Phôi nuôi cấy trong đĩa 24 giếng lần lượt ở các thời điểm 0 ngày, 1 tháng và 3 tháng; (B-D) Phôi nuôi cấy trong bình tam giác ở thời điểm 0 ngày với các mật độ nuôi cấy 10 (B), 15 (C) và 20 g/l (D); (F-H) Phôi nuôi cấy trong bình tam giác sau 1 tháng nuôi cấy với các mật độ nuôi cấy 10 (F), 15 (G) và 20 g/l (H); (K-M) Phôi nuôi cấy trong bình tam giác sau 3 tháng nuôi cấy với các mật độ nuôi cấy 10 (K), 15 (L) và 20 g/l (M).

Phân tích kết quả cho thấy hiệu quả nhân nhanh của mô sẹo trong môi trường lỏng có xu hướng tăng lên khi mật độ tế bào nuôi cấy càng cao ở cả 2 giống H1 và H16. Đối với giống H1, khi nuôi cấy trong bình tam giác 250 ml, hiệu quả nhân nhanh của mô sẹo phôi hóa đạt 3,94, 4,12 và 4,25 lần tương ứng với 3 nồng độ nuôi cấy tế bào 10, 15, 20 g/l, còn ở trong đĩa 24 giếng lần lượt là 3,32, 4,21 và 4,29 lần, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 2 nồng độ nuôi cấy 15 và 20 g/l ở cả 2 loại bình nuôi cấy. Ở giống H16, hiệu quả nhân nhanh mô sẹo phôi hóa 4,62, 4,92 và 5,16 lần trong bình

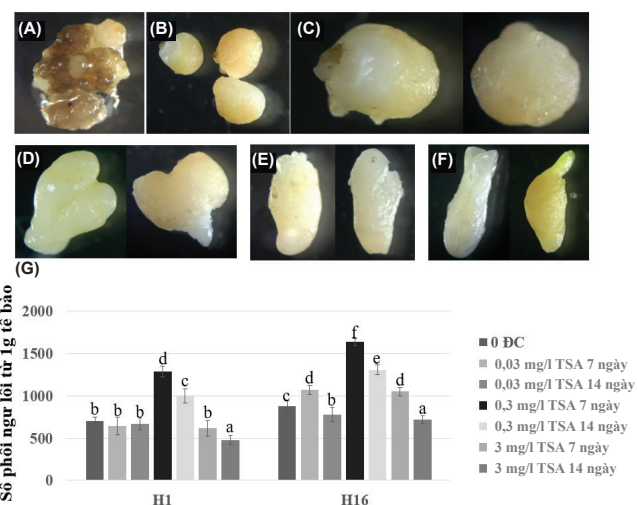
tam giác và 4,72, 5,12 và 5,35 lần khi sử dụng đĩa 24 giếng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mật độ nuôi cấy khi so sánh trong cùng bình nuôi cấy (hình 5)... Tuy nhiên, sử dụng đĩa 24 giếng đòi hỏi nhiều thao tác và khả năng lây nhiễm cao hơn. Việc nhân nhanh các mô sẹo phôi hóa trong bình tam giác 250 ml có thể áp dụng với quy mô lớn hơn mà không làm giảm hiệu quả tăng sinh và tạo phôi.



Hình 5. Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy và bình nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh phôi của 2 giống cà phê H1 và H16. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ trong cùng một giống.

3.5. Đánh giá ảnh hưởng của chất ức chế tăng sinh tế bào TSA đến sự phân hóa phôi

Sau quá trình nhân nhanh, các tế bào được chuyển sang môi trường phân hóa phôi DIF có bổ sung TSA, chất được biết đến là có khả năng ức chế sự tăng sinh của các tế bào và thúc đẩy quá trình biệt hóa của tế bào [14]. Tiến hành thử nghiệm 3 nồng độ TSA khác nhau: 0,03, 0,3, 3 mg/l bổ sung vào môi trường nuôi cấy DIF trong thời gian 7 ngày và 14 ngày đầu nuôi cấy, mật độ nuôi cấy phôi 1 g/l, sau đó phôi được tiếp tục nuôi cấy trong môi trường DIF có TSA. Sau 3 tuần đầu tiên, hỗn hợp tế bào nuôi cấy chuyển màu từ nâu sang vàng hoặc vàng nhạt, quan sát dưới kính hiển vi thấy các tế bào phát triển thành các phôi hình cầu (hình 6A-6C). Ba tuần tiếp theo các phôi hình tim được hình thành, với kích thước lớn hơn và hầu hết có màu vàng sáng hoặc vàng trắng (hình 6D). Sau một tháng nuôi cấy trong môi trường DIF, các phôi tiếp tục phân hóa sang dạng phôi ngư lôi với 2 cụm mô phân sinh phình to và tách biệt từ một đầu, trục phôi kéo dài hơn và có màu tối hơn (hình 6E). Đến cuối giai đoạn phân hóa, 2 lá mầm đã hình thành từ 2 cụm mô phân sinh và chuyển dần từ màu vàng trắng sang màu xanh nhạt, trục phôi to hơn và có màu vàng sẫm hơn hoặc vàng xanh (hình 6F).

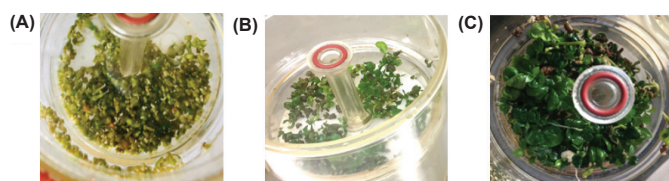


Hình 6. Quá trình phân hóa của phôi và ảnh hưởng của chất ức chế tăng sinh tế bào TSA đến khả năng tạo phôi ngư lôi ở 2 giống cà phê H1 và H16. (A-F) Hình ảnh biệt hóa của phôi H16 trong môi trường DIF bổ sung TSA 0,3 mg/l với thời gian xử lý 7 ngày. A: phôi tế bào H16 thời điểm bắt đầu nuôi cấy; B, C: phôi có dạng hình cầu sau 3 tuần nuôi quan sát dưới kính hiển vi 1X (B) và 4X (C); D: phôi có dạng hình tim sau 3 tháng nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi 1X; E: phôi ngư lôi với 2 cụm mô phân sinh phình to và tách biệt từ một đầu sau 4 tháng nuôi cấy; F: phôi tái sinh lá mầm hình thành từ 2 cụm mô phân sinh; G: số phôi ngư lôi từ 1 g tế bào ở các công thức bổ sung nồng độ TSA khác nhau sau 3 tháng nuôi cấy. Thước: 1 mm. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ trong cùng một giống.

Kết quả cho thấy, việc bổ sung TSA trong thời gian ngắn 7 ngày có tác động tốt hơn đến quá trình biệt hóa của phôi so với thời gian xử lý 14 ngày. Tương tự việc tăng nồng độ TSA cũng có xu hướng làm giảm số lượng phôi ngư lôi tạo ra ở cả 2 giống nghiên cứu (hình 6G). Cụ thể, bổ sung TSA ở nồng độ thấp 0,03 mg/l ở cả 2 thời điểm xử lý hầu như không gây ra sự thay đổi có ý nghĩa thống kê về số lượng phôi ngư lôi tạo ra so với môi trường đối chứng không bổ sung TSA đối với cả 2 giống H1 (699 phôi) và H16 (879 phôi). Khi tăng nồng độ TSA lên 0,3 mg/l, số phôi ngư lôi tạo ra đã tăng lên đạt 1287 (thời gian xử lý 7 ngày) và 998 phôi (thời gian xử lý 14 ngày) đối với giống H1 và 1635 và 1306 phôi đối với giống H16. Tuy nhiên, ở nồng độ TSA 3 mg/l, số phôi ngư lôi tạo ra đã giảm xuống còn 614 và 487 phôi đối với giống H1 và 1051 và 717 đối với giống H16 (hình 6G). Như vậy bổ sung TSA 0,3 mg/l trong 7 ngày đầu nuôi cấy phôi trong môi trường biệt hóa DIF mang lại hiệu quả tạo phôi ngư lôi tốt nhất cho cả 2 giống H1 và H16. Kết quả này cũng đã được kiểm chứng ở các giống *Arabica*, việc đáp ứng TSA trong thời gian ngắn (7 ngày) làm tăng khả năng phân hóa phôi soma của các giống *Arabica* lên gấp 3 lần, đạt gần 10000 phôi ngư lôi từ 1g phôi ban đầu [14].

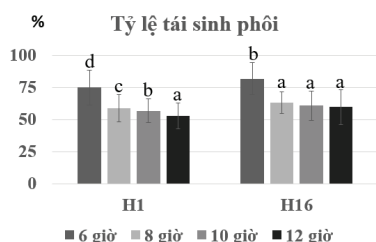
3.6. Đánh giá ảnh hưởng của chu kỳ sục khí đến sự tái sinh phôi trong bình RITA 1L.

Các phôi ngư lôi được chuyển sang tái sinh trong Bioreactor RITA 1L, sử dụng môi trường DEV (MS + cysteine 10 mg/l + đường 30 g/l + BAP 0,5 mg/l). Sau 1 tháng nuôi cấy, phôi phát triển 2 lá mầm rõ ràng có màu xanh đậm (hình 7A). Sau 2 tháng, 2 lá mầm tăng lên về kích thước, trục phôi kéo dài ra và có màu xanh nhạt (hình 7B). Cuối giai đoạn tái sinh, có thể quan sát được cây non với một cặp lá thật màu xanh đậm, thân được hình thành từ trục phôi có màu xanh nhạt hơn và có thể xuất hiện rễ giả màu trắng (Hình 7C).



Hình 7. Hình ảnh tái sinh từ phôi của giống H16 trong Bioreactor RITA 1L. Phôi tái sinh trong môi trường tái sinh DEV với tần suất ngập 1 phút/6 giờ, sau thời gian nuôi cấy: 1 tháng (A), 2 tháng (B) và 3 tháng (C).

Với việc tái sinh phôi trong môi trường bán ngập chìm, tần suất ngập là một trong những yếu tố quan trọng tác động trực tiếp đến sự tái sinh. Khi tần số ngập quá lớn có thể làm tăng tốc độ tái sinh nhưng cũng làm tăng tỷ lệ úng cây non, tần số ngập quá nhỏ lại làm giảm hiệu quả tái sinh và kéo dài thời gian tái sinh. Đánh giá các tần số ngập 1 phút mỗi 6, 8, 10 và 12 giờ cho thấy, 2 giống cà phê nghiên cứu thể hiện sự đáp ứng tốt hơn trong điều kiện ngập 1 phút mỗi 6 giờ với tỷ lệ tái sinh đạt 75,02 và 82,03% tương ứng ở H1 và H16 (hình 8). Trong khi đó, với tần suất ngập mỗi 1 phút trong 8 giờ, tỷ lệ tái sinh phôi là 59,04% và 63,45% lần lượt ở H1 và H16. Kết quả ghi nhận khi tần suất ngập 1 phút mỗi 10 giờ, tỷ lệ tái sinh ở H1 và H16 giảm còn 57,04% và 60,87%; tỷ lệ này chỉ còn 52,89% và 59,98% tương ứng khi tần suất ngập 1 phút/12 giờ. Như vậy, việc tăng tần suất bán ngập chìm lên 1 phút mỗi 6 giờ cho tỷ lệ tái sinh phôi cao nhất đối với cả 2 giống H1 và H16.

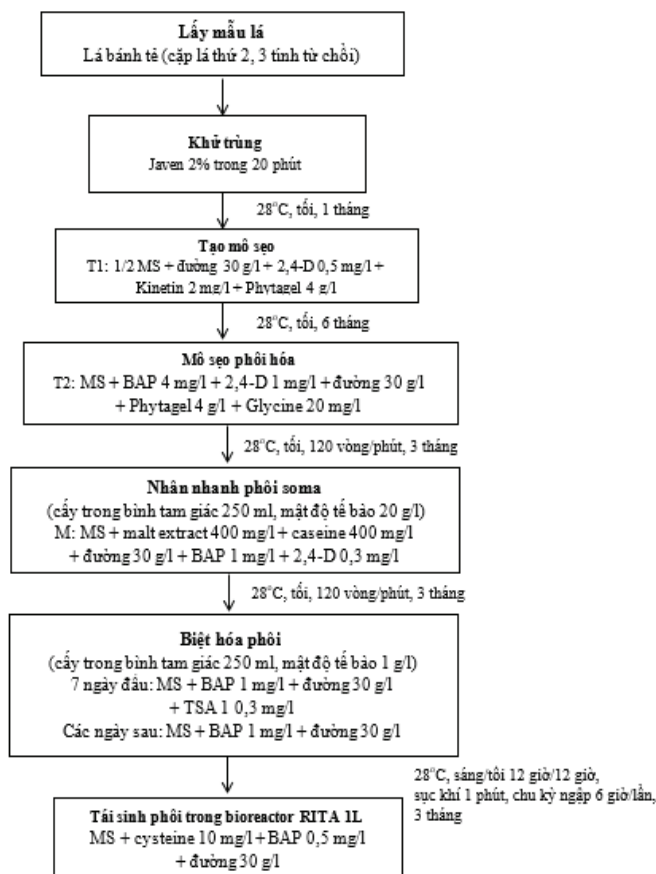


Hình 8. Hiệu quả tái sinh của phôi trong Bioreactor RITA 1L. Tỷ lệ tái sinh của phôi giống H1 và H16 trong các tần suất bán ngập chìm khác nhau 1 phút mỗi 6, 8, 10 và 12 giờ mỗi phút. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ trong cùng một giống.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã hoàn thiện quy trình nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 H1 và H16 bằng công nghệ Bioreactor. Kết quả thu được cụ thể như sau: sử dụng chất điều hòa sinh trưởng Kinetin 2 mg/l và chất làm đặc Phytigel 4 g/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 94,2 và 92,1% ở 2 giống H1 và H16 tương ứng; bổ sung axit amin Glycine 20 mg/l vào môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa đạt 58,1% ở cả 2 giống; nuôi cấy các phôi cà phê với mật độ 20 g/l trong bình tam giác 250 ml cho hệ số nhân phôi là 4,25 và 5,16 lần tương ứng ở H1 và H16. Đánh giá ảnh hưởng của TSA trong quá trình biệt hóa phôi cho thấy bổ sung TSA 0,3 mg/l trong 7 ngày đầu nuôi cấy cho số lượng phôi ngư lôi tạo ra cao nhất là gần 1287 và 1635 phôi ngư lôi/g phôi nuôi cấy ban đầu với giống H1 và H16; hiệu quả tái sinh phôi ngư lôi của 2 giống đạt được tốt nhất trên môi trường DEV khi nuôi cấy trong Bioreactor với tần suất ngập 1 phút mỗi 6 giờ, cho tỷ lệ tái sinh cây đạt 75,02 và 82,03%, tương ứng với giống H1 và H16.

Sơ đồ tóm tắt quy trình nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 H1 và H16 được thể hiện ở hình 9.



Hình 9. Quy trình nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 H1 và H16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Lashermes, B. Bertrand, H. Etienne (2009), "Breeding coffee (*Coffea arabica*) for sustainable production", *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, pp.525-543.
- [2] H.V.D. Vossen, B. Bertrand, A. Charrier (2015), "Next generation variety development for sustainable production of *Arabica* coffee (*Coffea arabica* L.): A review", *Euphytica*, **204**, pp.243-256, DOI: 10.1007/s10681-015-1398-z.
- [3] H. Etienne, D. Breton, J.C. Breitler, et al. (2018), "Coffee somatic embryogenesis: How did research, experience gained and innovations promote the commercial propagation of elite clones from the two cultivated species?", *Front. Plant Sci.*, **9**, DOI: 10.3389/fpls.2018.01630.
- [4] G. Staritsky (1970), "Embryoid formation in callus tissues of coffee", *Acta Bot. Neerl.*, **19(4)**, pp.509-514, DOI: 10.1111/j.1438-8677.1970.tb00677.x.
- [5] M.R. Söndahl, W.R. Sharp (1977), "High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea Arabica*", *Z. Pflanzenphysiol.*, **81(5)**, pp.395-408, DOI: 10.1016/S0044-328X(77)80175-X.
- [6] E.S. Pierson, A.A.M.V. Lammern, H.N. Schel, et al. (1983), "In vitro development of embryoids from punched leaf dishes of *Coffea canephora*", *Protoplasma*, **115**, pp.208-216, DOI: 10.1007/BF01279811.
- [7] P. Dublin (1981), "Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de cafeeier arabusta", *Café Cacao*, **25(4)**, pp.237-242.
- [8] A.M.G. Arias, G.A. Espinoza, A.M.E. Esquivel (2008), "Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimization of genetic transformation in *Coffea Arabica* L. cvs. caturra and catuai", *Electron. J. Biotech.*, **11(1)**, pp.1-11, DOI: 10.2225/vol11-issue1-fulltext-9.
- [9] M.S. Padua, L.V. Paiva, L.C. Silva, et al. (2014), "Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli", *Ciênc. Rural*, **44(4)**, pp.660-665.
- [10] A.T. Silva, D. Barduche, K.G. Livramento, et al. (2014), "Characterization of a putative serk-like ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L.", *Plant Mol. Biol. Rep.*, **32**, pp.176-184, DOI: 10.1007/s11105-013-0632-x
- [11] F. Ardiyani, E.S.W. Utami, H. Purnobasuki, et al. (2020), "Development and regeneration of somatic embryos from leaves-derived calli of *Coffea liberica*", *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **21(12)**, pp.5829-5834, DOI: 10.13057/biodiv/d211246.
- [12] M.S.D. Ibrahim, C. Tresniawati (2020), "Evaluation of *Arabica* coffee propagation using cell suspension culture", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **418(1)**, pp.1-8, DOI: 10.1088/1755-1315/418/1/012013.
- [13] K. Boutilier, R. Offringa, V.K. Sharma, et al. (2002), "Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth", *Plant Cell*, **14(8)**, pp.1737-1749, DOI: 10.1105/tpc.001941.
- [14] R. Awada, D. Verdier, S. Froger, et al. (2020), "An innovative automated active compound screening system allows high-throughput optimization of somatic embryogenesis in *Coffea Arabica*", *Scientific Reports*, **10**, DOI: 10.1038/s41598-020-57800-6.
- [15] H. Etienne, B. Bertrand, F. Anthony, et al. (1997), "L'embryogenèse somatique: Un outil pour l'amélioration génétique du cafeeier," *Proceedings of The 17th Colloquium of International Coffee Science Association*, pp.457-465.
- [16] J. Albarrán, B. Bertrand, M. Lartaud, et al. (2005), "Cycle characteristics in a temporary immersion Bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **8**, pp.27-36, DOI: 10.3389/fpls.2022.994578.
- [17] N.T. Hau, T.V. Minh (2013), "Micropropagation of coffee (*Coffea robusta*) by somatic embryogenesis techniques", *National Conference on Biotechnology 2023 (in Vietnamese)*.
- [18] N.T. Mai, V. Phan, T.V. Tan, et al. (2016), "Study on *in vitro* propagation of some selected *Coffea canephora* clones via callus and somatic embryogenesis", *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **1(13)**, pp.100-103 (in Vietnamese).
- [19] N.V. Thuong, T.T.H. Anh, N.V. Phuong, et al. (2017), "Callus formation to reproduce somatic embryos of arabica coffee cultivar TN1", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **59(10)**, pp.37-40 (in Vietnamese).
- [20] N. Das, N. Tripathi, S. Basu, et al. (2015), "Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms", *Front. Microbial.*, **6**, DOI: 10.3389/fmicb.2015.00698.
- [21] A. Amer, H. Omar (2019) "In vitro propagation of the multipurpose Egyptian medicinal plant *Pimpinella anisum*", *Egypt. Pharm. J.*, **18(3)**, pp.254-262.
- [22] P. Venkataiah, P. Bhanuprakash, K.S. Suman, et al. (2016), "Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L.", *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **14(1)**, pp.55-60, DOI: 10.1016/j.jgeb.2016.02.001.
- [23] P.A. Scherer, E. Muller, H. Lippert (1988), "Multielement analysis of agar and Gelrite impurities investigated by inductively coupled plasma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or the gellan gum Gelrite", *Acta Hort.*, **226(91)**, pp.655-658, DOI: 10.17660/ActaHortic.1988.226.91.
- [24] M. Welander, G. Maheswaran (1992), "Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks", *J. Plant Physiol.*, **140(2)**, pp.223-228, DOI: 10.1016/S0176-1617(11)80939-9.
- [25] T. Ichi, T. Koda, L. Asai (1986), "Effects of gelling agents on *in vitro* culture of plant tissues", *Agric. Biol. Chem.*, **50(9)**, pp.2397-2399, DOI: 10.1080/00021369.1986.10867756.
- [26] L.C. Huang, D.L. Chi (1988), "Pivotal roles of picloram and gelrite in banana callus culture", *Environ. Exp. Bot.*, **28(3)**, pp.249-258, DOI: 10.1016/0098-8472(88)90035-4.

Nhân giống *in vitro* cây Trầu bà vàng chanh (*Philodendron hederaceum* “Lemon Lime”)

Ninh Thị Thảo, Nguyễn Hồng Thương, Đinh Trường Sơn, Phạm Thị Dung, Nông Thị Huệ*

Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/11/2022; ngày chuyển phân biện 2/12/2022; ngày nhận phân biện 27/12/2022; ngày chấp nhận đăng 29/12/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát khả năng nhân giống *in vitro* cây Trầu bà vàng chanh (*Philodendron hederaceum* “Lemon Lime”). Kết quả thu được cho thấy, môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA là thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh với hệ số nhân chồi đạt 2,73 lần, chiều cao chồi đạt 5,38 cm và số lá/chồi đạt 4,33 lá sau 6 tuần nuôi cấy. Trong giai đoạn tiếp theo, chồi được chuyển sang môi trường MS + 0,25 mg/l IBA để tạo rễ. Sau 5 tuần nuôi cấy, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, 3,9 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình đạt 11,04 cm, cây sinh trưởng phát triển tốt. Ở giai đoạn vườn ươm, tỷ lệ cây sống đạt 100%, chiều cao chồi và số lá tăng thêm đạt lần lượt 2,19 cm và 1,96 lá sau 4 tuần trên giá thể peatmoss:đất:xơ dừa với tỷ lệ 1:1:1. Các kết quả đạt được của nghiên cứu góp phần thiết lập quy trình vi nhân giống loài cây này với hệ số nhân giống và chất lượng cây giống tốt làm cơ sở cho việc cung cấp nguồn giống chất lượng cho thị trường cây cảnh ở Việt Nam.

Từ khoá: BA, IBA, nhân nhanh *in vitro*, peatmoss, Trầu bà vàng chanh.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Sở hữu những chiếc lá hình trái tim rực rỡ nổi bật bởi màu vàng, cây Trầu bà vàng chanh hay còn gọi là Trầu bà vàng (*Philodendron hederaceum* “Lemon Lime”) rất được ưa chuộng để làm cây trồng trang trí trong nhà. Bên cạnh đó, cây Trầu bà vàng chanh còn có tác dụng lọc khí rất tốt, giúp hấp thu lượng khí thải độc hại, loại bỏ các chất bụi bẩn, mang đến không gian trong lành. Mặt khác, Trầu bà vàng chanh là cây được liệu được sử dụng khá nhiều đối với bệnh thận [1]. Vì những lợi ích này, nhu cầu sử dụng cây Trầu bà vàng chanh ngày một tăng.

Cây Trầu bà nói chung và cây Trầu bà vàng chanh nói riêng thường được nhân giống từ nhánh hoặc mắt lá. Theo đó, các đoạn nhánh hoặc mắt lá sau khi cắt khỏi cây mẹ được giâm vào giá thể hoặc nước để kích thích đâm thân mọc rễ. Phương pháp nhân giống này khá đơn giản và rất dễ thực hiện nhưng lại có nhược điểm là hệ số nhân thấp, cây dễ thoái hoá và khó kiểm soát được phẩm chất của cây con [2]. Hơn nữa, do nhựa cây Trầu bà vàng chanh có chứa các chất gây dị ứng như alkylresorcinol và alkenylresorcinol nên phương pháp nhân giống truyền thống với loài cây này có thể gây ảnh hưởng đến sức khoẻ người thao tác [3]. Để khắc phục các hạn chế này, phương pháp nhân giống *in vitro* là một giải pháp hiệu quả vì cho hệ số nhân giống cao, cây giống tạo ra hoàn toàn sạch bệnh, đồng nhất về kiểu hình và có thể sản xuất được ở quy mô lớn [4].

Kể từ công bố đầu tiên về nhân giống *in vitro* cây Trầu bà *P. tuxlanum* vào năm 1990 [5], đã có khá nhiều báo cáo sử dụng các nguồn vật liệu ban đầu khác nhau để thiết lập

quy trình nhân giống *in vitro* một số giống cây Trầu bà như Trầu bà đế vương *P. imperial* [2], Trầu bà cánh phượng *P. xanadu* [4, 6-8], Trầu bà tay phật *P. bipinnatifidum* [9, 10]. Tuy nhiên cho đến nay, chúng tôi chưa thấy có nghiên cứu nào sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào để nhân giống cây Trầu bà vàng chanh trên thế giới và ở Việt Nam được chính thức công bố. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát khả năng nhân giống *in vitro* cây Trầu bà vàng chanh, góp phần thiết lập quy trình vi nhân giống loài cây này cho hệ số nhân giống và chất lượng cây giống tốt, làm cơ sở cho việc cung cấp cây giống cho thị trường cây cảnh ở Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu sử dụng cho các thí nghiệm là chồi cây Trầu bà vàng chanh *in vitro* sinh trưởng phát triển tốt, có chiều cao 1,0-1,5 cm, 1-2 lá.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 10/2021 đến tháng 7/2022 tại Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi *in vitro* cây Trầu bà vàng chanh: Các chồi Trầu bà vàng chanh có chiều cao 1,0-1,5 cm, 1-2 lá được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/l đường sucrose, 7,0 g/l agar và chất điều tiết sinh trưởng

*Tác giả liên hệ: Email: nthue@vnua.edu.vn

In vitro propagation of *Philodendron hederaceum* “Lemon Lime”

Thi Thao Ninh, Hong Thuong Nguyen,
Truong Son Dinh, Thi Dung Pham, Thi Hue Nong*

Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 29 November 2022; revised 27 December 2022; accepted 29 December 2022

Abstract:

This study aims to examine the *in vitro* propagation of *Philodendron hederaceum* “Lemon Lime”. The results showed that MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA was suitable for the rapid multiplication stage, with the rate of shoot proliferation being 2.73 times, the shoots being 5.38 cm in height and the number of leaves/shoot was 4.33 after 6 weeks of culture. In the next stage, *in vitro* shoots were transferred to MS medium containing 0.25 mg/l IBA for rooting. Within five weeks of culture, 100% of shoots induced roots with a mean of 3.9 roots/plant and the root length was 11.04 cm. In the acclimatisation phase, plantlets achieved 100% *ex vitro* survival, increased by 2.19 cm in height and 1.96 leaves after four-week acclimatisation in a substrate composed of peatmoss:soil:coconut husk (1:1:1). These research results could be used to cultivate this plant with high proliferation rate and good commercial quality providing seedlings for the floriculture market in Vietnam.

Keywords: BA, IBA, *in vitro* rapid propagation, peatmoss, *Philodendron hederaceum* “Lemon Lime”.

Classification number: 4.6

BA (0,0, 0,1, 0,5, 1,0 và 2,0 mg/l) hoặc TDZ (0,0, 0,05, 0,1, 0,5 và 1,0 mg/l) riêng rẽ hoặc kết hợp BA với α -NAA (0,0, 0,05, 0,1, 0,15 và 0,2 mg/l); TDZ với α -NAA (0,0, 0,01, 0,025, 0,05 và 0,1 mg/l). Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm hệ số nhân chồi (lần), chiều cao chồi (cm), số lá/chồi (lá).

Khảo sát ảnh hưởng của auxin đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro* cây Trầu bà vàng chanh: Các chồi Trầu bà vàng chanh có chiều cao 4,0-5,0 cm, 3-4 lá được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/l đường sucrose, 7,0 g/l agar và chất điều tiết sinh trưởng α -NAA hoặc IBA với 5 nồng độ khác nhau gồm: 0,0, 0,1, 0,25, 0,5 và 1,0 mg/l. Đánh giá thí nghiệm sau 5 tuần. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ chồi tạo rễ (%), số rễ/cây (rễ), chiều dài rễ (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng của cây Trầu bà vàng chanh *in vitro*: Cây giống Trầu

bà vàng chanh *in vitro* có chiều cao ≥ 5 cm, 4-5 lá được rửa sạch agar dưới vòi nước chảy, loại bỏ lá già và trồng vào khay ươm cây kích thước 5×25×40 cm (cao×rộng×dài), có 28 lỗ. Bốn công thức giá thể khác nhau gồm rêu than mùn (peatmoss); peatmoss: đất tỷ lệ 1:1; peatmoss: đất: xơ dừa tỷ lệ 1:1:1 và xơ dừa. Ngay sau khi trồng, khay trồng cây được che phủ nilon trong 5 ngày để tránh mất nước cho cây. Cây con được tưới phun sương 2 lần/ngày để giữ ẩm. Đánh giá thí nghiệm sau 4 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: tỷ lệ cây sống (%), chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới (lá).

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, 1,1 atm. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: 16h sáng/8h tối, cường độ ánh sáng 2000-2500 lux, nhiệt độ 25±2°C.

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí nhắc lại 3 lần, mỗi lần 30 mẫu với thí nghiệm nhân nhanh và tạo rễ cho chồi *in vitro*, 28 mẫu đối chứng với thí nghiệm thích nghi cây ngoài điều kiện tự nhiên.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel và Infostat.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng BA và TDZ đến khả năng nhân nhanh chồi Trầu bà vàng chanh

Tạo một số lượng lớn các cây giống khỏe mạnh, đồng nhất về mặt di truyền và mang những đặc điểm giống với cây mẹ là mục đích của nhân giống vô tính *in vitro*. Ở giai đoạn nhân nhanh, các cytokinin là nhóm chất kích thích sự phân chia tế bào và phân hóa chồi nên thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng cytokinin gồm BA và TDZ đến khả năng nhân nhanh chồi Trầu bà vàng chanh *in vitro*.

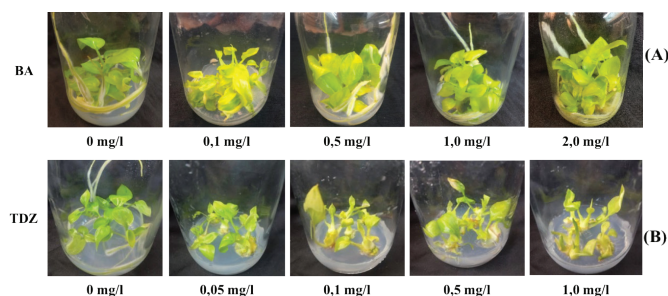
Kết quả bảng 1 cho thấy, bổ sung BA có ảnh hưởng tích cực đến hệ số nhân chồi Trầu bà vàng chanh. Cụ thể, môi trường không bổ sung BA cho hệ số nhân chồi đạt 1,45 lần sau 6 tuần nuôi cấy. Trong khi đó hệ số nhân chồi đạt 1,85-3,00 lần trên môi trường bổ sung 0,1-2,0 mg/l BA. Hệ số nhân chồi tăng tỷ lệ thuận với nồng độ BA bổ sung vào môi trường và đạt cao nhất (2,40-3,00 lần) trên môi trường chứa 1,0-2,0 mg/l BA. Bổ sung BA vào môi trường ở nồng độ 0,1-2,0 mg/l làm tăng chiều cao chồi (3,97-5,8 cm) so với môi trường đối chứng (3,32 cm). Bổ sung BA ở nồng độ thấp (0,1 mg/l) cho chiều cao chồi là tương đương với công thức đối chứng và sự khác biệt về chiều cao ở công thức bổ sung 1,0 và 2,0 mg/l BA là không có ý nghĩa thống kê. Bổ sung BA không ảnh hưởng tới số lá/chồi (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA và TDZ đến khả năng nhân nhanh chồi Trầu bà vàng chanh sau 6 tuần nuôi cấy.

Cytokinin	Nồng độ (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi trung bình (cm)	Số lá/chồi (lá)
BA	0,0	1,45 ^a	3,32 ^a	3,95 ^a
	0,1	1,85 ^{ab}	3,97 ^{ab}	4,61 ^a
	0,5	1,97 ^{ab}	4,60 ^{bc}	4,37 ^a
	1,0	2,40 ^{bc}	4,98 ^{cd}	3,90 ^a
	2,0	3,00 ^c	5,80 ^d	3,92 ^a
TDZ	0,0	1,28 ^a	3,10 ^a	4,01 ^b
	0,05	1,90 ^b	3,39 ^a	2,60 ^a
	0,1	2,03 ^b	3,13 ^a	2,19 ^a
	0,5	2,78 ^c	3,06 ^a	2,11 ^a
	1,0	2,67 ^c	3,19 ^a	2,15 ^a

Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi của một chất điều tiết sinh trưởng, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $p=0,05$).

Quan sát trong quá trình theo dõi thí nghiệm cho thấy, chồi cây Trầu bà vàng chanh trên môi trường nuôi cấy không bổ sung BA xuất hiện chồi mới sau 5-6 ngày nuôi cấy, các chồi phát triển đồng đều và khỏe (hình 1A). Trong khi đó, các chồi trên môi trường có bổ sung BA xuất hiện chồi mới muộn hơn, sau khoảng 8-10 ngày nuôi cấy, chất lượng chồi tốt, bộ lá phát triển đều và khỏe. Một số chồi Trầu bà vàng chanh trên môi trường tạo rễ sau khoảng 1 tuần nuôi cấy rễ dài và phát triển mạnh (hình 1A).



Hình 1. Chồi Trầu bà vàng chanh trên môi trường bổ sung BA (A) hoặc TDZ (B) sau 6 tuần nuôi cấy.

Tương tự với BA, bổ sung TDZ vào môi trường nuôi cấy cũng có ảnh hưởng tích cực đến hệ số nhân chồi cây Trầu bà vàng chanh. Các công thức có bổ sung TDZ cho hệ số nhân chồi đạt 1,90-2,78 lần, cao hơn so với công thức đối chứng (1,28 lần). Môi trường bổ sung 0,5 hoặc 1,0 mg/l TDZ cho hệ số nhân chồi cao nhất, đạt lần lượt 2,78 và 2,67 lần. Tuy nhiên, các chồi nuôi cấy trên môi trường chứa TDZ có số lá ít hơn mặc dù chiều cao đạt tương đương so với các chồi

trên môi trường đối chứng (bảng 1). Về mặt hình thái, so với các chồi trên môi trường đối chứng, các chồi Trầu bà vàng chanh trên môi trường bổ sung TDZ nhỏ hơn, lá có màu vàng biểu hiện của hiện tượng thiếu diệp lục, chất lượng chồi kém. Mặt khác, các chồi trên môi trường chứa TDZ hoàn toàn không tạo rễ nhưng tạo callus ở phần gốc chồi, tại vị trí tiếp xúc với môi trường (hình 1B).

Kết quả thí nghiệm cho thấy, BA cho hiệu quả nhân nhanh và chất lượng chồi Trầu bà vàng chanh cao hơn so với TDZ. Kết luận này cũng phù hợp với nghiên cứu của B.H. Han (2008) [9], khi nhóm tác giả kết luận BA cho hiệu quả nhân nhanh chồi cây Trầu bà tay phật cao hơn so với TDZ, đồng thời các chồi trên môi trường chứa TDZ có hiện tượng vàng úa và tạo callus ở gốc chồi. Tương tự, theo nghiên cứu của F.C. Chen và cs (2012) [2], các chồi Trầu bà đế vương khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung TDZ có xu hướng tạo cấu trúc giống lá (leaf-like structure) thay vì tạo chồi. Các bất thường do TDZ gây ra trong quá trình nhân chồi Trầu bà được Y.H. Dewir và cs (2018) [12] lý giải có thể là do nồng độ sử dụng quá cao hoặc thời gian tiếp xúc của mẫu cây liên tục với TDZ quá dài. Hiệu quả BA cao hơn các cytokinin khác trong nhân nhanh cây Trầu bà cũng đã được báo cáo ở nhiều nghiên cứu tiến hành bởi E.J Benczur và cs (1990) [5], S. Sreekumar và cs (2001) [13], G. Gangopadhyay và cs (2004) [6], B.H. Han và cs (2008) [9], P.T.T Hang và cs (2013) [8], A.A. Alawaadh và cs (2020) [10]. Tác động khác nhau của các cytokinin trong nuôi cấy *in vitro* có thể liên quan đến sự khác biệt về khả năng hấp thu của tế bào thực vật, tỷ lệ chất được chuyển đến các vùng phân sinh và sự chuyển hóa của chất đó [11].

Công thức bổ sung 1,0 và 2,0 mg/l BA và công thức bổ sung 0,5 và 1,0 mg/l TDZ cho hệ số nhân chồi và chất lượng chồi đạt cao nhất, do vậy sau khi cân nhắc yếu tố kinh tế, chúng tôi sử dụng nồng độ 1,0 mg/l BA và 0,5 mg/l TDZ để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng BA/TDZ và α -NAA đến khả năng nhân nhanh chồi Trầu bà vàng chanh

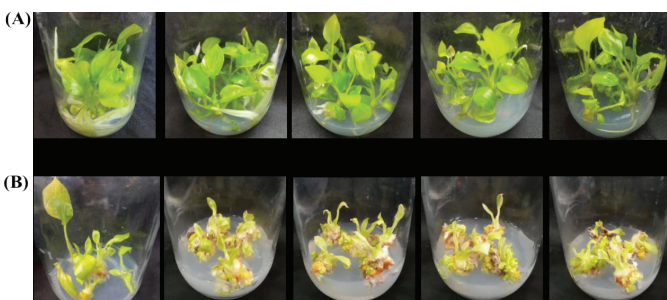
Trong nhân giống *in vitro*, bổ sung kết hợp cytokinin và auxin ở nồng độ và tỷ lệ thích hợp trong một số trường hợp không những có thể cải thiện hệ số nhân chồi mà còn nâng cao chất lượng của chồi [14]. Vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng kết hợp của BA/TDZ và α -NAA đến hiệu quả nhân nhanh chồi Trầu bà vàng, sử dụng nồng độ BA và TDZ tối ưu từ thí nghiệm trước, tương ứng 1,0 và 0,5 mg/l.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA/TDZ và α -NAA đến khả năng nhân nhanh chồi Trầu bà vàng chanh sau 6 tuần nuôi cấy.

Cytokinin (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi trung bình (cm)	Số lá/chồi (lá)
BA 1,0 mg/l	0,0	2,73 ^a	5,38 ^a	4,33 ^a
	0,05	2,73 ^a	5,0 ^a	3,65 ^a
	0,1	3,40 ^a	4,31 ^a	3,42 ^a
	0,15	2,70 ^a	4,37 ^a	3,65 ^a
	0,2	2,95 ^a	5,10 ^a	4,96 ^a
TDZ 0,5 mg/l	0,0	2,65 ^a	3,46 ^a	3,53 ^a
	0,01	4,13 ^a	2,92 ^a	3,24 ^a
	0,025	4,08 ^a	2,74 ^a	3,56 ^a
	0,05	3,73 ^a	2,20 ^a	3,38 ^a
	0,1	3,95 ^a	2,15 ^a	3,64 ^a

Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi của một tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $p=0,05$).

Bổ sung kết hợp α -NAA (0,05-0,2 mg/l) và 1,0 mg/l BA cho hệ số nhân chồi đạt 2,70-3,40 lần, chiều cao chồi dao động 4,31-5,10 cm và số lá/chồi đạt 3,65-4,96 lá. Tuy nhiên, các chỉ tiêu này có sự sai khác không có ý nghĩa thống kê so với hệ số nhân, chiều cao và số lá của các chồi trên môi trường đối chứng chỉ bổ sung 1,0 mg/l BA, tương ứng đạt lần lượt 2,73 lần, 5,38 cm và 4,33 lá/chồi (bảng 2). Quan sát trong quá trình theo dõi thí nghiệm chúng tôi nhận thấy, chồi Trầu bà vàng chanh trên môi trường đối chứng xuất hiện chồi mới và một số chồi tạo rễ sau khoảng 7-8 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, các chồi trên môi trường bổ sung kết hợp α -NAA và 1,0 mg/l BA xuất hiện chồi mới muộn hơn, sau 8-10 ngày và tạo rễ sớm hơn, sau 5-6 ngày nuôi cấy. Chất lượng chồi trên tất cả các công thức môi trường khá đồng đều, chồi phát triển tốt, chồi khoẻ mạnh, lá to, có màu xanh vàng đặc trưng (hình 2A).



Hình 2. Chồi Trầu bà vàng chanh trên môi trường bổ sung kết hợp 1,0 mg/l BA với α -NAA (A), 0,5 mg/l TDZ với α -NAA (B) sau 6 tuần nuôi cấy.

Tương tự như khi kết hợp với BA, α -NAA bổ sung kết hợp với 0,5 mg/l TDZ cho hệ số nhân chồi, chiều cao chồi và số lá/chồi có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với môi trường chỉ chứa 0,5 mg/l TDZ (bảng 2). Tuy nhiên về mặt hình thái, các chồi Trầu bà trên môi trường bổ

sung TDZ và α -NAA tạo nhiều callus, hình thành cụm chồi không phân hoá rõ và các cấu trúc giống lá sau khoảng 10-12 ngày nuôi cấy, chồi có chất lượng kém, lá nhỏ và xoắn, rất khó để tách riêng từng chồi để tiếp tục nhân nhanh. Trên môi trường đối chứng chứa 0,5 mg/l TDZ, chồi và lá mới xuất hiện sau 1 tuần nuôi cấy, chồi thấp, nhỏ nhưng vẫn có thể tách thành các chồi đơn. Mặt khác, trên môi trường chứa TDZ + α -NAA, các chồi có hiện tượng hoại tử và rụng lá sau khoảng 3 tuần nuôi cấy. Ở thí nghiệm bổ sung kết hợp TDZ và α -NAA, chồi hoàn toàn không tạo rễ trên tất cả các công thức môi trường (hình 2B).

Như vậy, kết hợp giữa BA hoặc TDZ với α -NAA là không thích hợp để nhân nhanh chồi cây Trầu bà vàng chanh. Trên thực tế, một số nghiên cứu trước đây cho thấy sự kết hợp giữa nhóm chất điều tiết sinh trưởng cytokinin và auxin không có ảnh hưởng tích cực đến hiệu quả nhân nhanh chồi cây Trầu bà. Nghiên cứu của P.T.T. Hang và cs (2013) [8] cho thấy, bổ sung kết hợp BA và IAA hoặc BA và IBA cho hệ số nhân chồi cây Trầu bà cánh phượng tương đương hoặc thấp hơn so với môi trường bổ sung BA đơn lẻ [8]. Cây Trầu bà *P. bipinnatifidum* Schott ex Endl. trên môi trường kết hợp BA/kinetin/2ip/TDZ và IBA/ α -NAA cho hệ số nhân chồi không có sự sai khác với môi trường chứa các cytokinin riêng rẽ [10]. Mặc dù vậy, theo H.M.S. Hassan và cs (2016) [15], hệ số nhân nhanh cây Trầu bà *P. selloum* trên môi trường chứa tổ hợp BA và IBA đạt cao hơn so với môi trường chỉ bổ sung BA. Như vậy có thể thấy, phản ứng với các chất điều tiết sinh trưởng trong quá trình nhân nhanh giữa các loài cây Trầu bà khác nhau là khác nhau.

3.3. Ảnh hưởng của α -NAA và IBA đến khả năng ra rễ của chồi in vitro cây Trầu bà vàng chanh

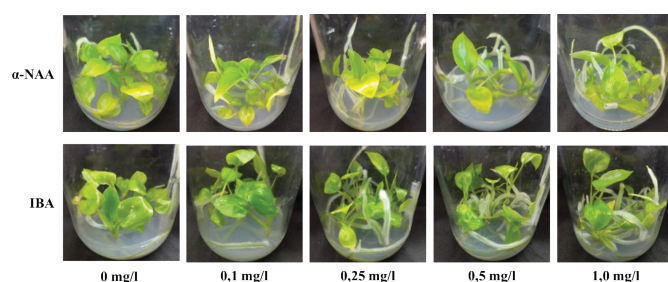
Tạo rễ cho chồi là giai đoạn cuối cùng trong quá trình nhân giống in vitro trong phòng thí nghiệm trước khi đưa cây ra thích nghi ở điều kiện tự nhiên. Các chồi Trầu bà vàng chanh sau giai đoạn nhân nhanh được chuyển sang môi trường nuôi cấy có bổ sung auxin α -NAA hoặc IBA nhằm kích thích ra rễ. Kết quả bảng 3 cho thấy, chồi Trầu bà vàng chanh có thể tạo rễ trên môi trường nền MS với tỷ lệ 63,3%, số rễ/chồi đạt 2,41 rễ và chiều dài rễ đạt 10,34 cm. Bổ sung α -NAA hoặc IBA vào môi trường nuôi cấy đã kích thích chồi tạo rễ với tỷ lệ 100%. Số rễ/chồi tăng tỷ lệ thuận với nồng độ α -NAA bổ sung vào môi trường và đạt cao nhất ở công thức chứa 0,5 và 1,0 mg/l, tương ứng đạt 3,18 và 3,78 rễ. Tương tự, trong trường hợp bổ sung IBA, số rễ/chồi tăng dần và đạt cao nhất (5,14 rễ) trên môi trường chứa 1,0 mg/l IBA. Tuy nhiên xét ở mức ý nghĩa LSD 5%, số rễ/chồi ở công thức bổ sung 1,0 mg/l IBA không có sự khác biệt so với công thức chứa 0,25 mg/l IBA (3,90 rễ) và 0,5 mg/l IBA (4,97 rễ). Sự khác biệt về chiều dài rễ của các chồi Trầu bà trên môi trường chứa α -NAA/IBA so với môi trường đối chứng là không có ý nghĩa thống kê (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của α -NAA và IBA đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro* cây Trầu bà vàng chanh sau 5 tuần nuôi cấy.

Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)		Số rễ/cây (rễ)		Chiều dài rễ (cm)	
	α -NAA	IBA	α -NAA	IBA	α -NAA	IBA
0	63,3	63,3	2,41 ^a	2,41 ^a	10,34 ^a	10,34 ^a
0,1	100	100	2,49 ^a	2,45 ^a	11,50 ^a	10,07 ^a
0,25	100	100	2,64 ^a	3,90 ^b	10,53 ^a	11,04 ^a
0,5	100	100	3,18 ^{ab}	4,97 ^b	10,97 ^a	10,85 ^a
1,0	100	100	3,78 ^b	5,14 ^b	9,33 ^a	10,93 ^a

Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $p=0,05$).

Chồi cây Trầu bà vàng chanh trên môi trường nền MS sinh trưởng phát triển tốt, lá to và dày, thân mập. Một số chồi cảm ứng tạo rễ sau 7-10 ngày nuôi cấy. Các rễ phát triển trên bề mặt và ăn sâu vào môi trường nuôi cấy (hình 3). Trong khi đó, tất cả các chồi trên môi trường bổ sung α -NAA hoặc IBA đều tạo rễ chỉ sau khoảng 5-7 ngày nuôi cấy, rễ phát triển mạnh, nhiều lông hút và có xu hướng phát triển hướng lên phía trên môi trường. So với các chồi trên môi trường đối chứng và môi trường chứa IBA, chồi Trầu bà trên môi trường chứa α -NAA có ít lá và lá nhỏ hơn, có màu vàng nhạt. Tuy nhiên nhìn chung các chồi đều phát triển tốt, khoẻ mạnh (hình 3).



Hình 3. Chồi cây Trầu bà vàng chanh tạo rễ trên môi trường bổ sung α -NAA và IBA sau 5 tuần nuôi cấy.

Như vậy so với α -NAA, IBA có hiệu quả hơn trong cảm ứng tạo rễ cho chồi Trầu bà vàng chanh khi cho số rễ trung bình cao hơn và chất lượng chồi tốt hơn. Để tối ưu giá thành sản xuất cây Trầu bà vàng chanh, chúng tôi lựa chọn sử dụng môi trường MS + 0,25 mg/l IBA cho giai đoạn toan cây *in vitro* hoàn chỉnh do đây là môi trường cho tỷ lệ cây ra rễ đạt 100%, cây sinh trưởng phát triển mạnh, đồng thời cho các chỉ tiêu số rễ/chồi và chiều dài rễ cao tương đương với môi trường bổ sung 0,5-1,0 mg/l IBA. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu nhân giống *in vitro* 3 giống cây Trầu bà để vương bao gồm ‘Imperial Green’, ‘Imperial Red’ và ‘Imperial Rainbow’ thực hiện bởi F.C. Chen và cs (2012) [2] khi nhóm tác giả xác định môi trường tạo rễ thích hợp là MS + 0,1-1,0 mg/l IBA.

3.4. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và sự phát triển của cây Trầu bà vàng chanh *in vitro*

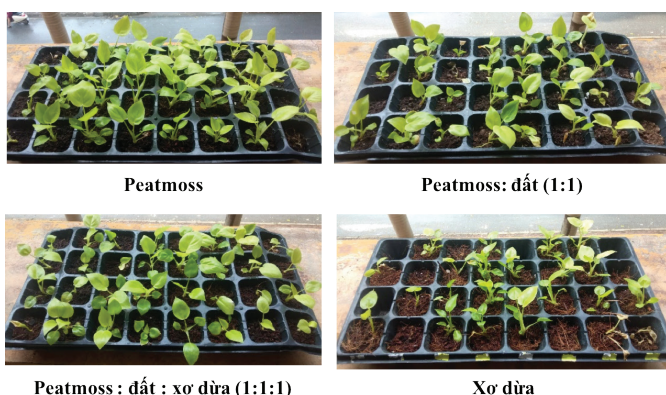
Giá thể không chỉ giúp cây đứng vững mà còn cung cấp nước và dinh dưỡng nên có ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ sống và tăng trưởng của cây. Do vậy, xác định được giá thể tiếp nhận cây thích hợp có ý nghĩa quyết định đến thành công của quy trình nhân giống *in vitro* [16]. Trong thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của một số giá thể đến tỷ lệ sống và sự phát triển của cây Trầu bà vàng chanh *in vitro*. Các công thức giá thể được lựa chọn khảo sát thỏa mãn các tiêu chí vừa đảm bảo độ thông thoáng, cho tỷ lệ cây sống cao, cây sinh trưởng tốt đồng thời có giá thành rẻ để tối ưu hiệu quả kinh tế.

Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và sự phát triển của cây Trầu bà vàng chanh sau 4 tuần.

Giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)
Peatmoss	100	2,92 ^c	2,37 ^c
Peatmoss: đất (1:1)	89,6	1,86 ^{ab}	1,40 ^{ab}
Peatmoss: đất: xơ dừa (1:1:1)	100	2,19 ^b	1,96 ^{bc}
Xơ dừa	70,4	1,44 ^a	1,30 ^a

Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $p=0,05$).

Kết quả bảng 4 cho thấy, khi sử dụng giá thể với thành phần 100% xơ dừa cho tỷ lệ cây Trầu bà vàng *in vitro* sống (70,4%) cũng như các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây là thấp nhất. Cây trồng trên giá thể xơ dừa tăng trưởng chậm, cây nhỏ, còi cọc, lá nhỏ và mỏng (hình 4). Nguyên nhân có thể là do giá thể xơ dừa không giữ nước tốt nên không phù hợp với các cây có nhu cầu nước lớn thuộc họ ráy. Sử dụng giá thể 100% peatmoss hay phối trộn peatmoss:đất theo tỷ lệ 1:1, peatmoss:đất:xơ dừa tỷ lệ 1:1:1 đã làm tăng tỷ lệ sống (89,6-100%) của cây Trầu bà vàng chanh *in vitro*, đồng thời sự gia tăng về chiều cao, số lá cũng cao hơn. Trong đó, giá thể peatmoss cho tỷ lệ cây sống (100%), chiều cao cây gia tăng (2,92 cm) và số lá mới (2,37 lá) đạt cao nhất (bảng 4). Mặt khác, các cây trồng trên giá thể này phát triển rất tốt, cây cao, thân mập, lá to và dày (hình 4). Điều này có thể giải thích là do peatmoss là giá thể giàu dinh dưỡng và khoáng chất, có khả năng thấm hút và giữ nước tốt nên thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây Trầu bà vàng chanh. So với giá thể 100% peatmoss, việc phối trộn peatmoss và đất (1:1) cho tỷ lệ cây sống (89,6%), chiều cao cây tăng thêm (1,86 cm) và số lá mới (1,4 lá) đạt được thấp hơn. Có thể do đất chiếm tỷ lệ 50% ở công thức giá thể này làm cho giá thể bị bí chặt, giảm khả năng hút nước và dinh dưỡng của cây. Ở công thức giá thể peatmoss:đất:xơ dừa (1:1:1), mặc dù chỉ tiêu chiều cao cây gia tăng (2,19 cm) thấp hơn so với công thức giá thể 100% peatmoss, nhưng tỷ lệ cây sống và số lá mới đạt tương đương, tương ứng 100% và 1,96 lá (bảng 4). Cây trồng trên giá thể này phát triển tốt và đồng đều, cây cao và bộ lá khoẻ mạnh (hình 4).



Hình 4. Cây trà bà vàng chanh *in vitro* trên các giá thể sau 4 tuần.

Đã có một số nghiên cứu khảo sát loại giá thể phù hợp để trồng cây trà bà *in vitro*. A.A. Alawaadh và cs (2020) [10] sử dụng giá thể peatmoss phối trộn với đá trân châu perlite theo tỷ lệ 1:1 để trồng cây Trà bà *P. bipinnatifidum* Schott ex Endl cho tỷ lệ cây sống đạt 100% sau 30 ngày trồng. B.H. Han và cs (2008) [9] xác định được giá thể tối ưu để trồng cây Trà bà *P. cannifolium* là đất:perlite:vermiculite tỷ lệ 1:1:1. Trong khi đó, theo nghiên cứu của P.T.T. Hang và cs (2013) [8], giá thể thích hợp nhất để tiếp nhận cây Trà bà cánh phượng là xơ dừa:trấu hun (1:1), với tỷ lệ cây sống sót ghi nhận sau 4 tuần là 100%. Ở nghiên cứu này, trong 4 loại giá thể khảo sát, giá thể gồm 100% peatmoss và peatmoss:đất:xơ dừa tỷ lệ 1:1:1 là phù hợp để trồng cây Trà bà vàng chanh *in vitro* trong điều kiện tự nhiên. Tuy nhiên, do peatmoss có giá khá cao nên chúng tôi lựa chọn giá thể peatmoss:đất:xơ dừa (1:1:1) để tiếp nhận cây Trà bà vàng chanh nhằm giảm chi phí khi đưa loại cây này vào sản xuất thương mại.

4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau về quá trình nhân giống *in vitro* cây Trà bà vàng chanh: Môi trường thích hợp để nhân nhanh *in vitro* chồi cây Trà bà vàng chanh là MS + 1,0 mg/l BA, cho hệ số nhân chồi đạt 2,73 lần, chiều cao chồi trung bình đạt 5,38 cm và số lá/chồi đạt 4,33 lá sau 6 tuần nuôi cấy. Môi trường thích hợp để tạo rễ cho chồi Trà bà vàng chanh là MS + 0,25 mg/l IBA cho tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 100%, số rễ/cây đạt 3,90 rễ, chiều dài rễ đạt 11,04 cm sau 5 tuần nuôi cấy. Giá thể tiếp nhận cây Trà bà vàng chanh *in vitro* thích hợp nhất là giá thể peatmoss:đất:xơ dừa (1:1:1), cho tỷ lệ cây sống đạt 100%, cây cao thêm 2,19 cm và gia tăng 1,96 lá sau 4 tuần, cây sinh trưởng và phát triển tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] E.P. Michael, P.A. Talcott (2013), *Small Animal Toxicology*, Elsevier, 928pp.
[2] F.C. Chen, C.Y. Wang, J.Y. Fang (2012), "Micropropagation of self-heading *Philodendron* via direct shoot regeneration", *Scientia Horticulturae*, **141**, pp.23-29, DOI: 10.1016/j.scienta.2012.04.011.

[3] T. Reffstrup, P.M. Boll (1985), "Allergenic 5-alkolyl and 5-alkenyl-resorcinols from *Philodendron* species", *Horticultural Reviews*, **24**(11), pp.2563-2565, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80668-8.

[4] M.L. Ascencio, M.A Rodríguez, D.G. Sánchez, et al. (2021), "Establishment of *in vitro* aseptic culture of *Philodendron xanadu* Croat", *Revista Ciencia Agronomica*, **52**(2), DOI: 10.5935/1806-6690.20210024.

[5] E.J. Benczúr, A.M. Riffer (1990), "*In vitro* propagation of *Philodendron tuxlanum* bunting with benzylaminopurine", *Acta Agronomica Hungarica*, **39**(3-4), pp.341-348, DOI: 10.3390/horticulturae9060688.

[6] G. Gangopadhyay, T. Bandyopadhyay, S.B. Gangopadhyay, et al. (2004), "Luffa sponge - A unique matrix for tissue culture of *Philodendron*", *Current Science*, **86**(2), pp.315-319.

[7] Y. Jirakiattikul, P. Limpraditthanont (2006), "Shoot multiplication and rooting of *Philodendron xanadu* cultured *in vitro*", *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **28**(1), pp.79-86.

[8] P.T.T. Hang, N.T. Hai, N.T.T. Linh, et al. (2013), "*In vitro* micropropagation of *Philodendron xanadu*", *Journal of Science and Development*, **11**(6), pp.826-832 (in Vietnamese).

[9] B.H. Han, B.M. Park. (2008), "*In vitro* micropropagation of *Philodendron cannifolium*", *Journal of Plant Biotechnology*, **35**, pp.203-208, DOI: 10.5010/JPB.2008.35.3.203.

[10] A.A. Alawaadh, Y.H. Dewir, M.S. Alwihibi, et al. (2020), "Micropropagation of lacy tree *Philodendron (Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl.)", *HortScience*, **55**(3), pp.294-299, DOI: 10.21273/HORTSCI14612-19.

[11] H. Sakakibara (2010), "Cytokinin biosynthesis and metabolism", *Plant Hormones*, pp.95-114.

[12] Y.H. Dewir, Nurmansyah, Y. Naidoo, et al. (2018), "Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures", *Plant Cell Reports*, **37**(11), pp.1451-1470, DOI: 10.1007/s00299-018-2326-1.

[13] S. Sreekumar, S. Mukunthakumar, S. Seeni (2001), "Morphogenetic responses of six *Philodendron* cultivars *in vitro*", *Indian Journal of Experimental Biology*, **39**(12), pp.1280-1287.

[14] N.T. Thao, N.T.P. Thao, H. Fathi, et al. (2013), "*In vitro* propagation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Journal of Science and Development*, **11**(6), pp.868-876 (in Vietnamese).

[15] H.M.S. Hassan, M.A.M. Ali, D.A. Soliman (2016), "Effect of low cost gelling agents and some growth regulators on micropropagation of *Philodendron selloum*", *Journal of Plant Production*, **7**(2), pp.169-176, DOI: 10.21608/jpp.2016.45250.

[16] L.T. Vinh, N.T. Thao, L.H. Anh, et al. (2014), "*In vitro* propagation of *Salvia miltiorrhiza* Bunge", *Journal of Science and Development*, **12**(5), pp.744-752 (in Vietnamese).

Phân lập và phân tích *in silico* các đặc điểm chức năng của một biến thể bản sao terpene synthase (*HbTPS6L-X1*) hiện diện ở vỏ thân cây cao su *Hevea brasiliensis* RRIV 209

Trần Thị Diễm Hương^{1,2}, Nguyễn Ngọc Tuyết^{1,2}, Nguyễn Thị Hồng Thương^{1,2*}

¹Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, quốc lộ 1A, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/1/2023; ngày chuyển phản biện 19/1/2023; ngày nhận phản biện 7/2/2023; ngày chấp nhận đăng 10/2/2023

Tóm tắt:

Cây cao su (*Hevea brasiliensis*) là loài cây duy nhất được trồng để sản xuất cao su tự nhiên. Phương pháp thu hoạch mủ cao su thông qua cạo vỏ có tác động gây tổn thương cơ học cho cây. Ngoài ra, cây cao su có thể dễ bị sâu bệnh tấn công qua vết thương ở vùng bị rạch cạo. Terpenoid là nhóm hợp chất thứ cấp có vai trò quan trọng trong tương tác giữa thực vật và môi trường, đặc biệt là trong phản ứng của cây với điều kiện stress. Sự đa dạng của terpenoid chủ yếu được quyết định bởi các enzyme thuộc họ terpene synthase (TPS). Kết quả phân tích dữ liệu RNA-seq của *H. brasiliensis* cho thấy có nhiều gen *TPS* hiện diện ở loài này nhưng chức năng của chúng vẫn chưa được nghiên cứu. Bài báo trình bày kết quả phân lập từ vỏ thân cây cao su *H. brasiliensis* RRIV 209 một biến thể bản sao của gen *TPS* (ký hiệu *HbTPS6L-X1*). Thông qua kết quả phân tích cây tiến hóa, sự hiện diện của các motif bảo tồn, vùng trình tự peptide tín hiệu của protein và mức độ tương đồng về cấu trúc với các sesquiterpene synthase đã được nghiên cứu, *HbTPS6L-X1* được dự đoán thuộc phân họ TPS-a, định vị trong tế bào chất và xúc tác chuyển hóa FPP thành các sesquiterpene. Những đặc điểm chức năng *in silico* này là cơ sở để thiết kế các khảo sát thực nghiệm nhằm khẳng định chức năng *in planta* của *HbTPS6L-X1*.

Từ khóa: *Hevea brasiliensis*, phân họ TPS-a, terpene synthase, terpenoid.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây cao su *H. brasiliensis* là cây công nghiệp nhiệt đới lâu năm, được trồng rộng rãi ở Đông Nam Á và là nguồn tổng hợp cao su tự nhiên chính trên thế giới [1]. Cây cao su thường xuyên bị cạo vỏ trong quá trình thu hoạch mủ và hệ quả là cây có thể phải chịu thêm nhiều tác động stress ngoại sinh khác như sự tấn công của nấm, vi khuẩn... thông qua vết cạo ở thân. Thực vật nói chung và cây cao su nói riêng có thể đáp ứng với các tác nhân stress bằng cách điều hòa sự biểu hiện các gen liên quan đến các con đường phòng vệ, bao gồm cả các gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp một số hợp chất thứ cấp.

Terpenoid là nhóm hợp chất thứ cấp đa dạng về mặt hóa học và đóng vai trò quan trọng trong các tương tác giữa thực vật với những tác động sinh học và phi sinh học của môi trường xung quanh chúng. Ở thực vật, terpenoid được hình thành từ những đơn vị 5 nguyên tử carbon, isopentenyl diphosphate (IPP) và dimethylallyl diphosphate (DMAPP), thông qua con đường 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) diễn ra ở lục thể (plastid) hoặc con đường mevalonate (MEV) diễn ra ở tế bào chất (cytosol) [2, 3]. Sự kết hợp đầu-đuôi (head-to-tail) giữa IPP và DMAPP dưới sự xúc tác của các enzyme cis-prenyltransferase hoặc trans-prenyltransferase tạo ra các hợp chất trung gian cis- hoặc trans-prenyl diphosphate có số nguyên tử carbon là bội số của 5 như neryl diphosphate và geranyl diphosphate (NPP và GPP, C10), farnesyl diphosphate (FPP, C15), nerylgeranyl diphosphate và geranylgeranyl diphosphate (NNPP và GGPP, C20)... [4]. Các prenyl diphosphate này được

chuyển hóa thành monoterpene, sesquiterpene và diterpene tương ứng bởi các enzyme thuộc họ (TPS).

TPS được phân thành hai loại chính: TPS loại I và TPS loại II, tùy theo trình tự motif bảo tồn hiện diện trong cấu trúc và cơ chế xúc tác của protein. TPS loại I chứa motif DDXXD trên miền α ở đầu C, trong khi TPS loại II chứa motif DXDD trên miền β ở đầu N của phân tử protein. Những TPS có cả 2 motif giàu aspartate này được xem là TPS có chức năng kép (bifunctional TPS) [5]. Quá trình sinh tổng hợp hemiterpene (C5), monoterpene (C10), sesquiterpene (C15) và sesterterpene (C25) thường chỉ bao gồm sự tham gia của TPS loại I với vai trò loại bỏ nhóm diphosphate để tạo ra chất trung gian mang điện tích dương (carbocation) [6]. Tương tự, một số diterpene (C20) được tổng hợp từ geranylgeranyl diphosphate (GGPP) hoặc nerylgeranyl diphosphate (NNPP) chỉ thông qua một chất trung gian dạng "carbocation" bởi các TPS loại I [7-9]. Ngược lại, một số diterpene khác được tổng hợp thông qua con đường phức tạp hơn, trong đó TPS loại II hoặc miền chứa motif DDXD của TPS chức năng kép xúc tác quá trình chuyển hóa (GGPP) thành chất trung gian prenyl diphosphate mang cấu trúc vòng đôi, sau đó TPS loại I hoặc miền chứa motif DDXXD của TPS chức năng kép loại bỏ nhóm diphosphate và hình thành chất trung gian "carbocation" [10, 11].

Phân tích cây tiến hóa dựa trên so sánh trình tự của các gen/protein TPS từ thực vật đã chia họ enzyme này thành 7 phân họ, với những TPS thuộc cùng một phân họ thường có hoạt tính xúc tác tương tự nhau: TPS-a (sesquiterpene synthase), TPS-b (hemiterpene synthase và các monoterpene synthase tổng hợp

*Tác giả liên hệ: Email: nththuong@hcmus.edu.vn

Isolation and *in silico* analysis of a transcript variant for a putative terpene synthase (*HbTPS6L-X1*) from the bark tissues of rubber *Hevea brasiliensis* RRIV 209

Thi Diem Huong Tran^{1,2}, Ngoc Tuyet Nguyen^{1,2},
Thi Hong Thuong Nguyen^{1,2*}

¹Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science,
Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

277 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

1A Highway, Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 17 January 2023; revised 7 February 2023; accepted 10 February 2023

Abstract:

Hevea brasiliensis is the only tree species grown to produce natural rubber. The method of harvesting latex by slicing a groove into the bark of the tree mimics a mechanical wounding. In addition, rubber trees could be frequently exposed to pest and pathogen attacks through the scraped bark region. Terpenoids are a group of specialised compounds that play an important role in plant-environment interactions, especially in plant response to stress factors. The diversity of terpenoids is mainly determined by enzymes of the terpene synthase (TPS) family. Screening the RNA-seq data of *H. brasiliensis* revealed the presence of many putative TPS genes expressed in the bark tissues of rubber trees; however, their function has not been studied. This paper presents the identification of a TPS gene transcript variant (designated as *HbTPS6L-X1*) from the bark tissues of *H. brasiliensis* RRIV 209. Through the analysis of the phylogenetic tree, the presence of conserved motifs, and the signal peptide sequence region of the protein, as well as structural homology to known sesquiterpene synthases from other plants, *HbTPS6L-X1* was predicted to belong to the TPS-a subfamily, be localised in the cytoplasm and catalyse the conversion of farnesyl diphosphate (FPP) to sesquiterpenes. These *in silico* functional characteristics are the basis for designing experiments to confirm the *in planta* biological function of *HbTPS6L-X1* protein.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, terpene synthase, terpenoids, TPS-a subfamily.

Classification number: 4.6

monoterpene vòng), TPS-c (copalyl diphosphate synthase và entkaurene synthase), TPS-d (các terpene synthase đặc trưng cho thực vật hạt trần), TPS-e/f (ent-kaurene synthase và các diterpene synthase khác, cùng một số monoterpene synthase và sesquiterpene synthase), TPS-g (các monoterpene synthase tổng hợp monoterpene dạng mạch hở hoặc nhánh) và TPS-h (các terpene synthase đặc trưng cho nhóm cây không hạt Selaginella) [5].

Khi nghiên cứu kỹ cấu trúc của TPS, các nhà khoa học đã xác định được một số motif quan trọng đối với hoạt động xúc tác của enzyme [7]. Trong trường hợp của các sesquiterpene synthase (STS), ngoài motif giàu aspartate DDXXD đặc trưng của TPS loại I, các STS còn có các motif bảo tồn khác tham gia vào phản ứng xúc tác như NSE/DTE và RXR [12-14]. Phần kỵ nước (chuỗi alkyl) của cơ chất FPP được hướng vào khoang tâm hoạt động. Phần ưa nước (nhóm diphosphate) của FPP được cố định giữa motif RXR và các ion kim loại hóa trị II Mg²⁺ hoặc Mn²⁺, những cofactor này được neo bởi hai motif DDXXD và NSE/DTE ở lõi vào tâm hoạt động. Gốc Asp (D) thứ nhất cùng với Asp cuối cùng của motif DDXXD liên kết với 2 nguyên tử Mg²⁺, trong khi bộ ba Asn (N) - Ser (S) - Glu (E) hoặc Asp (D) - Thr (T) - Glu (E) của motif NSE/DTE liên kết với nguyên tử Mg²⁺ còn lại. 3 nguyên tử Mg²⁺ và 2 gốc Arg (R) bảo tồn của motif RXR cố định cơ chất FPP trong tâm hoạt động của STS [15]. Motif RXR được tìm thấy ở cách motif DDXXD khoảng 35 axit amin về phía đầu N. Nó định vị trên một vòng có cấu trúc linh hoạt nhưng cấu trúc vòng này trở nên trật tự và ổn định hơn khi enzyme gắn với cơ chất [14]. 2 gốc Arg (R) trong motif RXR được cho là tham gia tạo phức với nhóm diphosphate tách ra sau bước ion hóa cơ chất FPP và hướng nó ra khỏi túi kỵ nước - nơi “carbocation” tiếp tục trải qua quá trình đóng vòng hoặc sắp xếp lại cấu trúc để tạo thành các sản phẩm sesquiterpene [14].

Hiện nay, các dữ liệu trình tự bộ gen (genome) và hệ gen biểu hiện (transcriptome) của một số dòng cao su *H. brasiliensis* đã được công bố và ngày càng được hoàn thiện, mang lại nhiều thuận lợi cho việc phát hiện và nghiên cứu chức năng các gen liên quan đến quá trình chuyển hóa các hợp chất thứ cấp, trong đó có các gen TPS. Phân tích dữ liệu trình tự bộ gen và hệ gen biểu hiện của *H. brasiliensis* RRIM 600 (<http://matsui-lab.riken.jp/rubber/search.html>) [16] cho thấy có nhiều gen TPS hiện diện ở vỏ thân cây cao su nhưng chức năng của các gen này vẫn chưa được nghiên cứu và công bố.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập từ vỏ thân cây cao su *H. brasiliensis* RRIV 209 một biến thể bản sao của gen TPS (ký hiệu *HbTPS6L-X1*). *HbTPS6L-X1* tương ứng với "hit" trình tự có mã số Hb_001271_040 trong cơ sở dữ liệu trình tự bộ gen và hệ gen biểu hiện của *H. brasiliensis*. Dựa trên trình tự *HbTPS6L-X1* đã phân lập, nhóm nghiên cứu dự đoán một số đặc điểm chức năng của protein được mã hóa bởi gen này, bao gồm vị trí định vị trong tế bào và hoạt tính xúc tác, thông qua phân tích phân họ TPS, xác định sự hiện diện của các motif bảo tồn, dự đoán vùng trình tự peptide tín hiệu của protein và mức độ tương đồng trong cấu trúc không gian của nó so với các sesquiterpene synthase đã nghiên cứu.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Cây cao su *H. brasiliensis* RRIV 209 được trồng tại Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam (huyện Bàu Bàng, tỉnh Bình Dương, Việt Nam).

2.2. Phân lập trình tự biến thể bản sao HbTPS6L-X1

Trình tự mã hóa protein HbTPS6L-X1 được phân lập bằng PCR với khuôn là cDNA chuẩn bị từ mô vô thân cây cao su *H. brasiliensis* và cặp môi cho phép nhân bản đặc hiệu cả 2 trình tự bản sao dự đoán của gen. Mỗi xuôi HbTPS6L-F và mỗi ngược HbTPS6L-R lần lượt có trình tự là: 5'-ATGGAAGTGCAACCTCATTTAC-3' và 5'-GGGAAAGACATATATACGAAACTCAT-3'. PCR được thực hiện dưới sự xúc tác của Phusion DNA Polymerase (Thermo Scientific) với chu trình nhiệt như sau: 98°C/30 giây; 38 x (98°C/10 giây, 58°C/30 giây, 72°C/90 giây); 72°C/10 phút; 4°C/∞. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di song song với thang chuẩn DNA trên gel agarose 1%, sau đó được tinh sạch từ gel bằng bộ kit EZ-10 Spin column DNA gel Extraction (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Tạo dòng HbTPS6L-X1 vào vector pJET1.2/blunt

Sản phẩm PCR đặc hiệu (*HbTPS6L-XI*) được chèn vào vector pJET1.2/blunt thông qua phản ứng nối. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 khả nạp. Sau đó, sản phẩm biến nạp được trải trên đĩa LB có chứa kháng sinh ampicillin 100 µg/ml và ủ ở 37°C trong 14-16 giờ. Các thể biến nạp mọc trên đĩa môi trường LB bổ sung ampicillin được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với mỗi HbTPS6L-R bắt cặp đặc hiệu với gen và mỗi pJET1.2-F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') bắt cặp đặc hiệu với vector. Khuẩn lạc đơn của dòng tế bào *E. coli* TOP10 cho kết quả sàng lọc dương tính được nuôi nhân sinh khối để tách chiết plasmid. Trình tự phân lập đã đồng hóa được giải mã và được so sánh với trình tự dự đoán ban đầu bằng các phần mềm tin-sinh học chuyên dụng như: ClustalW, Blast...

2.4. Phân tích trình tự của HbTPS6L-X1

2.4.1. Dự đoán phân họ của HbTPS6L-XI

Để xác định phân họ của protein HbTPS6L-X1, trình tự axit amin của HbTPS6L-X1 được so sánh với các trình tự protein TPS đại diện cho 5 phân họ TPS khác nhau của cà chua *Solanum lycopersicum* - loài thực vật duy nhất có toàn bộ hệ gen TPS đã được phân lập và khảo sát chức năng [8, 17, 18]. Cụ thể, các trình tự TPS tham chiếu được sử dụng cho phân tích phân họ bao gồm SITPS12 và SITPS31 (TPS-a), SITPS3 và SITPS27 (TPS-b), SITPS40 và SITPS41 (TPS-c), SITPS37 và SITPS39 (TPS-g), SITPS20 và SITPS24 (TPS-e/f). Cây phả hệ được thiết lập thông qua bộ công cụ phân tích ETE3 v3.1.2 (<http://www.genome.jp/tools/ete/>) [19], trong đó các trình tự được giống cột bởi phần mềm MUSCLE v3.8.31 [20] và cây phả hệ được dựng bởi phần mềm IQ-TREE 1.5.5 [21].

2.4.2. Dự đoán vùng trình tự peptide tín hiệu (transit peptide)

Vùng trình tự “transit peptide” của HbTPS6L-X1 được dự đoán bằng 2 phương pháp khác nhau. Phương pháp thứ nhất dựa trên phân tích kết quả sắp giống cột trình tự protein này với những TPS thuộc cùng phân họ và có vùng “transit peptide” đã được xác định. Phương pháp thứ hai dựa trên kết quả dự đoán trình tự peptide vận chuyển đầu N của protein bởi chương trình TargetP 2.0 [22].

2.4.3. Mô hình hóa tương đồng cấu trúc protein

Mô hình cấu trúc của HbTPS6L-X1 được dự đoán bởi AlphaFold 2 [23, 24]. Interpro được sử dụng để dự đoán các miền bảo tồn có thể có trong cấu trúc của protein [25]. Sự chồng lấp cấu trúc dự đoán của HbTPS6L-X1 với cấu trúc mẫu 5-epi-aristolochene synthase (NtEAS4) (PDB id: 5EAT) được thực hiện thông qua chương trình ChimeraX [26]. Cấu trúc mẫu (template) được chọn từ thư viện cấu trúc PDB dựa trên kết quả đánh giá bởi chương trình phân tích xoắn chuỗi (threading) LOMETS [27]. Giá trị căn bậc hai của độ lệch bình phương trung bình (Root Mean Square Deviation, RMSD) giữa cấu trúc nghiên cứu (HbTPS6L-X1) và cấu trúc mẫu (NtEAS4) được tính theo toa độ của nguyên tử C α bởi ChimeraX.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân tích in silico sự hiện diện của trình tự mã hóa terpene synthase 6 (HbTPS6L CDS) ở cây cao su *H. brasiliensis*

“Hb_001271_040” là một trong những “hit” trình tự mã hóa terpene synthase giả định được ghi nhận từ kết quả tra cứu thông tin bộ gen cao su *H. brasiliensis* RRIM 600 (<http://matsui-lab.riken.jp/rubber/search.html>) với từ khóa “terpene synthase” và “terpene cyclase”. Kết quả BLAST cơ sở dữ liệu “nucleotide collection” của NCBI với trình tự truy vấn “Hb_001271_040” cho thấy xuất hiện đầu tiên trong danh sách các “hit” có mức độ tương đồng cao với “Hb_001271_040” là 2 biến thể bản sao của gen với chú giải chức năng dự đoán là “*Hevea brasiliensis* probable terpene synthase 6” (E-value = 0). Hai biến thể này có mã số truy cập lần lượt là XM_021794026.1 (*HbTPS6L-X1_insilico*) và XM_021794027.1 (*HbTPS6L-X2_insilico*).

Để phân lập *CDS HbTPS6* dựa trên trình tự nucleotide của 2 biến thể dự đoán, mỗi xuôi HbTPS6L-F được thiết kế bắt cặp bổ sung với vùng trình tự có chứa codon mở đầu của gen *HbTPS6L* và mỗi ngược HbTPS6L-R bắt cặp bổ sung với vùng 3'UTR của gen (hình 1). Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của mỗi bằng chương trình Primer-BLAST cho thấy, cặp mỗi đã chọn bắt cặp bổ sung với cả 2 trình tự biến thể *HbTPS6L-X1_insilico* và *HbTPS6L-X2_insilico*. Sản phẩm nhân bản được dự đoán có kích thước lần lượt là 1707 (*HbTPS6L-X1_insilico*) và 1458 bp (*HbTPS6L-X2_insilico*).

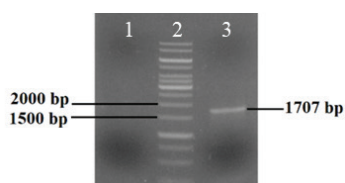
_XM_021794026.1 PREDICTED: Hevea brasiliensis probable terpene synthase 3
 (LOC1016642084), transcript variant X1, mRNA
 TTCCAAGGATCTCTTCAAGATGATACAAAGCACTAAGTGTACGTGTACTATCTCTCTTCTCTTCTCCCTG
HPB265_F
 GCGAAATAATGGAAGTGCACCTCATTTATGCCAAACACTGACCAAAACCAAAATTCGTCAATGTTCCTCT
 CTTCTGTGTGGGATGTTCTACAGCTTACTTCTTCTTCTGTGGACTGCAAGATATGATGTGGTACATA
 GACGGGTGGAAAGCTCCAAAGAAAGAGCTCAAGACAGATGTTATGGTGTCAAGATATCCGATCAAGAA
 AATTGAATGATTAACTTATTTATGCGCTTCTGGTTTTCATCATATCTTTGAGGAGGAAATGAAGAACA
 TTAATTTCATATTTTATTTGGGTTCCTCAACTCTTTGATGAAATATGATATGATCTTACACATCAGCTC
 TCTCTTTTCAAGTCTTGAGACAACGCGAATCAAATGAGCTTGTGATGTTTCCAAAGAAATTCAAAGACG
 CAATGGAGAGTTCAGAAGAGCATCTCAATCAAGATGTGAGAGAGGCTTCCAGCTTGTATGAAGAACAGTTT
 ATAGTGTGCATGGAGAGATATCTCGTAGAGCTTCTGAATTTTCAAGAGCTCACACTGGGATCAATGGT
 TGTGAGAGTGTGAGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGT
 ACCCAAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAG
 ACCCAAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAGAGTGTGAG
 GAATTTTGCAAAATTAGATTTTCAATCGAGTGCAATTTTGCAGAAAGGAGGACTCAAGTGTATGGCAAGG
 GTGGGAAGACTTAAATCTTGACAGAGAAATCTGCTCTATGCAGAGACAGACATGTGGAAATCTTTATCTTG
 GCGGTGTTCCATTCAAGTTTGAGCGCTCAACTTCCTTTTCAAGGATGTAGTGCCCAAGTTTGTAAATAG
 ATCATCTAGCTAGTGATGACACATCGATGCTATGTCTAAATGAGGAAGTCAATGGCTCTACAGATGCTA
 TCGAGAGGTGCACATTTAGTGCTCATGCAAGACTGCCAAGATTAAGATGAAGTTTCTCAAGAGGAATTA
 GAATGTTTGTGGAGAAACAGAGAATAATTTGCGAGTAGGAAGAGGAAGTCTCACTGTGCGTTATTCGTAAAA
 GAAGAATTTAAAAAGTTTGTGAGATCTTATCGGATGGAGGCGCACTGGTTTAAATGAAGGGTATGTGCCAA
 CATCATGATGATGTTAATGAATGTTTGTGAGTCAAGAGCGTATAGCTGATGTTGACAGACAGCTTTAT
 TCGAATGTGAAAGAAGTTGACGGAGTCAAGAATATTCAGTGGTCTTCAAAGTACCCCAAAATTTCTCAAAGC
 TCCAAAGTATCTGGGCGTCTTGAGAACCACTAGTATCCACCAGGCTGAGCAAGAGAGAGGACTGCT
 CTTCTACGTGTAGATGTGTACATGAAGAACAATGATTTTGTAGAGAAGAGGCTGTGGGAAGATCTTTTAA
 AATTGTGCAAAATGATGAGGAAGACATCAAGAAAGATGATGATGAGCAACCACTGCTTCCGCAAGTCTTAT
 TCTCAATTTGTGGTAACTTCTGCTCAATACAGAGGTTTTCATACAGATTTGACGACTCTCTACCCCAAC
 CATCAAGTCTGGAAGATAAAATTAACAGATGCTCTTGAGGACGCTCTCTTTGTCAGAACCAAGTTAATAT
ATAAATGATGATGAGTTTCGTATATATGCTTCTCCCTCGTGTGGCTGTGATTTGCCCTGTGCCGGAAGGCA
HPB265_R
 AGAATAAATATCTGCTGTGATGCTGATATATCTGTTATCTGTTTGTAAATAAAACAATATCGAGAGGCCA
 AACACTATGTTCTCATCTCTCTGCTCATTAATTATGAATAATAATGGTGCTATGCTTGTGAATTGTGATA
 ATGTGTGCAATTTTATGTTCTTGAATAAAAAAATAATGTAATGATGATA

Hình 1. Vị trí bắt cặp bổ sung của mỗi xuôi HbTPS6L-F và mỗi ngược HbTPS6L-R trên trình tự bản sao dự đoán *HbTPS6L-X1 insilico* và *HbTPS6L-X2 insilico*.

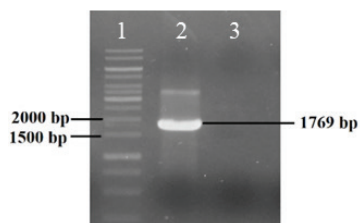
Phần được in đậm tương ứng vị trí codon mở đầu và codon kết thúc. Mũi tên chỉ vị trí bắt cặp của mỗi xuôi (HbTPS6L-F) và mỗi ngược (HbTPS6L-R). Đoạn phía trước codon mở đầu và phía sau codon kết thúc lần lượt tương ứng với vùng 5' UTR và 3'UTR. Đoạn được gạch dưới tương ứng với vùng trình tự chỉ có ở *HbTPS6L-X1_insilico* nhưng không có ở *HbTPS6L-X2_insilico*.

3.2. Kết quả phân lập trình tự mã hóa HbTPS6L (CDS HbTPS6L)

PCR nhân bản vùng trình tự mã hóa của gen *HbTPS6L* được thực hiện với khuôn là cDNA chuẩn bị từ mô vỏ của cây cao su *H. brasiliensis* và cặp mồi HbTPS6L-F và HbTPS6L-R. Kết quả điện di sản phẩm PCR (hình 2) cho thấy, ở giếng 3 xuất hiện một vạch băng có kích thước ở khoảng giữa vạch 1500 và 2000 bp so với thang chuẩn DNA 1 kb, phù hợp với kích thước dự đoán của phân đoạn *HbTPS6L-X1_insilico* (1707 bp), còn đối chứng âm không xuất hiện vạch băng tương tự (hình 2, giếng 1).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm của PCR với cặp mồi HbTPS6L-F và HbTPS6L-R. 1: đối chứng âm không bổ sung khuôn cDNA; 2: thang DNA chuẩn 1 kb; 3: sản phẩm của phản ứng PCR với khuôn cDNA từ mô vỏ thân cây cao su *H. brasiliensis*.



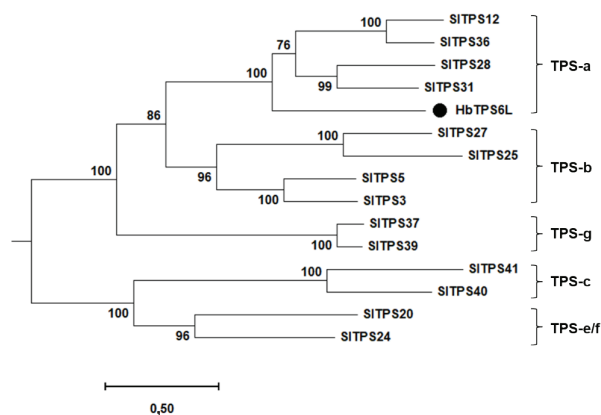
Hình 3. Kết quả sàng lọc dòng tế bào *E. coli* TOP10/pJET1.2/blunt-HbTPS6L bằng PCR khuẩn lạc. 1: thang chuẩn DNA 1kb; 2: sản phẩm PCR khuẩn lạc của dòng tế bào *E. coli* TOP10/ pJET1.2/blunt-HbTPS6L; 3: đối chứng âm.

Sản phẩm PCR đặc hiệu (dự đoán là phân đoạn *HbTPS6L-X1*) được tinh sạch và chèn vào vector pJET1.2/blunt. Kết quả sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc dòng tế bào *E. coli* TOP10 nghi ngờ mang plasmid pJET1.2/blunt-*HbTPS6L-X1* được mô tả ở hình 3. Giếng 2 xuất hiện một vạch băng tương ứng với sản phẩm nhân bản 1769 bp trong trường hợp plasmid có mang đoạn chèn *HbTPS6L-X1*. Ở giếng 3, đối chứng âm không xuất hiện vạch băng tương tự. Kết quả này cho thấy, khuẩn lạc đơn được sử dụng trong PCR có thể là của dòng tế bào *E. coli* TOP10 chứa plasmid pJET1.2/blunt-*HbTPS6L-X1*. Vì vậy, khuẩn lạc này được nuôi nhân sinh khối để tách chiết plasmid. Plasmid được gửi giải trình tự với cặp mồi pJET1.2-F và pJET1.2-R nhằm xác định trình tự của đoạn gen được chèn.

Khi BLAST cơ sở dữ liệu “nucleotide collection” của NCBI với trình tự *HbTPS6L-X1* được phân lập, chúng tôi ghi nhận trình tự có mã số truy cập P(*HbTPS6L-X1_insilico*) xuất hiện đầu tiên trong danh sách các trình tự tương đồng với trình tự truy vấn, với tỷ lệ phần trăm trình tự giống nhau là 98,63% (phụ lục 1). Trình tự *HbTPS6L-X1* phân lập từ *H. brasiliensis* RRIV 209 sai khác 23 nucleotide so với trình tự biến thể dự đoán XM_021794026.1 từ *H. brasiliensis* Reyan7-33-97. Sự sai khác này có thể đã phản ánh biến dị di truyền giữa 2 dòng cao su. Bên cạnh đó, khả năng có lỗi phát sinh liên quan đến quá trình giải và lắp ráp trình tự bộ gen cây cao su cũng không được loại trừ.

3.3. HbTPS6L-X1 thuộc phân họ TPS-a và được dự đoán định vị trong tế bào chất

Một số đặc điểm chức năng của protein TPS có thể được dự đoán thông qua phân tích trình tự của chúng. Kết quả phân tích cây tiến hóa dựa trên so sánh trình tự axit amin của protein mã hóa bởi *HbTPS6L-X1* với các trình tự TPS thuộc 5 phân họ TPS khác nhau ở thực vật hạt kín (với cả chua *Solanum lycopersicum* là đại diện có toàn bộ hệ gen TPS đã được nghiên cứu chức năng) cho thấy, HbTPS6L-X1 có mức độ bảo thủ trình tự cao nhất với các terpene synthase thuộc phân họ TPS-a: SITPS12 (39,22%), SITPS28 (42,67%), SITPS31 (43,47%) và SITPS36 (43,92%) (hình 4). Các TPS trong phân họ TPS-a thường có hoạt tính xúc tác chính là sesquiterpene synthase [5].



Hình 4. Cây tiến hóa được thiết lập dựa trên so sánh các trình tự axit amin của HbTPS6L-X1 với các trình tự TPS đại diện cho các phân họ TPS khác nhau ở thực vật hạt kín. Phân tích tiến hóa được thực hiện theo phương pháp Maximum Likelihood dựa trên 14 trình tự SITPS của cả chua *Solanum lycopersicum* và trình tự HbTPS6L-X1 được phân lập từ vỏ thân cây cao su *H. brasiliensis*. Các số ở các nhánh cây thể hiện chỉ số bootstrap được phân tích từ 1000 lần lặp lại. Mã số truy cập của các trình tự SITPS như sau: SITPS3 (G1JUH1), SITPS5 (Q1XBU5), SITPS12 (D5KXD2), SITPS20 (C1K5M3), SITPS24 (NP_001307929.1), SITPS25 (G5CV49), SITPS27 (G5CV48), SITPS28 (G5CV47), SITPS31 (G5CV46), SITPS36 (G5CV42), SITPS37 (G5CV41), SITPS39 (NP_001306121.1), SITPS40 (G5CV38), SITPS41 (XP_010324500.1).

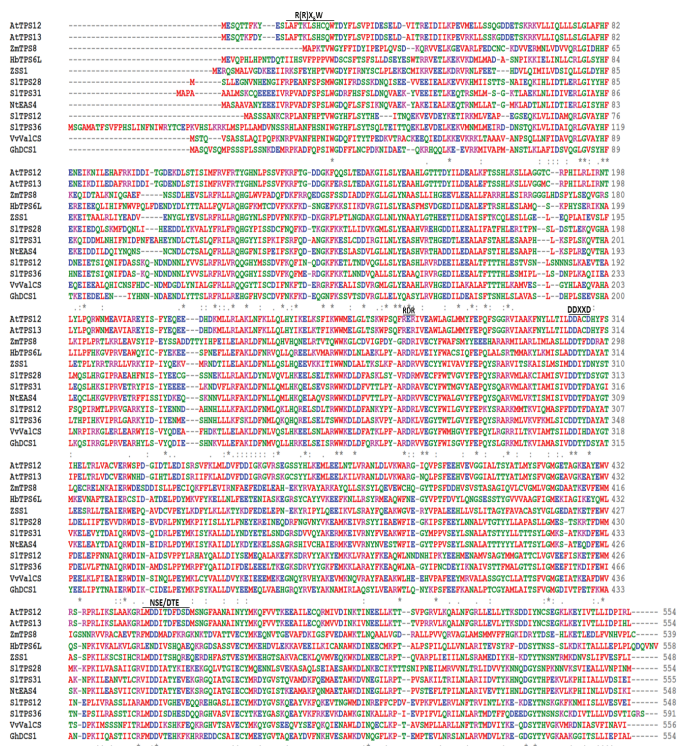
Kết quả sắp giống cột trình tự protein HbTPS6L-X1 với các trình tự TPS thuộc phân họ TPS-a ở những loài thực vật khác cho thấy, HbTPS6L-X1 có đủ 3 motif chức năng DDXXD, NSE/DTE và RXR của TPS loại I (hình 5) [5]. Các motif DDXXD và NSE/

DTE thường định vị trên 2 xoắn α đối diện nhau ở lõi vào tâm hoạt động của TPS loại I và liên kết với các đồng yếu tố (Mg^{2+} hoặc Mn^{2+}) để hỗ trợ ion hóa cơ chất prenyl diphosphate thành “carbocation” - chất trung gian mang điện tích dương trong phản ứng tổng hợp terpene [12, 13, 28]. Motif NSE/DTE thường ít được bảo tồn hơn với trình tự “consensus” là (L,V)(V,L,A)(N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE [29] và motif này hiện diện trong HbTPS6L-X1 với trình tự là LEN450DIVS454HQAEE458. Ngoài ra, motif giàu arginine RXR nằm cách motif DDXXD 33 axit amin về phía đầu N cũng có mặt trong trình tự protein HbTPS6L-X1 (hình 5). Đáng lưu ý, HbTPS6L-X1 không chứa R(R)₈W - motif tham gia trong quá trình đồng phân hóa tạo các sản phẩm terpene mạch vòng [30]. Vì vậy, HbTPS6L-X1 được dự đoán là một sesquiterpene synthase với khả năng xúc tác tạo sản phẩm sesquiterpene mạch hở.

[31], AtTPS13 [31], GhDCS1 [32], SITPS12 [17], SITPS28 [18], SITPS31 [17], VvValCS [33], ZmTPS8 [34] và ZSS1 [35]). Chương trình TargetP 2.0 [22] cũng cho ra kết quả dự đoán tương tự. Tổng hợp các kết quả phân tích trình tự, HbTPS6L-X1 được dự đoán không chứa peptide tín hiệu ở đầu N và định vị ở tế bào chất - nơi quá trình sinh tổng hợp farnesyl diphosphate (FPP) xảy ra. Dự đoán này cũng phù hợp với nhận định rằng HbTPS6L-X1, một thành viên của phân họ TPS-a, có thể hoạt động như một sesquiterpene synthase, giúp chuyển hóa FPP hiện diện trong tế bào chất thành các sesquiterpene mạch hở.

3.4. HbTPS6L-X1 có mô hình cấu trúc dự đoán tương đồng chặt chẽ với các STS đã xác định

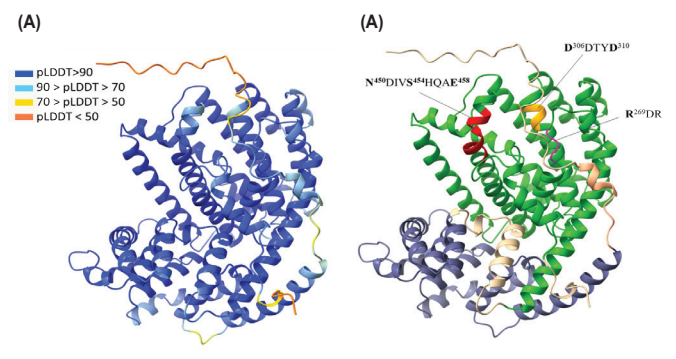
Do cấu trúc protein thường được bảo tồn hơn so với trình tự của nó, sự chồng lấp cấu trúc protein (superimposition) cho phép đánh giá mức độ tương đồng về cấu trúc và chức năng giữa protein nghiên cứu với protein có cấu trúc và chức năng đã được xác định bằng thực nghiệm. Dựa trên dữ liệu đầu vào là trình tự cấu trúc bậc một của HbTPS6L-X1 và các phân tử protein tương đồng đã được giải mã cấu trúc, phần mềm AlphaFold 2 dự đoán mô hình cấu trúc của HbTPS6L-X1 và hiển thị cấu trúc này theo độ tin cậy pLDDT cho từng axit amin trong chuỗi (hình 6). Kết quả cho thấy, ngoại trừ đoạn có cấu trúc xoắn ngẫu nhiên chứa 20 axit amin đầu tiên ở đầu N và đoạn chứa 6 axit amin cuối cùng ở đầu C có giá trị pLDDT < 50, các axit amin ở phần còn lại của cấu trúc đều có pLDDT > 70, vị trí của các axit amin đó trong cấu trúc dự đoán có độ tin cậy cao.



Hình 5. Kết quả sắp giống cột trình tự protein HbTPS6L-X1 và các trình tự TPS thuộc phân họ TPS-a.

Hầu hết các TPS thuộc phân họ TPS-a không chứa đoạn peptide tín hiệu ở đầu N và chúng thường định vị ở tế bào chất, trừ một số ít trường hợp ngoại lệ như SI TPS36 [18]. Những TPS-a không có peptide tín hiệu ở đầu N thường chỉ chứa một Met cách motif bảo tồn R(R)X₈W không quá 18 axit amin về phía đầu N, còn các TPS-a có peptide tín hiệu sẽ chứa thêm vùng trình tự bắt đầu với Met ở trước Met vừa nêu [17].

Kết quả sắp giống cột trình tự ở hình 5 cho thấy, HbTPS6L-X1 chỉ có một Met mở đầu cách chuỗi trình tự căn chỉnh (align) với motif R(R)X8W 14 axit amin về phía đầu N. Bên cạnh đó, trình tự protein HbTPS6L-X1 có chiều dài tương đương với các protein TPS-a không có vùng peptide tín hiệu ở đầu N (AtTPS12



Hình 6. Mô hình cấu trúc dự đoán bởi AlphaFold 2 của HbTPS6L-X1. (A)

Cấu trúc dự đoán của HbTPS6L-X1 được hiển thị theo độ tin cậy pLDDT cho từng axit amin trong chuỗi. Dãy màu biến thiên từ xanh đến đỏ tương ứng với độ tin cậy rất cao (pLDDT>90), cao (90>pLDDT>70), thấp (70>pLDDT>50) và rất thấp (pLDDT<50); **(B)**, Cấu trúc của HbTPS6L-X1 với các motif bảo tồn đặc trưng và các miền chức năng được dự đoán bởi Interpro: miền β đầu N (màu xanh khaki), miền α đầu C (màu xanh lá) chứa các motif DDXXD (màu vàng), NSE/DTE (màu đỏ) và RXR (màu hồng).

Kết quả phân tích sự hiện diện các miền (domain) có thể có trong cấu trúc protein bằng Interpro [25] cho thấy, HbTPS6L-X1 chứa một miền cấu trúc ở đầu N (axit amin 37-200) (Interpro: IPR001906) và một miền ở đầu C (axit amin 227-550) (Interpro: IPR034741) (hình 6). Dự đoán này phù hợp với đặc điểm chung của đa số các terpene synthase với cấu trúc bao gồm các xoắn α và được tổ chức thành 2 miền: miền α ở đầu C chứa tâm hoạt động và miền β ở đầu N.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn TS Trần Thanh - Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam đã cung cấp mẫu vỏ thân cây cao su *H. brasiliensis* RRIV 209, ThS Phạm Thị Mỹ Bình và sinh viên Võ Thị Kim Thảo - Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh đã hỗ trợ quá trình thu và bảo quản mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. Wu, L. Lan, Y. Li, et al. (2018), "The relationship between latex metabolism gene expression with rubber yield and related traits in *Hevea brasiliensis*", *BMC Genomics*, **19**(1), DOI: 10.1186/s12864-018-5242-4.
- [2] D.J. McGarvey, R. Croteau (1995), "Terpenoid metabolism", *Plant Cell*, **7**(7), pp.1015-1026, DOI: 10.1105/tpc.7.7.1015.
- [3] M.R. Concepción, A. Boronat (2002), "Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: A metabolic milestone achieved through genomics", *Plant Physiology*, **130**(3), pp.1079-1089, DOI: 10.1104/pp.007138.
- [4] J.D. Connolly, R.A. Hill (1991), *Dictionary of Terpenoids*, Cnii, DOI: 10.1007/978-1-4899-4513-6, <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4899-4513-6.pdf>, accessed 25 January 2023.
- [5] F. Chen, D. Tholl, J. Bohlmann, et al. (2011), "The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom", *Plant J.*, **66**, pp.212-229, DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04520.x.
- [6] D.W. Christianson (2017), "Structural and chemical biology of terpenoid cyclases", *Chem. Rev.*, **117**(17), pp.11570-11648, DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00287.
- [7] V. Falará, J.M. Alba, M.R. Kant, et al. (2014), "Geranylinalool synthases in solanaceae and other angiosperms constitute an ancient branch of diterpene synthases involved in the synthesis of defensive compounds", *Plant Physiol.*, **166**(1), pp.428-4411, DOI: 10.1104/pp.114.243246.
- [8] Y. Matsuba, T.T.H. Nguyen, K. Wiegert, et al. (2013), "Evolution of a complex locus for terpene biosynthesis in *Solanum*", *The Plant Cell*, **25**(6), pp.2022-2036.
- [9] Y. Matsuba, J. Zi, A.D. Jones, et al. (2015), "Biosynthesis of the diterpenoid lycosantalanol via neryleryl diphosphate in *Solanum lycopersicum*", *PLOS ONE*, **10**(3), DOI: 10.1371/journal.pone.0119302.
- [10] K. Hayashi, H. Kawaide, M. Notomi, et al. (2006), "Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*", *FEBS Lett.*, **580**, pp.6175-6181, DOI: 10.1016/j.febslet.2006.10.018.
- [11] F. Zhou, E. Pichersky (2020a), "More is better: The diversity of terpene metabolism in plants", *Curr. Opin. Plant Biol.*, **55**, pp.1-10, DOI: 10.1016/j.pbi.2020.01.005.
- [12] C.A. Lesburg (1997), "Crystal structure of pentalene synthase: Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology", *Science*, **277**(5333), pp.1820-1824, DOI: 10.1126/science.277.5333.1820.
- [13] M.J. Rynkiewicz, D.E. Cane, D.W. Christianson (2001), "Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**(24), pp.13543-13548, DOI: 10.1073/pnas.23131309.
- [14] C.M. Starks, K. Back, J. Chappell, et al. (1997), "Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-Aristolochene Synthase", *Science*, **277**, pp.1815-1820, DOI: 10.1126/science.277.5333.1815.
- [15] J. Durairaj, A.Di. Girolamo, H.J. Bouwmeester, et al. (2019), "An analysis of characterized plant sesquiterpene synthases", *Phytochemistry*, **158**, pp.157-165, DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.10.020.
- [16] N.S. Lau, Y. Makita, M. Kawashima, et al. (2016), "The rubber tree genome shows expansion of gene family associated with rubber biosynthesis", *Sci. Rep.*, **6**, DOI: 10.1038/srep28594.
- [17] V. Falará, T.A. Akhtar, T.T.H. Nguyen, et al. (2011), "The tomato terpene synthase gene family", *Plant Physiol.*, **157**(2), pp.770-789, DOI: 10.1104/pp.111.179648.
- [18] F. Zhou, E. Pichersky (2020b), "The complete functional characterisation of the terpene synthase family in tomato", *New Phytol.*, **226**(5), pp.1341-1360, DOI: 10.1111/nph.16431.
- [19] J.H. Cepas, F. Serra, P. Bork (2016), "ETE 3: Reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data", *Mol. Biol. Evol.*, **33**(6), pp.1635-1638, DOI: 10.1093/molbev/msw046.
- [20] R.C. Edgar (2004), "MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity", *BMC Bioinformatics*, **5**, DOI: 10.1186/1471-2105-5-113.
- [21] L.T. Nguyen, H.A. Schmidt, A.V. Haeseler, et al. (2015), "IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies", *Mol. Biol. Evol.*, **32**(1), pp.268-274, DOI: 10.1093/molbev/msu300.
- [22] J.J.A. Armenteros, M. Salvatore, O. Emanuelsson, et al. (2019), "Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning", *Life Sci. Alliance*, **2**(5), DOI: 10.26508/lsa.201900429.
- [23] M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, et al. (2022), "ColabFold: Making protein folding accessible to all", *Nat. Methods*, **19**(6), pp.679-682, DOI: 10.1038/s41592-022-01488-1.
- [24] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, et al. (2021), "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold", *Nature*, **596**(7873), pp.583-589, DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- [25] T.P. Lafosse, M. Blum, S. Chuguransky, et al. (2023), "InterPro in 2022", *Nucleic Acids Res.*, **51**(D1), pp.418-427, DOI: 10.1093/nar/gkac993.
- [26] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, et al. (2021), "UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers", *Protein Sci.*, **30**(1), pp.70-82, DOI: 10.1002/pro.3943.
- [27] W. Zheng, Q. Wuyun, X. Zhou, et al. (2022), "LOMETS3: Integrating deep learning and profile alignment for advanced protein template recognition and function annotation", *Nucleic Acids Res.*, **50**(W1), pp.W454-W464, DOI: 10.1093/nar/gkac248.
- [28] D.E. Cane, Q. Xue, B.C. Fitzsimons (1996), "Trichodiene synthase. probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis", *Biochemistry*, **35**(38), pp.12369-12376, DOI: 10.1016/S0959-440X(98)80088-2.
- [29] D.W. Christianson (2006), "Structural biology and chemistry of the terpenoid", *Cyclases Chem. Rev.*, **106**(8), pp.3412-3442, DOI: 10.1021/cr050286w.
- [30] D.C. Williams, D.J. McGarvey, E.J. Katahira, et al. (1998), "Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'Pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair", *Biochemistry*, **37**(35), pp.12213-12220, DOI: 10.1104/pp.120.3.879.
- [31] D.K. Ro, J. Ehrling, C.I. Keeling, et al. (2006), "Microarray expression profiling and functional characterization of AtTPS genes: Duplicated *Arabidopsis thaliana* sesquiterpene synthase genes At4g13280 and At4g13300 encode root-specific and wound-inducible (Z)- γ -bisabolene synthases", *Arch. Biochem. Biophys.*, **448**(1-2), pp.104-116, DOI: 10.1177/1934578X1000500507.
- [32] X.Y. Chen, Y. Chen, P. Heinstein, et al. (1995), "Cloning, expression, and characterization of (+)- δ -cadinene synthase: A catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis", *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**(2), pp.255-266, DOI: 10.1006/abbi.1995.0038.
- [33] J. Lucker, P. Bowen, J. Bohlmann (2004), "Vitis vinifera terpenoid cyclases: Functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries", *Phytochemistry*, **65**(19), pp.2649-2659, DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.08.017.
- [34] A. Fontana, M. Held, C.A. Fantaye, et al. (2011), "Attractiveness of constitutive and herbivore-induced sesquiterpene blends of maize to the parasitic wasp *Cotesia marginiventris* (Cresson)", *J. Chem. Ecol.*, **37**(6), pp.582-591, DOI: 10.1007/s10886-011-9967-7.
- [35] F. Yu, S. Okamoto, K. Nakasone, et al. (2008), "Molecular cloning and functional characterization of α -humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith)", *Planta*, **227**(6), pp.1291-1299, DOI: 10.1007/s00425-008-0700-x.
- [36] P.E. O'Maille, J. Chappell, J.P. Noel (2006), "Biosynthetic potential of sesquiterpene synthases: Alternative products of tobacco 5-epi-aristolochene synthase", *Arch. Biochem. Biophys.*, **448**(1-2), pp.73-82, DOI: 10.1016/j.abb.2005.10.028.
- [37] C. Chothia, A.M. Lesk (1986), "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins", *EMBO J.*, **5**(4), pp.823-826, DOI: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04288.x.

Tổng mục lục năm 2023

STT	Tác giả	Tên bài	Số	Số trang
Khoa học tự nhiên				
1	Nguyễn Văn Sinh, Nguyễn Thị Thanh Hương, Nguyễn Hùng Mạnh	Tính năng mới của phần mềm BIOKEYS: Hiển thị hình ảnh đặc điểm trong hộp thoại định loại.	1	1
2	Nguyễn Tân Thành, Nguyễn Thị Uyên Nhi, Đinh Thị Trường Giang, Trương Chiến Thắng, Bùi Xuân Hưng	Nghiên cứu quá trình trích ly siêu âm hàm lượng tổng phenolic, flavonoid và hoạt tính chống oxy hóa từ lá cây dây thìa canh (<i>Gymnema sylvestre</i>).	1	6
3	Sakkouna Phommavongsa, Nguyễn Phan Hoàng Anh, Vũ Quang Mạnh	Đặc điểm hình thái giới tính loài cá cuống <i>Lethocerus indicus</i> (Lepeletier et Serville, 1825) (Hemiptera: Belostomatidae) tại Lào.	1	12
4	Nguyễn Văn Dương, Khuất Đăng Long, Vì Thị Xuân Thùy	Tương quan giữa chiều rộng ngang đầu với tuổi ấu trùng của một ngò <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae) và một số đặc điểm hình thái các pha phát triển của chúng.	1	16
5	Ngô Đại Hùng, Trần Quốc Tuấn, Nguyễn Thị Nhật Hằng, Huỳnh Anh Tuấn, Võ Thị Kim Thư, Nguyễn Thanh Bình, Ngô Đại Nghiệp, Võ Thanh Sang	Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn <i>Lactobacillus</i> sinh gamma aminobutyric acid cao từ thực phẩm lên men truyền thống.	1	20
6	Hoàng Sỹ Tương, Đỗ Quang Trung, Lục Như Quỳnh	Xây dựng giải pháp đảm bảo tính bí mật và quyền riêng tư dựa trên Blockchain sử dụng công nghệ mật mã.	3	1
7	Cao Thị Thanh, Phan Nguyễn Đức Dược, Nguyễn Thị Huyền, Phạm Văn Trình, Nguyễn Duy Long, Cao Tuấn Anh, Nguyễn Xuân Nghĩa, Trần Đại Lâm, Phan Ngọc Minh, Elena D. Obratsova, Nguyễn Văn Chúc	Tổng hợp và đặc trưng tính chất điện, điện hóa của màng graphene pha tạp đồng clorua.	3	7
8	Phan Bích Hà, Nguyễn Khánh Thy, Nguyễn Diệu Linh, Nguyễn Thị Thiên Hằng, Trần Hoàng Phương	Tổng hợp 5-hydroxymethylfurfural từ cellulose sử dụng xúc tác silica-amorphous carbon và choline chloride:CrCl ₃ .	3	12
9	Nguyễn Ngọc Anh, Ngô Văn Quang, Quách Thị Minh Thu, Hồ Đức Cường, Nguyễn Quang Tâm, Thành Thị Thu Thủy	Tối ưu hóa điều kiện chiết fucoidan từ rong nâu <i>Tubinaria decurrens</i> bằng phương pháp chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm.	3	18
10	Nguyễn Đức Hùng, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu	Định tính thành phần hóa học và phân lập saponin từ lá loài <i>Weigela florida</i> (Bunge) A. DC.	3	23
11	Đặng Thị Hải Yến, Phạm Đình Sắc, Nguyễn Trung Minh	Nghiên cứu phân loại hang động núi lửa Tây Nguyên.	6	1
12	Hoàng Thị Thao, Lữ Thị Ngân, Đỗ Văn Trường	Bổ sung loài <i>Primulina sinovietnamica</i> W.H. Wu & Q. Zhang cho khu hệ thực vật Việt Nam.	6	7
13	Nguyễn Minh Lý, Võ Bá Duy, Mai Xuân Cường	Phân tích sự phức tạp về phân loại của các loài tảo thuộc nhánh <i>Chlorella</i> (<i>Chlorellaceae</i>).	6	10
14	Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Thanh Trà, Lê Thị Tú Anh, Bá Thị Châm, Ninh Thế Sơn, Nguyễn Thị Thủy Linh, Lê Thị Hải Yến	Hoạt tính sinh học của các flavonoid phân lập từ cặn chiết ethyl acetate của lá cây Xén mù <i>Garcinia mackeaniana</i> .	6	15
15	Trần Văn Tuấn, Đỗ Thị Bình Xuân Lộc, Bùi Thị Khánh Linh, Đinh Thị Mùi, Lê Hồng Diệp, Mai Thị Đàm Linh, Trần Thị Thanh Huyền, Phạm Đức Ngọc	Đánh giá hiệu quả của RNA silencing ở nấm sợi <i>Aspergillus niger</i> sử dụng vector nhĩ thể tích hợp công nghệ tái tổ hợp Gateway.	6	20
16	Trần Văn Tiến, Nguyễn Hùng Mạnh, Lại Thị Thu Hằng	Một số đặc điểm sinh thái và cấu trúc thảm thực vật tại khu vực phân bố của loài Kim ngân lá to (<i>Lonicera hildebrandiana</i>) thuộc dãy Hoàng Liên Sơn.	6	26
17	Trần Ngọc Vượng, Phạm Minh Tuấn, Vũ Duy Hùng, Nguyễn Đình Đăng, Nguyễn Tiến Tùng, Trần Đại An	Tách loại clorua trong kẽm oxit có hàm lượng clorua cao thu hồi từ bụi lò hồ quang điện luyện thép.	8	1
18	Nguyễn Mạnh Tuấn, Hoàng Văn Hưng, Đỗ Thị Hiền, Đỗ Bích Duệ, Phạm Thị Phương Lan	Xác định hàm lượng polysaccharide, phenolic và hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết hệ sợi chùng nấm Thượng Hoàng <i>Tropicoporus linteus</i> NTH-PL3.	8	5
19	Vì Thị Xuân Thủy, Vũ Thị Nụ, Phạm Thanh Tùng	Nhận dạng đặc điểm hình thái và trình tự vùng <i>ITS</i> và <i>rbcL</i> của giống khoai sọ bản địa Cụ cang.	8	11
20	Nguyễn Hữu Tuyển, Lâm Hoàng Anh Thư, Ngô Hồng Loan, Phan Thị Kim Ngân, Hoàng Thùy Dương, Phạm Tiên Dung, Nguyễn Đông Thức, Nguyễn Kim Thanh Kiều, Phạm Thanh Hồng, Ngô Võ Kế Thành	Đánh giá khả năng kháng khuẩn của vật liệu cellulose sinh học hấp phụ nano berberin.	8	15
21	Đỗ Thị Kim Trang, Đào Ngọc Ánh, Trần Bảo Trâm, Trương Thị Chiên, Nguyễn Minh Nam, Trần Văn Tuấn, Vũ Xuân Tạo	Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng nấm được liệu <i>Cordyceps militaris</i> bạch tạng (albino) phân lập tại Việt Nam.	10ĐB	1
22	Mã Thị Bích Thảo, Nguyễn Phương, Trần Hà, Nguyễn Thị Thùy Trang, Nguyễn Thị Hồng, Hoàng Văn Tuấn	Định danh sả hương Tây Giang <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt dựa trên phân tích phân tử và thành phần tinh dầu sả.	10ĐB	7
23	Trương Thị Chiên, Nguyễn Thị Thanh Mai, Trần Bảo Trâm, Mai Vũ Hoàng Giang, Vũ Xuân Tạo	Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn <i>Bacillus</i> có khả năng phân giải lân khó tan trong lên men chất thải chăn nuôi gà làm phân bón hữu cơ vi sinh dạng lỏng.	10ĐB	14
24	Nguyễn Văn Diệp, Nguyễn Xuân Tú, Phạm Văn Dương, Nguyễn Thị Khánh Vân, Nguyễn Văn Minh, Vũ Văn Thủ, Phạm Hồng Minh	Phát triển bộ khuếch đại laser từ ngoại, băng hẹp điều chỉnh bước sóng sử dụng tinh thể Ce:LiCAF định hướng nghiên cứu môi trường.	11	1
25	Nguyễn Đức Long, Nguyễn Văn Hùng, Trần Hữu Thành, Đoàn Văn Diệp, Hoàng Văn Hùng	Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến tốc độ cháy cao của vật liệu mang năng lượng trên nền cao su butadiene acrylonitrile có nhóm cacboxyl cuối mạch.	11	6
26	Nguyễn Quốc Trung, Nguyễn Khánh Hưng, Ngô Trọng Nghĩa, Nguyễn Tấn Phát	Nghiên cứu <i>in silico</i> và <i>in vitro</i> về tác động lên quá trình chết theo chương trình của Markacanasin A trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 thông qua cơ chế kích hoạt caspase-3.	11	11
27	Nguyễn Thành Công, Nguyễn Huy Vượng, Vũ Đình Hùng, Phan Việt Dũng, Phạm Tuấn, Vũ Bá Thao, Trần Thị Lưu	Ảnh hưởng của bốc hơi nước ngầm đến nguồn bổ cấp tự nhiên cho các thấu kính nước nhạt thuộc dải cồn cát ven biển khu vực Nam Trung Bộ.	11	16
28	Lê Tiến Dũng, Trần Văn Đức, Nguyễn Hữu Trọng, Nguyễn Khắc Giảng, Tô Xuân Bản, Nguyễn Thị Ly Ly	Đặc điểm của các nodule sắt-mangan chứa niken, coban trong sa khoáng cromit khu vực Cổ Định, Thanh Hóa.	11	23
29	Nguyễn Tuấn Thành, Ninh Thị Hạnh, Phạm Văn Quân, Nguyễn Hùng Thanh, Vũ Khánh Vân, Nguyễn Thành Trung	Đánh giá khả năng kháng chất tẩy rửa của vi khuẩn <i>Salmonella enterica</i> phân lập từ thịt gà tại Hà Nội.	11	32
30	Lê Ngọc Diệp, Nguyễn Thị Kim Oanh, Lê Hồ Phương Thảo, Nguyễn Duy Linh, Đặng Mậu Chiến, Đoàn Đức Chánh Tín	Graphene tách nhiệt biến tính với polyvinyl alcohol ứng dụng làm sơn nước dẫn điện trên cơ polyurethane.	11	37
Khoa học kỹ thuật và công nghệ				
31	Nguyễn Huy Vượng, Trần Văn Quang, Bùi Lê Khánh, Vũ Quốc Công, Phạm Tuấn	Nghiên cứu giải pháp hồi phục và tăng cường trữ lượng nước cho các mạch lộ trên địa bàn tỉnh Điện Biên.	1	26
32	Cô Như Vãn, Lê Hùng Lân, Trần Ngọc Tú, Lê Hoàng Nam	Nghiên cứu đề xuất giải pháp IoT linh hoạt với mạng truyền thông vô tuyến và cảm biến đo lường, điều khiển.	1	32
33	Nguyễn Văn Sỹ, Đặng Quang Thiệu, Nguyễn Thanh Hùng	Thiết kế chế tạo đầu đo nhấp nháy sử dụng tinh thể CsI(Tl) ghép nối với màng nhân quang silicon.	1	38
34	Nguyễn Vũ Việt Linh	Ảnh hưởng của quá trình xử lý hóa học với các tác nhân khác nhau lên hình thái và tính chất sợi chuối.	1	44
35	Trần Hữu Thành, Nguyễn Văn Hùng, Nguyễn Đức Long, Đoàn Văn Diệp	Nghiên cứu, thử nghiệm đánh giá vật liệu chống cháy dùng cho nhiên liệu rắn hỗn hợp hoạt động tin cậy trong khoảng nhiệt độ -50-50°C.	1	49
36	Nguyễn Thanh Bình	Nghiên cứu chức năng hóa bề mặt trong suốt có khả năng chống băng tuyết: Một cách tiếp cận mới.	1	55
37	Trần Thị Ngọc Mai, Huỳnh Phương Quyên, Nguyễn Thái Ngọc Uyên	Nghiên cứu sự ảnh hưởng của chế độ sấy và hàm lượng bột từ hạt đậu đen (<i>Vigna cylindrica</i>) nảy mầm để sản xuất bánh quy giàu GABA.	1	61
38	Lê Thị Hồng Ánh, Hoàng Thái Hà, Nguyễn Thị Thảo Minh, Võ Văn Phẳng, Đặng Xuân Cường	Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy, vận tốc gió và nồng độ sorbitol lên khả năng tái hydrat hoá của tôm <i>Metapenaeus ensis</i> sấy bằng bơm nhiệt kết hợp bức xạ hồng ngoại.	1	67
39	Nguyễn Ngọc Tú, Nguyễn Văn Thương, Trần Xuân Thịnh	Tối ưu cập nhật bản đồ cục bộ trong môi trường động sử dụng phương pháp nhận dạng vật thể.	3	30
40	Nguyễn Văn Hùng, Trần Hữu Thành, Phạm Văn Khương, Đoàn Văn Diệp, Nguyễn Đức Long	Nghiên cứu chế tạo vỏ chống cháy ở điều kiện nhiệt độ thấp cho thời nhiên liệu ballistit dùng cho động cơ hành trình.	3	34
41	Nguyễn Lê Thanh, Nguyễn Quốc Quân, Nguyễn Hà Hiệp	Nghiên cứu đặc tính vận hành động cơ tua bin phân lực một trục có buồng đốt tăng lực AL-21F.	3	39
42	Nguyễn Phú Bảo, Phạm Hồng Nhật, Đinh Quốc Túc	Tương quan giữa kháng sinh Ciprofloxacin, Ofloxacin và các thông số chất lượng nước sông Sài Gòn.	3	46
43	Hoàng Minh Tuyển, Lương Hữu Dũng, Trần Thanh Xuân	Khung đánh giá an ninh nguồn nước Việt Nam.	3	53

44	Phạm Thị Mỹ Phương, Tô Thị Mai Dung, Đoàn Văn Tú, Nguyễn Ngọc Quý	Ảnh hưởng của hàm lượng chì (Pb) trong đất đến sinh trưởng và khả năng hấp thu Pb của cây cỏ Vetiver (<i>Vetiveria zizanioides</i> L.).	3	60
45	Nguyễn Đình Hiền	Nghiên cứu ứng dụng và ước tính chi phí xây dựng hệ thống phao quan trắc biển xa bờ.	3	64
46	Nguyễn Thị Hạnh, Tống Xuân Hoa, Nguyễn Văn Hưng, Hoàng Giang	Nghiên cứu sự biến đổi một số chỉ tiêu hoá lý và hoá sinh của tảo trong quá trình lên men tảo đen.	3	68
47	Văng Hoài Ân, Trần Quốc Viễn, Lê Phúc Như, Huỳnh Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Vũ Việt Linh	Chế tạo khẩu trang phân hủy sinh học từ sợi lá chuối bằng phương pháp ép nhiệt.	6	31
48	Phan Quý Trà, Nguyễn Thành Đông, Phạm Tuấn Linh, Đặng Thị Lan Hương, Nguyễn Viết Hoàng, Nguyễn Thị Thu Trang	Nghiên cứu sự phân hủy norfloxacin bởi quá trình oxy hóa tiên tiến sử dụng UV/TiO ₂ /H ₂ O ₂ trong thiết bị phản ứng loại ống.	6	37
49	Nguyễn Tuấn Tùng, Nguyễn Trung Hiếu	Ứng dụng hệ thống phân tích hình ảnh Vision Pro® trong phân loại thành phần bạch cầu máu ngoại vi trên bệnh nhân lơ-xê-mi cấp.	6	42
50	Nguyễn Cường Quốc, Lê Đăng Quang, Nguyễn Duy Tuấn, Nguyễn Trọng Tuấn, Bùi Thị Bửu Huệ, Trần Thanh Mến, Trần Quang Đệ	Nghiên cứu docking phân tử đa mục tiêu tương tác với các thụ thể ERα, PR, EGFR và CK2 của một số hợp chất <i>N</i> -hydroxycinnamide.	6	47
51	Trần Sỹ Hải, Nguyễn Minh Hưng, Nguyễn Văn Ga, Nguyễn Đức Trung, Nguyễn Bá Trung	Nghiên cứu sức chịu tải của một số sông nội tỉnh Bắc Ninh.	6	52
52	Vũ Bá Thao, Nguyễn Thị Thu Hương	Phân tích đặc trưng lưu vực phát sinh lũ bùn đá - lũ quét và cơ chế tác động của lũ ở lưu vực suối Nậm Păm.	6	58
53	Phạm Thị Lan Hương, Nguyễn Văn Quang	Nghiên cứu chế tạo vật liệu nano tổ hợp cấu trúc lõi vỏ Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ nhằm ứng dụng xử lý nhanh chất màu methylen xanh trong nước.	6	67
54	Phạm Minh Nhân, Nguyễn Chí Thiện, Lê Thanh Cao, Đinh Duy Vũ, Lê Bá Tùng, Hồ Đức Duy	Chẩn đoán vùng nứt trong đầm bê tông cốt thép dưới tác dụng của tải trọng sử dụng phương pháp năng lượng biến dạng kết hợp với mô hình ma trận nhám lẫn.	8	20
55	Phan Thị Cảnh, Nguyễn Tuấn Anh, Thái Quang Tùng, Hà Hoài Nam	Nghiên cứu chế tạo bộ quét chùm tia cho thiết bị laser điều trị thâm mỹ vi điểm.	8	29
56	Phạm Hải Sơn, Lê Hoàng Sơn, Hoàng Thế Anh	Đề xuất công nghệ và mô hình quản lý điện toán đám mây di động phục vụ chương trình chuyển đổi số của Chính phủ Việt Nam.	8	35
57	Cao Đình Hưng, Lê Trần Chung, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Phạm Tuấn Nam	Tính toán sơ bộ thủy nhiệt lò phản ứng mô đun nhỏ dựa trên công nghệ lò phản ứng ACPRS0S.	8	40
58	Trương Thị Bình Giang, Dương Tuấn Hưng, Vũ Đức Lợi, Hoàng Thị Hương Thảo	Xác định các sản phẩm của phản ứng khử điện hóa nitrat trên xúc tác Cu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis và sắc ký khí online.	8	45
59	Vũ Minh Đức, Nguyễn Thanh Liêm, Đặng Thị Kim Chi, Nguyễn Châu Giang	Nghiên cứu đánh giá khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn của màng nhựa trên cơ sở tinh bột sắn và nhựa poly(butylene adipate-co-terephthalate) theo phương pháp định lượng CO ₂ sinh ra.	8	50
60	Trần Thanh Hằng, Trần Như Chí, Lê Văn Chiêu, Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Thị Thanh Vân	Nghiên cứu phát triển bộ điều khiển hợp lập cho hệ thống tạo vi giọt chất lỏng theo yêu cầu (droplet-on-demand).	8	56
61	Vũ Thị Minh Châu, Nguyễn Trọng Hiệp, Mai Quang Tuyền, Nguyễn Đức Thịnh, Lê Thu Thủy, Lê Minh Tuấn	Đánh giá hiệu suất xử lý nước thải lang nghệ bánh trắng bằng công nghệ bùn hoạt tính bổ sung chế phẩm sinh học.	8	61
62	Trịnh Thị Thủy, Trịnh Thị Thắm, Đỗ Văn Diệp, Nguyễn Quang Huy, Phạm Bá Việt Anh	Tối ưu hóa quy trình phân tích polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) trong chất thải nhựa từ sản phẩm gia dụng.	8	67
63	Lê Quốc Tuấn, Nguyễn Văn Đưa, Nguyễn Quốc Hưng, Nguyễn Hoàng Long, Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Huế	Nghiên cứu, thử nghiệm công nghệ sóng âm bề mặt không dây thụ động để giám sát nhiệt độ trong các thiết bị dẫn điện cao áp.	10DB	19
64	Trần Văn Hiệp, Vũ Minh Thoại, Nguyễn Huy Khấn, Vũ Xuân Mạnh, Nguyễn Huy Công, Nguyễn Đăng Cơ, Bùi Đình Tú, Nguyễn Hải Bình	Nguồn phát cho máy hàn siêu âm sử dụng màng rung gốm áp điện ứng dụng hàn trên chất liệu vải không dệt.	10DB	24
65	Nguyễn Văn Thương, Trần Xuân Thịnh, Giang Mạnh Khôi	Các phương pháp nâng cao an toàn cho robot cộng tác người - máy.	10DB	30
66	Lê Thị Huyền, Trương Minh Ngọc, Hồ Viết Thế, Nguyễn Bá Thọ, Nguyễn Thị Liên	Tối ưu một số yếu tố ảnh hưởng đến quy trình thu nhận hợp chất tannin có hoạt tính kháng vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> từ lá cây bàng (<i>Terminalia catappa</i> L.).	10DB	35
67	Nguyễn Đào Thanh Hương, Hồ Thị Nguyệt, Trương Minh Ngọc, Lê Thanh Bình, Đỗ Thị Mai Trinh, Bùi Dương Xuân An	Tối ưu hóa điều kiện tách chiết saponin steroid từ lá cây <i>Costus pictus</i> bằng phương pháp đáp ứng bề mặt và khảo sát kháng khuẩn của cao chiết thu được trong điều kiện tối ưu hóa.	10DB	42
68	Nguyễn Bá Thọ, Trương Minh Ngọc, Lê Thị Huyền, Nguyễn Thị Liên	Tối ưu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết hợp chất polyphenol từ hạt cau (<i>Areca catechu</i> L.) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.	10DB	48
69	Nguyễn Thị Thanh Lan, Phạm Hồng Tuấn, Nguyễn Thành Hợp	Lắng đọng lớp phủ vàng trên bề mặt màng PET bằng phương pháp phun xạ magnetron.	10DB	54
70	Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Thành Hợp, Nguyễn Duy Dân	Khảo sát ảnh hưởng của công nghệ tối laser tới độ cứng và cấu trúc tế vi của thép P18.	10DB	58
71	Trần Thị Văn Anh, Đỗ Xuân Tiến, Cung Hồng Kiên, Đinh Văn Giang, Trương Đức Toàn, Trần Xuân Thịnh	Nghiên cứu và tích hợp hệ thiết bị khác trên vật liệu nhựa sử dụng laser UV bước sóng 355 nm.	10DB	62
72	Tường Thị Nguyệt Ánh, Lê Thị Thủy, Đoàn Hoàng Linh, Nguyễn Tiến Đạt, Nguyễn Ngọc Diệp, Chu Xuân Quang, Trần Hùng Thuận, Đặng Thảo Yến Linh	Đánh giá khả năng phân rã của bao bì thân thiện môi trường trong điều kiện ủ compost ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô pilot.	10DB	67
73	Đỗ Khắc Uẩn, Nguyễn Mạnh Cường, Nguyễn Văn Tuyền, Trần Hùng Thuận, Chu Xuân Quang	Nghiên cứu đề xuất giải pháp giảm mức tiếng ồn khi vận hành máy nén khí trong hệ thống xử lý nước thải.	10DB	73
74	Trần Hà, Mã Thị Bích Thảo, Nguyễn Phương, Nguyễn Thị Hồng, Vũ Văn Liệu	Tối ưu nhiệt độ sấy qua hồi bằng kỹ thuật sấy nhiệt độ thấp kết hợp vi sóng.	10DB	77
75	Phạm Văn Khôi, Vũ Văn Nghi	Mô hình số một chiều mô phỏng sạt lở đất trên mái dốc lớn: Lý thuyết và kiểm chuẩn với mô hình giải tích.	11	42
76	Trần Văn Khôi	Ước lượng dòng điện phụ tải trạm điện kéo đường sắt đô thị.	11	47
77	Bùi Thị Hằng, Đoàn Hà Thắng	Chế tạo và tính chất vật liệu composit Fe ₃ O ₄ /C.	11	52
78	Lê Phương Giang, Trịnh Hữu Hải	Đánh giá vòng đời hệ thống quản lý chất thải rắn sinh hoạt tại TP Hồ Chí Minh.	11	57
79	Đặng Thị Bích Hợp, Nguyễn Văn Cường, Hoàng Quốc Thuận, Lê Tiến Hà, Nguyễn Văn Quang, Nguyễn Văn Cường, Phạm Thị Lan Hương	Ảnh hưởng của nồng độ Ce ³⁺ lên cấu trúc và tính chất quang của vật liệu nano ZnO chế tạo bằng phương pháp sol-gel.	11	63
80	Vũ Ngọc Tuấn, Nguyễn Trung Kiên, Lê Đình Sơn, Trần Văn An, Phùng Tuấn Anh, Nguyễn Thanh Dương	Mô hình tính toán chi phí vòng đời sản phẩm cho xe vận tải Kamaz.	11	69
Khoa học y - dược				
81	Lê Văn Khánh, Trần Thu Huyền, Hoàng Văn Tổng	Bước đầu xây dựng quy trình tetra-primer ARMS PCR phát hiện điểm đa hình đơn nucleotide <i>exo-E415G</i> của ký sinh trùng sốt rét <i>Plasmodium falciparum</i> ở khu vực Tây Nguyên, Việt Nam.	2	1
82	Hoàng Xuân Quảng, Bùi Tiến Dũng, Đặng Tiến Trường	Ảnh hưởng của bất hoạt bằng nhiệt đối với giá trị CT trong kỹ thuật xác định SARS-CoV-2 bằng phương pháp realtime RT-PCR.	2	6
83	Bùi Anh Sơn, Dương Đình Chính, Lê Thị Hồng Hạnh, Đỗ Ngọc Ánh	Xác định tần suất mang gen <i>erm</i> (B) và <i>mef</i> (A) ở các chủng <i>Streptococcus pneumoniae</i> kháng macrolide thu thập từ trẻ dưới 5 tuổi bị viêm phổi tại Nghệ An (2019-2021).	2	9
84	Nguyễn Thị Phương Anh	Hội chứng bong vảy da do tụ cầu: Báo cáo chùm ca lâm sàng tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng.	2	14
85	Võ Thị Cẩm Vân, Đào Quốc Mạnh, Võ Hoàng Minh, Trần Hoàng Phúc, Huỳnh Nguyễn Hoài Phương	Tổng hợp các dẫn chất 4,6-dihydroxyauron bằng phương pháp vi sóng.	2	18
86	Đặng Văn Hùng, Phan Thị Thu, Lương Thị Hoan, Trần Văn Thắng, Trịnh Văn Vương, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Quỳnh Nga, Nguyễn Thị Hà Ly, Tô Minh Tứ	Nghiên cứu đặc điểm nông sinh học và hàm lượng aurantio-obtusin trong hạt một số mẫu giống Thảo quyết minh (<i>Senna tora</i> L.) trồng tại Hà Nội.	2	23
87	Lê Xuân Trường, Trần Văn Thành, Hoàng Kim Nghi	Điều chế hydrogel chứa chitosan và dầu dừa bằng phương pháp đông lạnh - rã đông.	2	28
88	Nguyễn Thị Việt Hà, Nguyễn Văn Phong, Trần Văn Khoa, Triệu Tiến Sang	Phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến <i>PKD1</i> gây bệnh thận đa nang.	5	1
89	Hà Huy Khôi, Hà Văn Thiệu, Trần Thanh Trí	Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị áp xe gan ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi đông 2.	5	6
90	Nguyễn Tuấn Tùng, Phạm Quang Thịnh	Đặc điểm kháng thể bất thường ở bệnh nhân thiếu máu tan máu tự miễn tại Bệnh viện Bạch Mai.	5	10
91	Nguyễn Đức Phúc, Nguyễn Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Thơm, Phạm Thị Thu Hà	Thực trạng của người bệnh nuôi ăn qua sonde tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An.	5	15
92	Lê Thị Hương Lan, Trần Ngọc Tuấn	Kết quả ghép thận và xử trí các biến chứng sớm sau ghép thận từ người cho sống tại Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên.	5	20
93	Nguyễn Đức Thiện, Nguyễn Ngọc Ánh	Nghiên cứu định lượng hỗn hợp 3 thành phần paracetamol, ibuprofen và caffeine trong chế phẩm viên nang bằng quang phổ tia ngoại tử đối.	5	25

94	Trần Thị Lệ Quyên, Bùi Nguyễn Hải Linh, Nguyễn Việt Hà, Nguyễn Hữu Tuấn Dũng, Bùi Thị Việt Hà, Trịnh Thành Trung	Đánh giá hoạt tính kháng <i>Burkholderia pseudomallei</i> VTCC 70157 và độc tính tế bào của dịch sắc cây lựu (<i>Punica granatum</i>).	5	31
95	Võ Thị Ngọc Hào, Chu Văn Sơn, Nguyễn Đoàn Thủy, Nguyễn Văn Liệu, Nguyễn Thị Văn Anh	Đánh giá hiệu quả của xét nghiệm sàng lọc alen <i>HLA-A*31:01</i> và <i>HLA-B*15:02</i> bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR trong giảm nguy cơ dị ứng thuốc Carbamazepine.	5	36
96	Triệu Tiến Sang, Trần Văn Khoa, Nguyễn Văn Phong, Lê Trọng Tuấn, Lê Văn Hải	Phát hiện đột biến mới trên gen <i>OCA2</i> và chẩn đoán di truyền tiền lâm tở bệnh bạch tạng tuýp 2 (oculocutaneous albinism 2 - OCA2).	7	1
97	Phạm Thu Trang, Phạm Thị Thanh Hiền, Đỗ Tuấn Đạt, Dương Thị Trà Giang	Tỷ lệ mang liên cầu nhóm B và kết quả thai kỳ ở sản phụ sinh tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.	7	8
98	Quế Anh Trâm	Nghiên cứu sự kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gram âm gây nhiễm khuẩn đường tiết niệu phân lập tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An.	7	12
99	Lê Hoàng Vĩnh, Trần Việt Luân, Đỗ Quang Hùng	Đặc điểm các biến dạng ở mũi trên bệnh nhân khe hở môi một bên, ứng dụng trong phẫu thuật tạo hình mũi tại Bệnh viện Chợ Rẫy.	7	17
100	Huỳnh Quang Khánh, Nguyễn Thành Phát	Đánh giá kết quả sớm điều trị nang tuyến vú bằng vi sóng tại Bệnh viện Chợ Rẫy.	7	21
101	Đinh Xuân Thu, Nguyễn Thị Tuyết, Nguyễn Điện Biên	Đánh giá ban đầu một số kết quả sau phục hình cầu - chụp - pivot cổ định tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 4/2020 đến tháng 10/2021.	7	26
102	Phạm Thị Diệu Như, Đỗ Quang Dương, Nguyễn Đức Hạnh	Nghiên cứu bào chế viên ngậm chứa cao Đàng sâm (<i>Codonopsis javanica</i> (Blume) Hook. f. & Thomson).	7	30
103	Hồ Hoàng Nhân, Hoàng Thị Ngọc Duyên	Nghiên cứu bào chế hydrogel chứa vi nhũ tương ibuprofen dùng trên da.	7	36
104	Lê Hoàng Bích Nga, Trần Thị Thuý Quỳnh, Lê Lâm Kiều Oanh, Nguyễn Thị Ngọc Lan	Áp dụng hướng dẫn EP15A3 của CLSI trong xác nhận phương pháp định lượng glucose máu bằng máy Accu-chek Inform II.	7	43
105	Trần Thị Mai Anh, Ngô Thị Thảo, Đinh Thùy Linh, Trần Văn Khánh	Phát hiện đột biến gen <i>G6PD</i> ở bệnh nhân thuộc dân tộc Nùng thiếu hụt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase.	9	1
106	Nguyễn Thị Tuyết Mai, Vũ Thị Ngọc Bích, Vũ Thị Tường Vân, Trần Huy Hoàng	Đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i> phân lập từ phân người khỏe mạnh, phân động vật nuôi, thức ăn và nước tại xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam.	9	5
107	Nguyễn Thị Thu Nga, Lê Thị Hồng Hạnh, Phạm Thu Nga, Phùng Đăng Việt, Lê Thanh Chương, Đặng Thị Kim Thanh, Phạm Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Minh Phương	Đặc điểm lâm sàng và hình ảnh nội soi phế quản u máu hạ thanh môn ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương.	9	15
108	Kiều Thị Thủy, Cao Lý Tấn Thông, Nguyễn Thị Ái Nhung, Nguyễn Thành Triết	Nghiên cứu thành phần hóa học theo hướng tác dụng kháng viêm và chống oxy hóa của cây Bò công anh (<i>Lactuca indica</i> L.).	9	16
109	Nguyễn Ngọc Phương Kiều, Vũ Thanh Thảo, Trần Ngọc Châu	Tổng hợp và thử hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất 1,3-benzodioxole.	9	22
110	Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Nguyễn Huỳnh Thanh Tuyền, Lê Văn Huân, Trần Thị Văn Anh	Xây dựng quy trình định lượng đồng thời 2 hợp chất phenol orcinol glucosid và curculigosid trong Sâm cau (<i>Curculigo orchoides</i>) bằng UPLC-PDA.	9	28
111	Nguyễn Thị Ngọc Lan, Phan Thị Thu Hương	Giá trị chẩn đoán sớm nhồi máu cơ tim cấp của xét nghiệm Troponin I siêu nhạy trên hệ thống Atellica.	9	34
112	Lê Thị Phương, Vương Vũ Việt Hà, Trần Văn Khánh	Xác định đột biến gen α -thalassemia bằng kỹ thuật Multiplex ligation-dependent probe amplification.	12	1
113	Tạ Thị Lan Anh, Trịnh Thị Quế, Vũ Thị Hà, Đào Thị Thu Hiền, Hoàng Thị Ngọc Lan, Đoàn Thị Kim Phương	Nghiên cứu sàng lọc sơ sinh bệnh thiếu enzyme Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) tại Bệnh viện Đa khoa Medlatec.	12	6
114	Nguyễn Thị Lê, Hoàng Thị Phương Thanh, Hoàng Thị Thu Hằng, Phan Tuấn Hưng	Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và căn nguyên chảy máu phế nang lan tỏa ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2018 đến 2023.	12	10
115	Nguyễn Đăng Hưng, Phạm Đức Huân, Nguyễn Hoàng	Kết quả phẫu thuật nội soi điều trị bệnh co thắt tâm vị theo phương pháp Heller-Toupet.	12	15
116	Vũ Thị Ngoan, Ngô Quỳnh Hoa	Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân viêm phế quản cấp tại Bệnh viện Đa khoa Y học Cổ truyền Hà Nội.	12	19
117	Lê Đức Vinh, Trần Trinh Vương, Nguyễn Kim Thạch	Xác định thành phần loài giun móc (<i>Ancylostoma duodenale</i> , <i>Ancylostoma ceylanicum</i>) và giun mô <i>Necator americanus</i> gây bệnh cho người tại tỉnh Tây Ninh bằng kỹ thuật sinh học phân tử.	12	23
118	Trịnh Thị Dung, Đỗ Thiện Hải, Nguyễn Thị Vân, Hồ Thị Bích, Trần Thị Ngọc, Nguyễn Lê Chinh, Phùng Thị Liên Tinh, Nguyễn Thành Đông, Vương Xuân Bình, Nguyễn Thị Bảo Ngọc, Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Hồng, Đặng Thanh Thủy, Nguyễn Thị Dung, Lê Thị Hằng, Trần Thị Xuyến	Yếu tố ảnh hưởng đến tuân thủ điều trị ARV của trẻ vị thành niên nhiễm HIV tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2022-2023.	12	28
119	Trần Lê Bảo Hà, Đoàn Nguyễn Vũ, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ, Tô Minh Quân, Lê Thị Vi Tuyết, Nguyễn Thuận Nho, Trương Thanh Vỹ, Nguyễn Thị Hồng Thắm, Vũ Thị Thanh Tâm, Phan Hữu Hùng, Lê Quang Trí	Chế tạo và đánh giá một số đặc tính của chế phẩm gel trung bì da hướng ứng dụng trong y học tái tạo.	12	34
Khoa học nông nghiệp				
120	Nguyễn Thế Cường, Đồng Thanh Liêm, Viên Phúc Đạt, Nguyễn Văn Tuấn Anh, Hồ Lệ Thị	Mô tả đặc tính hình thái và sinh học của một số dòng lúa có phổ biến vùng Đồng bằng sông Cửu Long.	2	33
121	Đoàn Thị Ninh, Trần Thị Trinh, Đặng Thị Hóa, Nguyễn Ngọc Tuấn, Nguyễn Thị Hương Giang, Kim Văn Vạn, Đặng Thị Lua, Trương Đình Hoài	Nghiên cứu phân lập và một số đặc điểm bệnh học của <i>Flavobacterium columnare</i> gây bệnh trên cá rô phi (<i>Oreochromis</i> spp.) tại miền Bắc, Việt Nam.	2	41
122	Nguyễn Phúc Cẩm Tú	Ảnh hưởng của axit acetic lên hàm lượng kim loại nặng và thành phần dinh dưỡng của thịt sò huyết (<i>Anadara granosa</i>).	2	48
123	Phạm Quang Tuấn, Nguyễn Trung Đức, Nguyễn Thị Nguyệt Anh, Vũ Văn Liết	Chọn lọc các tổ hợp lai ngô nếp tím ưu tú bằng phương pháp chọn lọc đa biến MGIDI tại Việt Nam.	2	53
124	Trần Hiếu, Trương Hoài Phong, Nguyễn Thị Như Mai, Hoàng Đức Khải, Hoàng Thanh Tùng, Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Lê Ngọc Triệu, Nguyễn Bá Nam, Hoàng Thị Như Phương, Bùi Văn Thế Vinh, Dương Tấn Nhựt	Tạo chồi in vitro sạch virus cây chanh dây bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh.	2	61
125	Nguyễn Đức Bách, Phạm Tài Minh, Vũ Lê Diệu Hương, Phí Thị Cẩm Miên	Nghiên cứu thử nghiệm nuôi tảo <i>Chaetoceros calcitrans</i> trong hệ thống quang sinh vận hành bằng khí.	2	66
126	Lê Ngọc Tuấn, Nguyễn Thúc Bội Châu, Huỳnh Thị Linh Thu, Bùi Thị Lan Hương, Phạm Thanh Tân, Nguyễn Minh Lộc, Nguyễn Tấn Toàn, Phan Trí Nguyễn, Hoàng Mạnh Cường, Nguyễn Văn Thái, Đỗ Phước Hùng	Đánh giá kết quả điều trị trật khớp quanh nguyệt bằng phương pháp mổ nắn và khâu dây chằng thuyên nguyệt.	3DB	3
127	Đỗ Văn Hải, Cao Đình Bằng, Nguyễn Mộc Sơn, Phạm Ngọc Đình, Nguyễn Hoàng Quân, Nguyễn Mạnh Khánh	Thay khớp silicone khớp liên đốt gần sau chấn thương và vết thương bàn tay: Báo cáo 2 trường hợp.	3DB	8
128	Lê Gia Ánh Thy, Nguyễn Việt Tân	Đánh giá kết quả điều trị phẫu thuật tổn thương phức hợp sụn sợi tam giác (TFCC) loại IB (Palmer).	3DB	12
129	Nguyễn Tấn Vương	Nhân 1 trường hợp khâu nối bàn tay đứt lìa tại Bệnh viện Đa khoa Bình Định.	3DB	18
130	Lưu Mạnh Hùng, Bùi Văn Nhân, Nguyễn Hải Dương	Đánh giá kết quả phẫu thuật gây kín xương bàn ngón tay bằng nẹp vít tại Bệnh viện Đa khoa Lâm Đồng.	3DB	22
131	Võ Chiêu Tài	Báo cáo một trường hợp làm sàng thiếu sản ngón cái ở trẻ em.	3DB	25
132	Trương Việt Thông, Trần Đăng Khoa, Trương Trí Hữu	Điều trị gãy kín xương bánh chè đường gãy ngang bằng phương pháp néo ép sử dụng chỉ siêu bền.	3DB	28
133	Lê Gia Ánh Thy, Đinh Ngọc Minh	Đánh giá kết quả ngắn hạn điều trị phẫu thuật trật khớp cùng đòn cấp tính bằng chỉ siêu bền.	3DB	36
134	Nguyễn Hải Dương, Trần Đăng Khoa	Nhân một trường hợp phẫu thuật sửa chữa dị tật thừa ngón tay cái hiếm gặp tại Bệnh viện Đa khoa Lâm Đồng.	3DB	41
135	Đinh Ngọc Minh, Hoàng Ngọc Phát, Phan Bửu Vinh, Phan Trí Nguyễn	Đánh giá bước đầu điều trị môm cụt đầu ngón tay lộ xương bằng chăm sóc lành thi hai.	3DB	44
136	Nguyễn Tấn Toàn, Hoàng Ngọc Phát, Nguyễn Tấn Luật	Biến chứng dây cung sau phẫu thuật giải phóng ngón tay cò súng qua da: Nhân một trường hợp.	3DB	48
137	Phạm Đình Thế, Lê Hoàng Văn Hải	Kết quả điều trị gãy đầu dưới xương quay bằng nẹp khóa với đường mổ xâm lấn tối thiểu tại Bệnh viện TP Thủ Đức.	3DB	53
138	Võ Bảo Duy, Lê Ngọc Quyên	Xác định vai trò giữ vững khớp thang bàn của dây chằng chéo trước và dây chằng mặt lưng bên quay.	3DB	58
139	Lê Quang Trí, Tạ Thị Tuyết Mai	Khảo sát chỉ số đường của 4 loại sửa proanecy intensive, operanecy, proanecy diabetes và proanecy hepa.	3DB	62
140	Tôn Thị Thanh Thảo, Nguyễn Thế Anh, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Duy Khánh, Nguyễn Thành Nhân	Khảo sát nhu cầu tư vấn sử dụng thuốc và mức độ hài lòng của bệnh nhân sau khi được tư vấn tại Bệnh viện An Bình.	3DB	69
141	Nguyễn Văn Lam, Lê Thành Phương, Nguyễn Phương Tùng, Lê Thị Lý	Nghiên cứu mật độ trồng thích hợp cho giống chuối tiêu già Nam Mỹ trên đất đồn thừa, đồi ruộng tại huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc.	5	43

142	Đỗ Đức Tùng, Nguyễn Ngọc Hân, Đỗ Phương Linh	Xác định trọng số các tiêu chí đánh giá tiềm năng phát triển nuôi cá nước ngọt tại tỉnh Hưng Yên bằng phương pháp phân tích thứ bậc (AHP).	5	48
143	Phạm Phương Thu, Nguyễn Thị Tinh, Trần Ngọc Hùng, Ngô Xuân Bình	Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (<i>Cymbidium wenshanense</i>) bằng phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i> .	5	55
144	Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Thu, Trần Văn Tuấn, Phạm Hồng Hiền, Nguyễn Xuân Cảnh	Khảo sát một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces diastatochromogenes</i> VNUA27 sử dụng trong kiểm soát nấm bệnh hại cây chuối.	5	59
145	Trịnh Ngọc Ái, Trần Thị Thúy Liễu, Hồ Tuấn Kiệt, Thái Nhật Quang, Lê Văn Thúc, Nguyễn Minh Hiệp, Nguyễn Tiến Dũng	Vì nhân giống cây dâu tây Mỹ thơm (<i>Fragaria ananassa</i> “pajaro”) bằng phương pháp nuôi cấy dinh sinh trưởng.	5	64
146	Vũ Xuân Tạo, Lê Thu Hương, Trần Bảo Trâm, Đào Ngọc Ánh, Lê Thị Hoàng Yến, Đỗ Mai Linh	Nghiên cứu sàng lọc các chủng nấm <i>Trichoderma</i> phân lập từ đất trồng nghệ vàng (<i>Curcuma longa</i>) tại Hưng Yên trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng.	5	70
147	Đoàn Thị Kiều Tiên, Đỗ Thị Tuyết Nhung, Đặng Thị Hồng Diệu, Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Thị Ngọc Mi, Huỳnh Xuân Phong	Nghiên cứu điều kiện chế biến nước uống lên men từ măng cầu xiêm (<i>Annona muricata</i> L.) sử dụng nấm men <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RV002.	5	76
148	Nguyễn Trung Đức, Nguyễn Thị Nguyệt Anh, Phạm Quang Tuấn, Vũ Văn Liệt	Đặc điểm nông học và đa dạng di truyền của các dòng ngô ngọt ôn đới và nhiệt đới tự phối S4 mới phát triển.	7	47
149	Nguyễn Thị Trúc Quyên, Đoàn Văn Cường, Mã Tú Lan, Nguyễn Thành Nhân, Từ Thanh Dung, Nguyễn Thị Ngọc Tinh	Ảnh hưởng của cao chiết vỏ quế (<i>Cinnamomum verum</i>) lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cà rô phi (<i>Oreochromis</i> spp.) kháng lại vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> .	7	53
150	Vũ Xuân Tạo, Nguyễn Thị Hà Ly, Trần Bảo Trâm, Nguyễn Đức Duy, Nguyễn Thảo Nhi, Nguyễn Thị Thanh Mai, Đào Ngọc Ánh, Trần Văn Tuấn	Phát triển phương pháp HPLC-DAD định lượng pentostatin trong quả thể nấm dược liệu <i>Cordyceps militaris</i> .	7	60
151	Nguyễn Hoàng Nhật Tân, Hà Thị Trúc Mai, Lương Thị Thủy Dương, Nguyễn Vũ Phong	Đặc điểm sinh học và khả năng ức chế của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces rochei</i> BT02 đối với vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> gây bệnh héo xanh.	7	67
152	Lê Thị Thanh Tâm, Phạm Thị Lương, Lê Thị Phương Thảo, Jennifer Jähne, Peter Lasch, Rainer Borriess	Phân lập, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng và đối kháng chống lại nấm bệnh <i>Fusarium oxysporum</i> và tuyến trùng nốt sừng <i>Meloidogyne</i> sp. ở Việt Nam.	9	39
153	Nguyễn Thị Kim Liên, Trương Thị Thúy Hằng, Lâm Hoàng Lai, Nguyễn Hồng Yến, Ngô Khánh Duy	Kích thích cá hồng mí Ấn Độ (<i>Sahyadria denisonii</i>) sinh sản bằng kích dục tố khác nhau.	9	46
154	Lê Thị Diễm, Trương Hoài Phong, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đức Khải, Vũ Quốc Luận, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Thị Như Mai, Trịnh Thị Hương, Bùi Văn Thế Vinh, Trần Quế, Dương Tấn Nhựt	So sánh hiệu quả phát sinh phối vô tính từ các nguồn mẫu <i>in vitro</i> của cây sâm Ngọc Linh (<i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.).	9	51
155	Trần Duy Việt, Phan Thị Thanh, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Thị Ngừ	Nghiên cứu tạo dòng lạc năng suất và mang gen/QTL chịu hạn triển vọng.	9	58
156	Ngô Minh Trí, Trần Lê Nguyễn, Trần Thị Mỹ Tiên, Lâm Ngọc Kim Trúc, Phùng Hoàng Yến, Dương Nguyễn Mai Anh, Phùng Thị Hằng, Nguyễn Thị Pha	Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid đến sự phát sinh biến dị trên lan Cẩm Cù (<i>Hoya kerrii</i>).	9	63
157	Nguyễn Thị Hạnh, Vũ Thu Trang, Nguyễn Văn Hưng	Ảnh hưởng của xử lý enzyme pectinase đến hiệu suất thu hồi dịch quả thanh long ruột đỏ trồng ở Vĩnh Phúc.	9	69
158	Hoàng Thị Áu, Phạm Thị Kim Yến, Vũ Thị Thu Hương, Lê Văn Đạt, Nguyễn Thị Lan Anh, Giang Thị Thanh Nhân, Phạm Đoàn Lân, Lưu Quang Minh, Nguyễn Khánh Vân	Ảnh hưởng của Demecolcine và thời gian nuôi thành thực <i>in vitro</i> tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.	12	38
159	Nguyễn Hữu Nghĩa, Phan Trọng Bình, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Đức Bình, Phạm Thái Giang, Phạm Thị Thanh	Biến động các thông số môi trường nước cơ bản nguồn cấp nuôi tôm nước lợ khu vực phía Bắc giai đoạn 2017-2021.	12	43
160	Nguyễn Thị Thu Hiền	Đánh giá hàm lượng estradiol, progesterone của dê Bách Thảo và dê Boer theo chu kỳ động dục.	12	52
161	Khổng Ngân Giang, Lê Thị Như	Nghiên cứu nhân nhanh 2 giống cà phê <i>Arabica</i> lai F1 Centraamericano (H1) và Mundo Maya (H16) thông qua phát sinh phối soma và sử dụng công nghệ Bioreactor.	12	56
162	Ninh Thị Thảo, Nguyễn Hồng Thương, Đinh Trường Sơn, Phạm Thị Dung, Nông Thị Huệ	Nhân giống <i>in vitro</i> cây Trầu bà vàng chanh (<i>Philodendron hederaceum</i> “Lemon Lime”).	12	64
163	Trần Thị Diễm Hương, Nguyễn Ngọc Tuyết, Nguyễn Thị Hồng Thương	Phân lập và phân tích <i>in silico</i> các đặc điểm chức năng của một biến thể bản sao terpene synthase (<i>HbTPS6L-XI</i>) hiện diện ở vỏ thân cây cao su <i>Hevea brasiliensis</i> RRIV 209.	12	70
Khoa học xã hội và nhân văn				
164	Phạm Tiến Mạnh	Nghiên cứu ảnh hưởng của hoạt động đầu tư nước ngoài đến thị trường chứng khoán Việt Nam.	4	1
165	Nguyễn Thị Quỳnh Hương	Thực trạng và giải pháp thu hút nguồn vốn FDI vào ngành công nghiệp chế biến, chế tạo hướng tới mục tiêu phát triển kinh tế bền vững ở Việt Nam giai đoạn hiện nay.	4	6
166	Huỳnh Thị Diệu Linh	Vai trò của công nghệ đối với thương mại quốc tế hàng công nghệ cao của Việt Nam.	4	11
167	Nguyễn Quốc Phong	Ngành dệt may Việt Nam vượt qua đại dịch COVID-19: Thực trạng và giải pháp.	4	17
168	Vũ Quỳnh Nam, Vũ Quyết Tiến, Nguyễn Thị Thu Hồng	Nghiên cứu đánh giá thực trạng phát triển sản phẩm OCOP của TP Móng Cái, tỉnh Quảng Ninh.	4	21
169	Nguyễn Quang Phục	Giải pháp phát triển mô hình sản xuất rau an toàn tại huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế.	4	26
170	Phạm Văn Sơn, Hoàng Văn Phai, Bùi Tiến Phúc	Phát triển kinh tế tập thể ở Việt Nam: Thực trạng và giải pháp.	4	32
171	Đoàn Thị Yến, Nguyễn Thị Hồng, Đoàn Tố Như	Lao động kỹ năng số ngành bán lẻ trong bối cảnh chuyển đổi số: Một số khuyến nghị.	4	36
172	Nguyễn Thị Liên, Ngô Thị Mai, Lại Quang Huy, Nguyễn Hùng Cường, Đoàn Huy Hoàng	Các yếu tố tác động đến ý định nghỉ việc của nhân lực ngành nhân sự.	4	41
173	Đỗ Thị Tươi	Đánh giá của người lao động về thưởng Tết trong doanh nghiệp ở Việt Nam.	4	47
174	Nguyễn Thị Minh Hòa, Hà Tuấn Anh	Các nhân tố ảnh hưởng tới hành vi tiêu dùng xanh: Bằng chứng thực nghiệm từ người tiêu dùng tại tỉnh Trà Vinh.	4	52
175	Hồ Ngọc Cường, Nguyễn Thị Thuỳ Dung, Lưu Thị Thu Huyền, Hoàng Thị Vinh	Các yếu tố ảnh hưởng đến hành vi giảm thiểu chất thải rắn sinh hoạt tại hộ gia đình: Nghiên cứu trường hợp tại Điện Châu, Nghệ An.	4	59
176	Phạm Phương Chi, Lê Thị Ngọc Ngân	Tiểu thuyết Coolie (1936) của nhà văn Mulk Raj Anand từ góc nhìn phê bình hậu thuộc địa: Dự án dân tộc theo xu hướng Marxist ở Ấn Độ đầu thế kỷ XX.	4	66
177	Bùi Thị Thu Hà, Mai Thanh Lan, Bùi Tuấn Thành	Ảnh hưởng của các yếu tố đến năng suất lao động: Nghiên cứu các doanh nghiệp dệt may tại Việt Nam.	10	1
178	Phạm Xuân Quỳnh, Lê Long Hậu	Đầu tư trong bối cảnh hạn chế tài chính: Trường hợp các doanh nghiệp niêm yết ở Việt Nam.	10	8
179	Nguyễn Thị Hồng	Các nhân tố ảnh hưởng đến quyết định sử dụng thanh toán điện tử của người tiêu dùng trung niên tại Việt Nam.	10	16
180	Phạm Thị Vượng	Tư tưởng Hồ Chí Minh, quan điểm của Đảng về quân đội tham gia sản xuất và xây dựng kinh tế.	10	24
181	Vũ Thị Ánh Tuyết	Nghiên cứu khung lý thuyết về hành vi ngoài bốn phạm của giảng viên.	10	29
182	Phạm Thị Bình, Trương Thị Hào, Tạ Đức Hiếu	Thiết kế và sử dụng tranh biếm họa trong dạy học địa lý dân cư ở trường phổ thông.	10	34
183	Vũ Quỳnh Nam, Chu Thúc Đạt	Phát huy lợi thế của địa phương để phát triển du lịch cộng đồng: Nghiên cứu tại tỉnh Hà Giang.	10	39
184	Ao Thu Hoài, Trần Nhân Phúc, Trương Hải Trí, Nguyễn Lê Hoàn Như Ý, Trần Ngọc Tường Vi, Nguyễn Trường	Ảnh hưởng của truyền thông marketing đến quyết định mua điện thoại thông minh.	10	44
185	Nguyễn Thị Thanh Nga, Nguyễn Mạnh Hùng	Tác động và lợi ích của việc ứng dụng trí tuệ nhân tạo trong lĩnh vực quản lý xuất, nhập cảnh ở Việt Nam: Một số vấn đề lý luận, pháp lý và thực tiễn.	10	49
186	Vũ Phú Dũng, Trần Quốc Khánh	Vận dụng tính nhân văn về kỷ luật quân đội của Chủ tịch Hồ Chí Minh vào quản lý tư tưởng, chấp hành kỷ luật trong quân đội hiện nay.	10	53
187	Hà Tấn Linh, Dương Thị Trúc, Nguyễn Hiếu Trung, Đặng Kiều Nhân, Văn Phạm Đăng Trí	Quản lý nhà nước về phòng, chống thiên tai của tỉnh Sóc Trăng giai đoạn 2010-2020.	10	56
188	Nguyễn Thị Minh Hòa, Nguyễn Phú Bảo, Hà Tuấn Anh	Đánh giá tác động của biến đổi khí hậu đến biến động dân số ở TP Hồ Chí Minh.	10	62
189	Đặng Kiều Nhân, Hồ Chí Thịnh, Nguyễn Hiếu Trung	Chuyển đổi sản xuất nông nghiệp thích nghi với hạn - mặn ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long: Vấn đề quan tâm về chính sách.	10	68

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài báo gửi đăng trên Tạp chí phải là bài báo nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài báo trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacaongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khi liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

3. Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phân kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện ^(1, 2, 3,...) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với một hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

- Lưu ý:
- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
 - Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
 - Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

Tập(số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang/số trang/trang đầu-trang cuối phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

Nếu có một số tài liệu tham khảo có cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: A. Amber (1982, p.39).

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng; kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của khoa học y - dược

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 65 - Number 12 - December 2023

Xác định đột biến gen α -thalassemia bằng kỹ thuật Multiplex ligation-dependent probe amplification.

Lê Thị Phương, Vương Vũ Việt Hà, Trần Văn Khánh

Nghiên cứu sàng lọc sơ sinh bệnh thiếu enzyme Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) tại Bệnh viện Đa khoa Medlatec.

Tạ Thị Lan Anh, Trịnh Thị Quế, Vũ Thị Hà, Đào Thị Thu Hiền, Hoàng Thị Ngọc Lan, Đoàn Thị Kim Phượng

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và căn nguyên chảy máu phế nang lan tỏa ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ năm 2018 đến 2023.

Nguyễn Thị Lê, Hoàng Thị Phương Thanh, Hoàng Thị Thu Hằng, Phan Tuấn Hưng

Kết quả phẫu thuật nội soi điều trị bệnh co thắt tâm vị theo phương pháp Heller-Toupet.

Nguyễn Đăng Hưng, Phạm Đức Huân, Nguyễn Hoàng

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân viêm phế quản cấp tại Bệnh viện Đa khoa Y học Cổ truyền Hà Nội.

Vũ Thị Ngoan, Ngô Quỳnh Hoa

Xác định thành phần loài giun móc (*Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*) và giun mỏ *Necator americanus* gây bệnh cho người tại tỉnh Tây Ninh bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

Lê Đức Vinh, Trần Trinh Vương, Nguyễn Kim Thạch

Yếu tố ảnh hưởng đến tuân thủ điều trị ARV của trẻ vị thành niên nhiễm HIV tại Phòng khám ngoại trú, Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2022-2023.

Trịnh Thị Dung, Đỗ Thiện Hải, Nguyễn Thị Vân, Hồ Thị Bích, Trần Thị Ngọc, Nguyễn Lê Chinh, Phùng Thị Liên Tình, Nguyễn Thành Đồng, Vương Xuân Bình, Nguyễn Thị Bảo Ngọc, Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Hồng, Đặng Thanh Thủy, Nguyễn Thị Dung, Lê Thị Hằng, Trần Thị Xuyến

Chế tạo và đánh giá một số đặc tính của chế phẩm gel trung bì da hướng ứng dụng trong y học tái tạo.

Trần Lê Bảo Hà, Đoàn Nguyên Vũ, Nguyễn Thị Ngọc Mỹ, Tô Minh Quân, Lê Thị Vĩ Tuyết, Nguyễn Thuận Nho, Trương Thanh Vỹ, Nguyễn Thị Hồng Thắm, Vũ Thị Thanh Tâm, Phan Hữu Hùng, Lê Quang Trí

Ảnh hưởng của Demecolcine và thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Hoàng Thị Áu, Phạm Thị Kim Yến, Vũ Thị Thu Hương, Lê Văn Đạt, Nguyễn Thị Lan Anh, Giang Thị Thanh Nhân, Phạm Doãn Lâm, Lưu Quang Minh, Nguyễn Khánh Vân

Biến động các thông số môi trường nước cơ bản nguồn cấp nuôi tôm nước lợ khu vực phía Bắc giai đoạn 2017-2021.

Nguyễn Hữu Nghĩa, Phan Trọng Bình, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Đức Bình, Phạm Thái Giang, Phạm Thị Thanh

Đánh giá hàm lượng estradiol, progesterone của dê Bách Thảo và dê Boer theo chu kỳ động dục.

Nguyễn Thị Thu Hiền

Nghiên cứu nhân nhanh 2 giống cà phê *Arabica* lai F1 Centroamericano (H1) và Mundo Maya (H16) thông qua phát sinh phôi soma và sử dụng công nghệ Bioreactor.

Khổng Ngân Giang, Lê Thị Như

Nhân giống *in vitro* cây Trầu bà vàng chanh (*Philodendron hederaceum* “Lemon Lime”).

Ninh Thị Thảo, Nguyễn Hồng Thương, Đinh Trường Sơn, Phạm Thị Dung, Nông Thị Huệ

Phân lập và phân tích *in silico* các đặc điểm chức năng của một biến thể bản sao terpene synthase (*HbTPS6L-XI*) hiện diện ở vỏ thân cây cao su *Hevea brasiliensis* RRIV 209.

Trần Thị Diễm Hương, Nguyễn Ngọc Tuyết, Nguyễn Thị Hồng Thương

1 Detection of α -thalassemia mutations by Multiplex ligation-dependent probe amplification.

Thi Phuong Le, Vu Viet Ha Vuong, Van Khanh Tran

6 Research of newborn screening of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) at Medlatec General Hospital.

Thi Lan Anh Ta, Thi Que Trinh, Thi Ha Vu, Thi Thu Hien Dao, Thi Ngoc Lan Hoang, Thi Kim Phuong Doan

10 Clinical features, paraclinical characteristics, and etiology of mediastinal bleeding diffusion in children at the Vietnam National Children's Hospital from 2018 to 2023.

Thi Le Nguyen, Thi Phuong Thanh Hoang, Thi Thu Hang Hoang, Tuan Hung Phan

15 Results of laparoscopic Heller-Toupet operation for achalasia.

Dang Hung Nguyen, Duc Huan Pham, Hoang Nguyen

19 Clinical and paraclinical characteristics of acute bronchitis patients at Hanoi Hospital of Traditional Medical.

Thi Ngoan Vu, Quynh Hoa Ngo

23 Determination of the composition of hookworm species (*Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*) and *Necator americanus* in humans at community in Tay Ninh province by biomolecular technique.

Duc Vinh Le, Trinh Vuong Tran, Kim Thach Nguyen

28 Factors affecting adherence to ARV of HIV-infected adolescents at the Outpatient Clinic, Vietnam National Children's Hospital in 2022-2023.

Thi Dung Trinh, Thien Hai Do, Thi Van Nguyen, Thi Bich Ho, Thi Ngoc Tran, Le Chinh Nguyen, Thi Lien Tinh Phung, Thanh Dong Nguyen, Xuan Binh Vuong, Thi Bao Ngoc Nguyen, Thi Thu Hang Nguyen, Thi Hong Nguyen, Thanh Thuy Dang, Thi Dung Nguyen, Thi Hang Le, Thi Xuyen Tran

34 Fabrication and evaluation of some characteristics of the skin's dermis gel direction to application in regenerative medicine.

Le Bao Ha Tran, Nguyen Vu Doan, Thi Ngoc My Nguyen, Minh Quan To, Thi Vi Tuyet Le, Thuan Nho Nguyen, Thanh Vy Truong, Thi Hong Tham Nguyen, Thi Thanh Tam Vu, Huu Hung Phan, Quang Tri Le

38 Effects of demecolcine and oocyte maturation time on the efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied pig embryos.

Thi Au Hoang, Thi Kim Yen Pham, Thi Thu Huong Vu, Van Dat Le, Thi Lan Anh Nguyen, Thi Thanh Nhan Giang, Doan Lan Pham, Quang Minh Luu, Khanh Van Nguyen

43 Changes in basic water environmental parameters of the water intake of brackish water shrimp farming in Northern Vietnam period 2017-2021.

Huu Nghia Nguyen, Trong Binh Phan, Thi Minh Nguyet Nguyen, Duc Binh Nguyen, Thai Giang Pham, Thi Thanh Pham

52 Evaluation of estradiol and progesterone contents of Bach Thao and Boer goats during the oestrous cycle.

Thi Thu Hien Nguyen

56 Study on rapid multiplication of two hybrid *Arabica* coffee varieties F1 Centroamericano (H1) and Mundo Maya (H16) through somatic embryogenesis and Bioreactor technology.

Ngan Giang Khong, Thi Nhu Le

64 *In vitro* propagation of *Philodendron hederaceum* “Lemon Lime”.

Thi Thao Ninh, Hong Thuong Nguyen, Truong Son Dinh, Thi Dung Pham, Thi Hue Nong

70 Isolation and *in silico* analysis of a transcript variant for a putative terpene synthase (*HbTPS6L-XI*) from the bark tissues of rubber *Hevea brasiliensis* RRIV 209.

Thi Diem Huong Tran, Ngoc Tuyet Nguyen, Thi Hong Thuong Nguyen