



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

B

Tập 64 - Số 2 - Tháng 2 năm 2022

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam
Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng
Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam
Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam
Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân
Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội
Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội
Trương Nam Hải - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mỏ - Địa chất
Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải
Phạm Gia Khánh - Chủ tịch Hội Ghép tạng Việt Nam
Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh
Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội
Bành Tiến Long - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
Lê Quan Nghiệm - Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội
Trần Hữu Phúc - Hội đồng GS Nhà nước
Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ
Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội
Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP PHỤ TRÁCH

Nguyễn Thị Hương Giang

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TẠP CHÍ ĐIỆN TỬ

Vũ Văn Hưng

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology
Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering
Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam
Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology
Tran Tho Dat - National Economics University
Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi
Vu Minh Giang - VNU, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology
Pham Huy Khang - University of Transport and Communications
Pham Gia Khanh - President of Vietnam Society of Organ Transplantation
Ho Dac Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi
Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology
Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City
Mai Trong Nhuan - VNU, Hanoi
Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi
Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi

EXECUTIVE DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Nguyen Thi Huong Giang

DEPUTY EDITOR

Nguyen Thi Hai Hang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF E-JOURNAL BOARD

Vu Van Hung

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Đinh Thị Luận

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn
Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

Đặc điểm kiểu gen của đa hình *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G và *MTRR* A66G ở phụ nữ sảy thai liên tiếp

Trần Ngọc Thảo My¹, Triệu Tiến Sang^{2*}, Nguyễn Ngọc Nhất², Trần Văn Tuấn³
Nguyễn Thanh Tùng², Nguyễn Minh Phương², Trịnh Thế Sơn²

¹Khoa Khoa học và Kỹ thuật, Đại học Sorbonne, Paris, Pháp

²Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Mô phôi Lâm sàng Quân đội, Học viện Quân y, 222 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 30/9/2021; ngày chuyển phản biện 4/9/2021; ngày nhận phản biện 26/10/2021; ngày chấp nhận đăng 29/10/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá mối liên quan giữa các kiểu gen của đa hình đơn nucleotide *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G và *MTRR* A66G với sảy thai liên tiếp. Nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp bệnh - chứng trên nhóm bệnh gồm những phụ nữ có tiền sử sảy thai liên tiếp không rõ nguyên nhân ($n=92$) và nhóm chứng là những phụ nữ thai sản khỏe mạnh ($n=92$). Kết quả cho thấy, số alen đột biến, kiểu gen dị hợp tử và đồng hợp tử bệnh của đa hình *MTHFR* C677T ở nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p<0,05$), người mang những kiểu gen dị hợp tử và đồng hợp tử đột biến có nguy cơ sảy thai liên tiếp cao hơn 2,5 lần (OR 2,5, 95% CI, 1,27-4,94, $p=0,0041$) và 4,57 lần (OR 4,57, 95% CI, 1,05-27,41, $p=0,0190$) so với không mang đột biến. Ngoài ra, nhận thấy sự tăng lên có ý nghĩa thống kê về số alen đột biến của đa hình *MTR* A2756G ở nhóm bệnh so với nhóm chứng ($p<0,05$). Tuy nhiên, cả 3 đa hình *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G và *MTRR* A66G đều không có sự khác biệt về kiểu gen giữa nhóm bệnh với nhóm chứng và không làm tăng nguy cơ sảy thai liên tiếp ($p>0,05$). Điều này cho thấy, đa hình *MTHFR* C677T là yếu tố nguy cơ gây sảy thai liên tiếp ở những phụ nữ tham gia nghiên cứu. Đối với những đa hình *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G và *MTRR* A66G cần mở rộng quy mô nghiên cứu để tiếp tục đánh giá nguy cơ gây bệnh.

Từ khóa: homocysteine, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, sảy thai liên tiếp.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, tỷ lệ phụ nữ bị sảy thai liên tiếp ngày càng tăng, trong đó ước tính cứ khoảng 100 phụ nữ mang thai thì có 15 trường hợp bị sảy thai. Con số này còn có thể cao hơn trong thực tế rất nhiều, bởi nhiều trường hợp phụ nữ bị sảy thai trùng vào thời điểm có kinh nguyệt nên hiện tượng này chưa được nhận biết rõ ràng. Theo Hiệp hội Y học sinh sản Hoa Kỳ (ASRM) và Bộ Y tế Việt Nam, “sảy thai liên tiếp” được định nghĩa là hiện tượng mất thai tự nhiên trước 22 tuần, xảy ra liên tiếp từ 2 lần trở lên. Nếu không được can thiệp từ sớm và tìm hiểu rõ về nguyên nhân gây sảy thai liên tiếp, một số nghiên cứu cho rằng, sau 2-3 lần sảy thai, hiện tượng này có nguy cơ lặp lại ở lần mang thai tiếp theo với tỷ lệ lên đến 33%. Vì vậy, người phụ nữ trong trường hợp này nên nhận được sự chăm sóc y tế phù hợp để được hỗ trợ và theo dõi trong suốt thai kỳ [1-3].

Nguyên nhân chính gây ra sảy thai liên tiếp rất đa dạng, chúng có thể phụ thuộc vào một hoặc nhiều yếu tố như độ tuổi mang thai của người mẹ, đặc điểm giải phẫu, miễn dịch, nhiễm khuẩn và kể cả các đặc điểm về mặt di truyền. Mặc dù vậy, hơn 50% trường hợp sảy thai là chưa thể xác định rõ nguyên nhân, điều này khiến cho quá trình nghiên cứu về sảy thai liên tiếp còn gặp nhiều khó khăn. Tuy nhiên, nồng độ homocysteine trong cơ thể người mẹ đã được chứng minh có mối liên quan mật thiết tới sảy thai liên tiếp, đặc biệt là một số đa hình đơn nucleotide liên quan tới những gen mã hóa cho các enzyme

điều hòa quá trình chuyển hóa homocysteine như *MTHFR*, *MTR* và *MTRR* [4]. Cụ thể, 2 đa hình *MTHFR* C677T (rs1801133) và *MTHFR* A1298C (rs1801131) có thể gây giảm hoạt tính enzyme methylenetetrahydrofolate reductase tham gia vào chu trình folate cung cấp gốc methyl cho homocysteine thành methionine. Trong khi đó, 2 đa hình *MTR* A2756G (rs1805087) và *MTRR* A66G (rs1801394) lần lượt ảnh hưởng đến các enzyme methionine synthase và methionine synthase reductase điều hòa quá trình tái methyl hóa homocysteine. Chính vì vậy, một số nghiên cứu đã tập trung vào ảnh hưởng đồng thời của cả 4 đa hình *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G và *MTRR* A66G để làm sáng tỏ hơn mối liên hệ giữa chúng và hiện tượng sảy thai chưa rõ nguyên nhân [5]. Tuy nhiên, mối liên quan của những đa hình này với sảy thai liên tiếp là một chủ đề còn gây nhiều tranh luận bởi các nhà khoa học chưa thể đưa ra một kết quả đồng nhất, một phần có thể lý giải là do khác biệt về mặt đối tượng tham gia nghiên cứu.

Hơn nữa, ở Việt Nam chưa có nhiều đề tài tập trung vào tìm hiểu mối liên quan giữa những đa hình đơn nucleotide này với hiện tượng sảy thai liên tiếp nên việc tiếp cận và đưa ra liệu trình chữa trị cho bệnh nhân vẫn còn nhiều hạn chế. Với lý do đó, chúng tôi tiến hành đánh giá mối liên quan giữa 4 đa hình *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G và sảy thai liên tiếp với mong muốn đưa ra một kết luận có ý nghĩa cho nghiên cứu và điều trị trong lâm sàng.

*Tác giả liên hệ: Email: trieusangk83@yahoo.com.vn

Genotype characteristic of *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G polymorphisms in recurrent pregnancy loss

Ngoc Thao My Tran¹, Tien Sang Trieu^{2*}, Ngoc Nhat Nguyen²,
Van Tuan Tran³, Thanh Tung Nguyen²,
Minh Phuong Nguyen², The Son Trinh²

¹Sorbonne University, Paris, France

²Tielnam Military Medical University,

160 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

³Military Institute of Clinical Embryology and Histology,

222 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 30 September 2021; revised 26 October 2021; accepted 29 October 2021

Abstract:

This research aimed to investigate the correlation between genotype of single nucleotide polymorphisms *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G and recurrent pregnancy loss (RPL). A case-control study was performed on 92 women suffering from URPL and 92 women who had a normal history of pregnancy. Regarding *MTHFR* C677T, the average numbers of alleles, heterozygous genotypes, and mutant homozygous genotypes were significantly higher in the group with RPL ($p < 0.05$), women with these genotypes had a greater incidence of having recurrent pregnancy losses 2.5 fold (OR 2.5, 95% CI, 1.27-4.94, $p = 0.0041$), and 4.57 fold (OR 4.57, 95% CI, 1.05-27.41, $p = 0.0190$), separately. Otherwise, the cases were also significantly higher in *MTR* A2756G mutant allele versus the controls ($p < 0.05$). However, in terms of the *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G polymorphisms, the obtained results were similar and they were not risks factor of recurrent pregnancy loss ($p > 0.05$). The polymorphism *MTHFR* C677T is a risk factor for the RPL in the participants. Regarding the *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, and *MTRR* A66G polymorphisms, more research has to be done to further analyse their correlation.

Keywords: homocysteine, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, recurrent pregnancy loss.

Classification number: 3.1

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

184 phụ nữ trong độ tuổi sinh sản được tuyển chọn vào nghiên cứu trong thời gian từ tháng 5/2019 đến tháng 5/2021 đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ.

Tiêu chuẩn lựa chọn: tuổi 18-35, nhóm bệnh gồm những bệnh nhân sảy thai liên tiếp từ 2 lần trở lên; nhóm chứng gồm những phụ nữ đã có ít nhất 1 con và không có tiền sử sảy thai.

Tiêu chuẩn loại trừ: bất thường nhiễm sắc thể, dị dạng tử cung, nhiễm trùng, bất thường trên xét nghiệm nội tiết tố, hội chứng kháng phospholipid, bệnh lý thai kỳ (đái tháo đường, tăng huyết áp), nghiện rượu và/hoặc thuốc lá.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu bệnh - chứng.

Mẫu nghiên cứu: chọn mẫu ngẫu nhiên đơn.

Các biến số, chỉ số trong nghiên cứu: đặc điểm cơ bản của đối tượng nghiên cứu (tuổi, chiều cao, cân nặng, BMI), tần số các alen đột biến và phân bố kiểu gen của mỗi loại đa hình *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G và *MTRR* A66G.

Tách chiết ADN: ADN tổng số được tách chiết từ máu tĩnh mạch theo quy trình sử dụng bộ kit G-spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc). Sau tách, ADN sẽ được kiểm tra chất lượng bằng máy đo OD SpectraMax Quickdrop, nếu đảm bảo yêu cầu sẽ được lưu trữ và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Phát hiện, phân tích đa hình gen: khuếch đại đoạn gen đích bằng phản ứng realtime-PCR sử dụng bộ kit Folate Metabolism Real-Time PCR Genotyping Kit (DNA-Technology) có thể tích như sau: 10 µl PCR-Buffer, 0,5 µl Tag-AT-Polymerase, 20 µl PCR-Mix (mỗi PCR-Mix tương ứng với một đột biến đa hình), 20 µl Mineral oil và 5 µl ADN mẫu. Phản ứng khuếch đại và phát hiện đột biến đa hình được thực hiện trong hệ thống máy luân nhiệt và tính thời gian thực DTprime 5M1-DNA Technology, với chu trình nhiệt đã được cài đặt sẵn.

Phân tích thống kê: số liệu được thu thập, mã hóa bằng phần mềm Epidata 3.1 và được phân tích bằng phần mềm STATA 16.0. Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, tỷ suất chênh OR. Student's t test và Chi-square test được sử dụng trong nghiên cứu này với độ tin cậy 95%, giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Tuổi trung bình của những phụ nữ sảy thai liên tiếp là $29,58 \pm 2,91$, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm khỏe mạnh không có tiền sử sảy thai là $30,69 \pm 2,44$ ($p = 0,0052$). Trong nhóm sảy thai liên tiếp, bệnh nhân trẻ nhất là 22 tuổi (1/92) và độ tuổi hay gặp nhất là 28 (13/92). Ngoài ra, các đặc điểm cơ bản ở nhóm bệnh và chứng lần lượt là cân nặng ($51,11 \pm 3,75$ và $54,38 \pm 4,50$

kg), chiều cao ($1,59 \pm 0,04$ và $1,60 \pm 0,05$ m), BMI ($20,24 \pm 1,39$ và $21,15 \pm 1,43$ kg/m²). Nhìn chung, về mặt kết quả nhận thấy, các đặc điểm cơ bản của đối tượng tham gia nghiên cứu đều có giá trị nằm trong giới hạn bình thường.

3.2. Số alen đột biến trung bình trên mỗi bệnh nhân

Bảng 1. Số alen đột biến trung bình ở bệnh nhân của mỗi nhóm.

	Nhóm bệnh (n=92)	Nhóm chứng (n=92)	Giá trị p
<i>MTHFR</i> C677T	$0,64 \pm 0,66$	$0,34 \pm 0,54$	0,0004
<i>MTHFR</i> A1298C	$0,61 \pm 0,66$	$0,55 \pm 0,64$	0,2854
<i>MTR</i> A2756G	$0,45 \pm 0,59$	$0,27 \pm 0,47$	0,0150
<i>MTRR</i> A66G	$0,66 \pm 0,72$	$0,57 \pm 0,44$	0,1918

Kết quả bảng 1 cho thấy, bệnh nhân sảy thai liên tiếp trung bình mang nhiều alen đột biến của đa hình *MTHFR* C677T hơn có ý nghĩa thống kê so với những phụ nữ không có tiền sử sảy thai trong nhóm chứng ($0,64 \pm 0,66$ và $0,34 \pm 0,54$, $p=0,0004$). Tương tự, bệnh nhân nhóm bệnh trung bình mang $0,45 \pm 0,59$ alen G đột biến của đa hình *MTR* A2756G, nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng là $0,27 \pm 0,47$ ($p=0,015$). Ngược lại, không có sự khác biệt về số alen đột biến của đa hình *MTHFR* A1298C và *MTRR* A66G trung bình trên mỗi bệnh nhân thuộc nhóm sảy thai liên tiếp với nhóm đối chứng ($p>0,05$).

3.3. Đa hình gen *MTHFR*

Bảng 2. Phân bố các kiểu gen của đa hình gen *MTHFR*.

	Nhóm bệnh (n=92)	Nhóm chứng (n=92)	OR (95% CI)	Giá trị p
<i>MTHFR</i> C677T				
CC	42 (45,65%)	64 (69,57%)	1	
CT	41 (44,57%)	25 (27,17%)	2,50 (1,27-4,94)	0,0041
TT	9 (9,78%)	3 (3,26%)	4,57 (1,05-27,41)	0,0190
TT + CT	50 (54,35%)	28 (30,43%)	2,72 (1,42-5,22)	0,0010
CT + CC	83 (90,22%)	89 (96,74%)	0,31 (0,05-1,31)	0,0732
<i>MTHFR</i> A1298C				
AA	45 (48,91%)	48 (52,17%)	1	
AC	38 (41,30%)	37 (40,22%)	1,09 (0,57-2,11)	0,7689
CC	9 (9,78%)	7 (7,61%)	1,37 (0,41-4,71)	0,5612
CC + AC	47 (51,09%)	44 (47,83%)	1,14 (0,61-2,12)	0,6582
AC + AA	83 (90,22%)	85 (92,39%)	0,76 (0,23-2,42)	0,6008

Kết quả bảng 2 cho thấy, đa hình *MTHFR* C677T có 3 kiểu gen theo thứ tự từ phổ biến đến ít phổ biến là đồng hợp bình thường (677CC), dị hợp tử đột biến (677CT) và đồng hợp tử đột biến (677TT). Kiểu gen dị hợp ở nhóm bệnh nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng, đồng thời nhận thấy người mang gen dị hợp có nguy cơ sảy thai liên tiếp cao hơn 2,5 lần so với bình thường (OR 2,5, 95% CI, 1,27-4,94, $p=0,0041$); tương tự kiểu gen đồng hợp đột biến làm tăng nguy cơ sảy thai liên tiếp 4,57 lần (OR 4,57, 95% CI, 1,05-27,41, $p=0,019$). Những người mang alen đột biến (TT + CT) ở nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê và làm nguy cơ sảy thai liên tiếp tăng 2,72 lần so với đồng hợp bình thường (OR 2,72, 95% CI, 1,42-5,22, $p=0,001$). Cũng nhận thấy, những phụ nữ có ít nhất 1 alen bình thường (CT + CC) có nguy cơ sảy thai liên

tiếp thấp hơn không có ý nghĩa thống kê so với những người mang đột biến đồng hợp tử (OR 0,31, 95% CI, 0,05-1,31, $p=0,0732$).

Đối với đa hình *MTHFR* A1298C, không có sự khác biệt về kiểu gen giữa 2 nhóm ($p>0,05$). Đồng thời, trong nghiên cứu của chúng tôi không nhận thấy sự liên quan giữa các kiểu gen của đa hình *MTHFR* A1298C với sảy thai liên tiếp ở nhóm phụ nữ tham gia nghiên cứu.

3.4. Đa hình gen *MTR* và *MTRR*

Bảng 3. Phân bố các kiểu gen của đa hình gen *MTR* và *MTRR*.

	Nhóm bệnh (n=92)	Nhóm chứng (n=92)	OR (95% CI)	Giá trị p
<i>MTR</i> A2756G				
AA	56 (60,87%)	68 (73,91%)	1	
AG	31 (33,70%)	23 (25,00%)	1,64 (0,82-3,29)	0,1329
GG	5 (5,43%)	1 (1,09%)	6,07 (0,64-291,2)	0,0673
GG + AG	36 (39,13%)	24 (26,09%)	1,82 (0,93-3,58)	0,0591
AG + AA	87 (94,57%)	91 (98,91%)	0,19 (0,00-1,77)	0,0969
<i>MTRR</i> A66G				
AA	45 (48,91%)	49 (53,26%)	1	
AG	34 (36,96%)	36 (39,13%)	1,03 (0,53-2,00)	0,9249
GG	13 (14,13%)	7 (7,61%)	2,02 (0,67-6,51)	0,1641
GG + AG	47 (51,09%)	43 (46,74%)	1,19 (0,64-2,21)	0,5553
AG + AA	79 (85,87%)	85 (92,39%)	0,50 (0,16-1,44)	0,1553

Kết quả bảng 3 cho thấy phân bố các kiểu gen của đa hình *MTR* và *MTRR*. Nhìn chung kiểu gen đồng hợp bình thường vẫn chiếm đa số, không có sự khác biệt về kiểu gen tương ứng giữa nhóm sảy thai liên tiếp và phụ nữ không có tiền sử sảy thai ($p>0,05$). Đồng thời, trong nghiên cứu của chúng tôi không nhận thấy sự liên quan giữa các kiểu gen của đa hình *MTR* A2756G và *MTRR* A66G với sảy thai liên tiếp.

4. Bàn luận

Theo Hiệp hội Y học sinh sản Hoa Kỳ và Bộ Y tế Việt Nam, sảy thai được định nghĩa là hiện tượng thai chết tự nhiên và bị tống ra khỏi buồng tử cung trước khi có thể sống được, tính từ khi thụ thai cho đến 22 tuần tuổi [1, 3]. Định nghĩa này bao gồm cả những trường hợp mất thai sau khi thụ thai tự nhiên và điều trị hỗ trợ sinh sản (ngoại trừ thai ngoài tử cung và sự thất bại làm tổ trong chuyển phôi). Sảy thai liên tiếp được định nghĩa là tình trạng mất từ hai thai liên tiếp trở lên, một số nghiên cứu cho rằng, sau 2-3 lần sảy thai, hiện tượng này có nguy cơ lặp lại ở lần mang thai tiếp theo với tỷ lệ lên đến 33%. Rất khó ước tính chính xác tỷ lệ hiện mắc sảy thai liên tiếp nhưng hầu hết các nghiên cứu báo cáo rằng, tình trạng này ảnh hưởng đến 1-5% phụ nữ. Những bệnh nhân sảy thai liên tiếp đã trải qua chấn thương tâm lý và có nguy cơ mắc phải một loạt các rối loạn tâm lý và tâm thần như lo âu, trầm cảm, rối loạn căng thẳng sau chấn thương và rối loạn ám ảnh cưỡng chế [6]. Hơn 2 thập kỷ trở lại đây, yếu tố đông máu di truyền được cho là nguy cơ của huyết khối mạch máu, đồng thời chúng có thể cũng liên quan tới 40-50% bệnh nhân sảy thai

liên tiếp [7]. Trong đó, đa hình đơn nucleotide xảy ra trên các gen mã hóa enzyme chuyển hóa homocysteine nhận được nhiều sự quan tâm.

MTHFR là một trong những enzyme chính trong quá trình chuyển hóa axit folic xúc tác phản ứng một chiều 5, 10-methylenetetrahydrofolate thành 5-methylenetetrahydrofolate cung cấp cơ chất cho phản ứng chuyển homocysteine thành methionine. Sự thay đổi C thành T ở nucleotide 677 và A thành C ở nucleotide 1298 trong gen *MTHFR* dẫn đến sự thay đổi trình tự axit amin, lần lượt từ alanin thành valin và glutamin thành alanin. Protein đột biến đã làm giảm hoạt động của enzyme dẫn đến hiện tượng giảm methyl hóa DNA và có thể gây ra sự bất ổn định của hệ gen [8]. Hiện tại, mặc dù nhiều nghiên cứu đã đánh giá mối liên quan giữa đa hình gen *MTHFR* C677T, A1298C và sảy thai liên tiếp, nhưng kết quả vẫn còn gây nhiều tranh luận. Tỷ lệ mang kiểu gen đồng hợp tử thay đổi giữa các khu vực trên thế giới như Tây Ban Nha 25%, người da trắng Bắc Mỹ 10-15%, người Mỹ gốc Phi 6%, trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ này trong nhóm bệnh và chứng lẫn lượt là 9 và 3%. Nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy, đa hình gen *MTHFR* C677T là nguy cơ của bệnh sảy thai liên tiếp ở phụ nữ Việt Nam, trong đó người mang gen dị hợp 677CT có nguy cơ sảy thai liên tiếp cao hơn 2,5 lần so với bình thường (OR 2,5, 95% CI, 1,27-4,94, p=0,0041) và kiểu gen đồng hợp bệnh 677TT làm tăng nguy cơ sảy thai liên tiếp 4,57 lần (OR 4,57, 95% CI, 1,05-27,41, p=0,0190). Kết quả này phù hợp với các phân tích tổng hợp của A. Ren và cs (2006) [9] đã chỉ ra rằng, *MTHFR* C677T là yếu tố nguy cơ di truyền đối với sảy thai liên tiếp không rõ nguyên nhân ở một nhóm phụ nữ Trung Quốc. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Y. Xu và cs (2019) [10], nguy cơ sảy thai liên tiếp ở phụ nữ có kiểu gen TT, CT, hoặc TT+CT không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng. Điều này có thể là do kích thước mẫu không đủ hoặc các yếu tố khác như lượng axit folic trong thai kỳ.

Mặc dù nhiều nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng, alen *MTHFR* A1298C là một yếu tố nguy cơ đối với sảy thai liên tiếp [11-13], nghiên cứu của chúng tôi không nhận thấy sự liên quan giữa các kiểu gen của đa hình *MTHFR* A1298C với sảy thai liên tiếp ở những phụ nữ tham gia nghiên cứu, kết quả này tương đồng với nghiên cứu của M. Hohlagschwandtner và cs (2003) [14] và L. Luo và cs (2015) [15]. Theo Y. Yang và cs (2016) [16], đa hình gen *MTHFR* A1298C có liên quan đến sảy thai liên tiếp ở người da trắng nói chung nhưng không liên quan đến người châu Á. Do đó, cần có các nghiên cứu chuyên sâu hơn về mối liên quan giữa *MTHFR* A1298C và sảy thai liên tiếp, đặc biệt trên các đối tượng có nguồn gốc di truyền khác nhau. Trên thế giới nói chung, Việt Nam nói riêng còn ít nghiên cứu đánh giá mối liên quan giữa đa hình *MTR* A2756G và *MTRR* A66G đối với sảy thai liên tiếp, kết quả phân tích trên 184 bệnh nhân cho thấy, các kiểu gen đồng hợp đột biến, dị hợp đột biến của 2 đa hình này đều không phải là nguy cơ gây sảy thai liên tiếp chưa rõ nguyên nhân. Đây là cơ sở góp phần củng cố thêm bằng chứng về mối liên quan của các đa hình gen trên đối với sảy thai liên tiếp chưa rõ nguyên nhân.

4. Kết luận

Đa hình *MTHFR* C677T là yếu tố nguy cơ gây sảy thai liên tiếp chưa rõ nguyên nhân ở những phụ nữ tham gia nghiên cứu. Đối với những đa hình *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G và *MTRR* A66G, nhóm nghiên cứu chưa tìm thấy mối liên quan giữa những đa hình này với sảy thai liên tiếp trong số những đối tượng tham gia, vì vậy, cần phải mở rộng quy mô nghiên cứu để tiếp tục đánh giá nguy cơ gây bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2013), "Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion", *Fertility and Sterility*, **99**(1), DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.023.
- [2] E. Dimitriadis, E. Menkhorst, S. Saito, et al. (2020), "Recurrent pregnancy loss", *Nature Reviews Disease Primers*, **6**(1), DOI: 10.1038/s41572-020-00228-z.
- [3] Vietnam Ministry of Health (2015), *Decision No. 315/QĐ-BYT dated January 29, 2015 on Guidelines for Diagnosis and Treatment of Obstetric and Gynecological Diseases* (in Vietnamese).
- [4] W.M. Hague (2003), "Homocysteine and pregnancy", *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **17**(3), pp.459-469, DOI: 10.1016/s1521-6934(03)00009-9.
- [5] W.X. Li, F. Cheng, A.J. Zhang, et al. (2017), "Folate deficiency and gene polymorphisms of *MTHFR*, *MTR* and *MTRR* elevate the hyperhomocysteinemia risk", *Clin. Lab.*, **63**(3), pp.523-533, DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160917.
- [6] R.B. Atik, O.B. Christiansen, J. Elson, et al. (2018), "ESHRE guideline: Recurrent pregnancy loss", *Human Reproduction Open*, **2018**(2), DOI: 10.1093/hropen/hoy004.
- [7] H. Neamatzadeh, V. Ramazani, S.M. Kalantar, et al. (2016), "Serum immune reactivity against 02- glycoprotein-I and anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies by ELI-P-complex screening technology in recurrent miscarriage", *Minerva Ginecol.*, **68**(3), pp.243-249.
- [8] A. Ebadifar, V. Ramazani, S.M. Kalantar, et al. (2015), "Maternal supplementary folate intake, methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T and A1298C polymorphisms and the risk of orofacial cleft in Iranian children", *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, **7**(2), pp.80-84.
- [9] A. Ren, J. Wang (2006), "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: A meta- analysis", *Fertility and Sterility*, **86**(6), pp.1716-1722, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.052.
- [10] Y. Xu, Y. Ban, L. Ran, et al. (2019), "Relationship between unexplained recurrent pregnancy loss and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms", *Fertility and Sterility*, **111**(3), pp.597-603, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.11.011.
- [11] R.N. Rohini, A. Khanna, R. Singh, et al. (2013), "Association of maternal and fetal *MTHFR* A1298C polymorphism with the risk of pregnancy loss: A study of an Indian population and a meta-analysis", *Fertility and Sterility*, **99**(5), pp.1311-1318, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.027.
- [12] S. Klai, N.F. Mrissa, S.E. Housaini, et al. (2011), "Association of *MTHFR* A1298C polymorphism (but not of *MTHFR* C677T) with elevated homocysteine levels and placental vasculopathies", *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, **22**(5), pp.374-378, DOI: 10.1097/MB.0b013e328344f80f.
- [13] N. Mtraoui, W. Zammiti, L. Ghazouani, et al. (2006), "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses", *Reproduction*, **131**(2), pp.395-401, DOI: 10.1530/rep.1.00815.
- [14] M. Hohlagschwandtner, G. Unfried, G. Heinze, et al. (2003), "Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage", *Fertility and Sterility*, **79**(5), pp.1141-1148, DOI: 10.1016/s0015-0282(02)04958-0.
- [15] L. Luo, Y. Chen, L. Wang, et al. (2015), "Polymorphisms of genes involved in the folate metabolic pathway impact the occurrence of unexplained recurrent pregnancy loss", *Reproductive Sciences*, **22**(7), pp.845-851, DOI: 10.1177/1933719114565033.
- [16] Y. Yang, Y. Luo, J. Yuan, et al. (2016), "Association between maternal, fetal and paternal *MTHFR* gene C677T and A1298C polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: A comprehensive evaluation", *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **293**(6), pp.1197-1211, DOI: 10.1007/s00404-015-3944-2.

Tỷ lệ đột biến vùng promoter gen *TERT* trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

Lê Văn Thu^{1,2}, Hồ Cẩm Tú¹, Nguyễn Quý Linh¹, Lê Thị Phương¹,
Trần Văn Khánh¹, Nguyễn Xuân Hậu³, Tạ Thành Văn¹, Nguyễn Thu Thúy^{1*}

¹Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương, 1 Vũ Hưu, phường Thanh Trung, TP Hải Dương, tỉnh Hải Dương, Việt Nam

³Bộ môn Ung thư, Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 27/5/2021; ngày chuyển phản biện 31/5/2021; ngày nhận phản biện 21/6/2021; ngày chấp nhận đăng 25/6/2021

Tóm tắt:

Gen telomerase reverse transcriptase (*TERT*) mã hóa cho tiểu đơn vị xúc tác của telomase, là enzyme thiết yếu cho sự kéo dài telomere tại đầu mút nhiễm sắc thể. Mức độ biểu hiện của *TERT* tương quan cao với nguy cơ nhiều loại ung thư ở người. Đột biến phát sinh trên vùng promoter gen *TERT* ở tế bào soma được xác định là một cơ chế để kích hoạt telomerase trong ung thư. Nghiên cứu này nhằm mục đích xác định tỷ lệ đột biến vùng promoter gen *TERT* trên mẫu mô ung thư biểu mô tế bào gan và mối liên quan giữa những đột biến này với một số yếu tố nguy cơ ung thư gan. Nghiên cứu được tiến hành trên 84 bệnh nhân được chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan bằng giải phẫu bệnh. Kỹ thuật giải trình tự gen được sử dụng để xác định đột biến *TERT*. Kết quả phát hiện được 21 mẫu có đột biến -124C>T, chiếm tỷ lệ 25% và không phát hiện được đột biến tại vị trí -146C>T. Đồng thời, chưa thấy được mối liên quan giữa đột biến -124C>T và các yếu tố nguy cơ của ung thư gan.

Từ khóa: đột biến promoter, gen *TERT*, ung thư biểu mô tế bào gan.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular carcinoma - HCC) là một khối u ác tính phát sinh từ tế bào gan, tế bào nhu mô gan và là dạng phổ biến nhất trong ung thư gan nguyên phát. Tại Việt Nam, ung thư gan là bệnh ung thư phổ biến nhất ở nam (20.256 ca mắc mới, chiếm 20,5%) và thứ 5 ở nữ (6.162 ca mắc mới, chiếm 7,4%). Tỷ lệ mắc mới HCC là 14,5% và tỷ lệ tử vong là 20,6%, cao nhất trong các loại ung thư [1]. Dựa trên số ca bệnh mới và số ca tử vong, chúng ta có thể thấy hầu hết bệnh nhân ung thư gan chỉ phát hiện ung thư khi bệnh đã ở giai đoạn cuối, dẫn đến thời gian sống sót thấp hơn 1 năm, tỷ lệ tử vong cao.

Gen *TERT* mã hóa cho tiểu đơn vị xúc tác của telomase, là enzyme thiết yếu cho sự kéo dài telomere tại đầu mút nhiễm sắc thể. Gen *TERT* nằm trên nhiễm sắc thể 5p15.33, gồm 16 exon và 15 intron, kéo dài khoảng 40 kb [2]. Promoter của gen được coi là yếu tố điều hòa quan trọng nhất cho sự biểu hiện của telomase. Mức độ biểu hiện của *TERT* tương quan cao với nguy cơ mắc nhiều loại ung thư ở người. Đột biến ở vùng promoter gen *TERT* được xác định là một cơ chế để kích hoạt telomerase trong ung thư. Tế bào khối u có đột biến vùng promoter của gen *TERT* có telomerase dài hơn so với của tế bào không mang đột biến này [3]. Sự thay đổi nucleotide cytosine sang thymine tại vị trí -124 bp và -146 bp trong vùng promoter gen *TERT* được xác định là 2 đột biến “hotspot” đặc hiệu ung thư [4, 5]. Các đột biến phát sinh vùng promoter gen *TERT* này được cho rằng có vai trò điều hòa tăng cường sự phiên mã của

TERT dẫn đến tăng biểu hiện telomerase bằng cách tạo ra các vị trí liên kết với ETS (E-twenty six) [5] và các yếu tố phiên mã như EST1/2, GABP và P52 (NFκB2) [6].

Gần đây, một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ lớn các đột biến vùng promoter gen *TERT* có vai trò trong sự hình thành khối u gan và được phát hiện trong HCC giai đoạn sớm, có thể là một yếu tố tiên lượng HCC quan trọng [7-9]. Do đó, việc xác định đột biến vùng promoter gen *TERT* có ý nghĩa trong chẩn đoán sớm, cung cấp điều trị chính xác cho bệnh nhân HCC. Đến nay, cũng có một số nghiên cứu được tiến hành để làm rõ vai trò, mối liên quan của các gen với HCC ở Việt Nam nhưng nghiên cứu về đột biến gen *TERT* vẫn còn hạn chế. Vì vậy nhóm tác giả thực hiện đề tài “Xác định đột biến vùng promoter gen *TERT* trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan” nhằm mục đích xác định tỷ lệ đột biến -124C>T và -146C>T gen *TERT* trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan và bước đầu đánh giá mối liên quan giữa các đột biến này với một số yếu tố nguy cơ gây ung thư biểu mô tế bào gan ở Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

84 bệnh nhân được chẩn đoán xác định là ung thư biểu mô tế bào gan bằng giải phẫu bệnh tại Bệnh viện K (cơ sở Tân Triều), có block nên và hồ sơ bệnh án đầy đủ thông tin các biến nghiên cứu cần thu thập.

Cắt 3-5 lát mẫu mô ung thư của các bệnh nhân từ các block nên đã có, đảm bảo lát cắt có tế bào ung thư.

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

Frequency of *TERT* promoter mutations in hepatocellular carcinoma

Van Thu Le^{1,2}, Cam Tu Ho¹, Quy Linh Nguyen¹,
Thi Phuong Le¹, Van Khanh Tran¹, Xuan Hau Nguyen³,
Thanh Van Ta¹, Thu Thuy Nguyen^{1*}

¹Center for Gene and Protein Research, Hanoi Medical University,

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

²Haiduong Medical Technical University,

1 Vu Huu Street, Thanh Trung Ward, Hai Duong City, Hai Duong Province, Vietnam

³Oncology Department, Hanoi Medical University,

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

Received 27 May 2021; revised 21 June 2021; accepted 25 June 2021

Abstract:

The *TERT* gene encodes its catalytic subunit that is essential for telomere length at the chromosome ends. The expression of *TERT* is highly associated with the risk of human cancers. Recurrent mutations in the promoter of the *TERT* gene are identified as a mechanism to activate telomerase in cancer. This study aims to determine the rate of *TERT* promoter mutations in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue samples and the association between the *TERT* promoter mutations and some risk factors of HCC. The study was conducted on 84 patients diagnosed with HCC by pathological surgery. Gene sequencing technique was used to identify *TERT* promoter mutations. Results exhibited 21 samples (25%) carried *TERT* promoter mutation at -124C>T site and no mutation at -146C>T site. At the same time, there was no association between -124C>T mutation and risks of HCC found in this study.

Keywords: hepatocellular carcinoma, promoter mutation, *TERT* gene.

Classification number: 3.2

2.2. Phương pháp

- Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ các mảnh mô đã vùi parafin bằng kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang.

- Kỹ thuật PCR: đoạn gen vùng promoter của gen *TERT* được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu có trình tự như sau: *TERTF*-5'-AGTGGATTCGCGGGACACAGA-3', *TERTR*-5'-ACGCCATGTAACTATTACT-3'. Thành phần phản ứng PCR gồm: 1,8 µl H₂O, 5 µl 2X Hotaq master mix, 0,35 µl mỗi mồi *TERTF* và *TERTR* (5 pmol/µl), 0,5 µl DMSO và 2 µl DNA

cho đủ 10 µl. Chu kỳ nhiệt phản ứng: 93°C/4 phút, [93°C/30 giây, 59°C/30 giây, 72°C/30 giây] x 40 chu kỳ, 72°C/7 phút. Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 2%, 110V/15 phút, nhuộm Ethidiumbromide và chụp ảnh bằng máy EC3 Imaging System.

- Thành phần của phản ứng PCR sequencing gồm: 5,5 µl H₂O, 2,0 µl BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer, 1,0 µl BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, 0,5 µl mỗi *TERTF* (5 pmol/µl), 1,0 µl sản phẩm PCR. Chu kỳ nhiệt phản ứng: 96°C/1 phút, [96°C/10 giây, 50°C/5 giây, 60°C/4 phút] x 25 chu kỳ. Sản phẩm PCR-sequencing được tinh sạch bằng Bigdye XTerminator™ Purification Kit và tiến hành giải trình tự gen trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench 6.0.1.

- Số liệu được phân tích bằng phần mềm phân tích thống kê SPSS 20.0. Mỗi liên quan của đột biến vùng promoter gen *TERT* với một số yếu tố nguy cơ của ung thư biểu mô tế bào gan được đánh giá bằng hồi quy logistic đa biến để tính tỷ lệ chênh (OR) với khoảng tin cậy 95% (CI). Nếu giá trị p<0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê.

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài đã được Hội đồng Đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội chấp thuận theo Quyết định số 109/GCN-HĐĐĐNCYSH-ĐHYHN. Mọi thông tin của cá nhân được mã hóa và giữ bảo mật an toàn. Thu thập số liệu được tiến hành một cách trung thực, chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

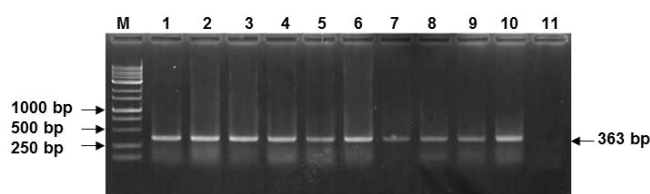
Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm	Số lượng (n=84)	Tỷ lệ (%)
Tuổi	<60	49
	≥60	35
Giới tính	Nam	71
	Nữ	13
	Tỷ lệ nam/nữ	5,46
Nồng độ AFP (ng/ml)	AFP≤20	43
	AFP>20	41
Độ mô học ung thư	I	41
	II	29
	III	14
	IV	0
Yếu tố nguy cơ	Nhiễm HBV	65
	Nhiễm HCV	04
	Xơ gan	16
	Sử dụng rượu bia	34
		40,5

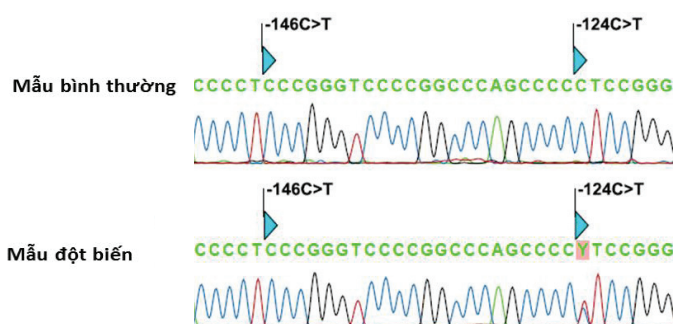
Đặc điểm chung của nhóm đối tượng nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1. Nhóm bệnh nhân HCC có tuổi từ 17 đến 81, trung bình là $55,96 \pm 10,9$. Trong phân bố nhóm tuổi của bệnh nhân HCC, nhóm tuổi <60 là 58,3%, nhóm tuổi ≥ 60 là 41,7%. Phần lớn bệnh nhân HCC trong nghiên cứu là nam, chiếm tỷ lệ 84,5% và nữ chỉ có 15,5%. Chỉ số nồng độ AFP của bệnh nhân HCC được chia làm 2 nhóm: nhóm có $AFP \leq 20$ chiếm tỷ lệ 51,2%, và nhóm $AFP > 20$ chiếm 48,8%. Độ mô học của bệnh nhân HCC chỉ gồm 3 nhóm độ I, II và III. Trong đó, bệnh nhân có độ mô học I chiếm tỷ lệ cao nhất là 48,8%, độ II là 34,5% và độ III có tỷ lệ thấp nhất là 16,7%. Trong các yếu tố nguy cơ, bệnh nhân HCC nhiễm HBV chiếm tỷ lệ cao nhất là 77,4%, có sử dụng rượu bia là 40,5%, bị xơ gan là 19% và nhiễm HCV là 4,8%.

3.2. Tỷ lệ đột biến vùng promoter gen *TERT* trên bệnh HCC

Để xác định đột biến tại vị trí -124C>T và -146C>T, nhóm tác giả sử dụng cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại đoạn gen chứa 2 vị trí đột biến này trên promoter của gen *TERT*. Sản phẩm khuếch đại có kích thước 363 bp, đặc hiệu, rõ nét (hình 1) được sử dụng để giải trình tự gen xác định đột biến.



Hình 1. Hình ảnh sản phẩm khuếch đại vùng promoter gen *TERT* trên mẫu ung thư biểu mô tế bào gan. M: marker DNA 1 kb; 1-10: sản phẩm khuếch đại đoạn gen *TERT* của một số mẫu mô HCC; 11: chứng âm.



Hình 2. Kết quả giải trình tự xác định đột biến -124C>T và -146C>T.

Để xác định các vị trí đột biến, trình tự gen của các mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự gen *TERT* (NG_009265) trên GenBank bằng phần mềm CLC Main Workbench 6.0.1. Hình ảnh giải trình tự xác định đột biến -124C>T và -146C>T của các mẫu ung thư biểu mô tế bào gan được thể hiện ở hình 2. Ở mẫu bình thường, tại vị trí -124 và -146 chỉ có 1 đỉnh nucleotide C. Ở mẫu có đột

biến, tại vị trí -124 gồm 2 đỉnh nucleotide C và T. Kết quả phân tích đã phát hiện được 21 bệnh nhân chỉ có đột biến -124C>T (chiếm tỷ lệ 25%), 63 bệnh nhân không có đột biến -124C>T và -146C>T (chiếm tỷ lệ 75%) (bảng 2).

Bảng 2. Tỷ lệ đột biến vùng promoter gen *TERT*.

Đột biến vùng promoter gen <i>TERT</i>	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Đột biến		
-146C>T	0	0
-124C>T	21	25
Không đột biến	63	75
Tổng	84	100

3.3. Mối liên quan giữa đột biến -124C>T của promoter gen *TERT* và một số đặc điểm, yếu tố nguy cơ của ung thư biểu mô tế bào gan

Mối liên quan giữa đột biến -124C>T và một số đặc điểm của nhóm đối tượng nghiên cứu được thể hiện ở bảng 3. Tỷ lệ đột biến ở nhóm ≥ 60 tuổi là 28,6% và nhóm <60 tuổi là 22,4%, sự khác nhau này giữa 2 nhóm không có ý nghĩa thống kê với $p=0,612$. Nhóm bệnh nhân HCC nam có tỷ lệ đột biến -124C>T (28,2%) cao hơn so với nhóm bệnh nhân HCC nữ (7,7%), nhưng cũng không có mối liên quan giữa đột biến -124C>T và đặc điểm giới tính của mẫu nghiên cứu ($p=0,169$). Nhóm HCC có nồng độ AFP huyết thanh ≤ 20 ng/ml xuất hiện đột biến -124C>T nhiều hơn nhóm HCC có nồng độ AFP > 20 ng/ml, với tỷ lệ lần lượt là 28 và 22%. Sự chênh lệch này không có ý nghĩa thống kê ($p=0,566$) nên chưa thấy được mối liên quan giữa đột biến promoter gen *TERT* và chỉ số AFP ở bệnh nhân HCC.

Bảng 3. Mối liên quan giữa đột biến -124C>T và đặc điểm của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm		Đột biến -124C>T		Không đột biến		OR (95%CI)	p
		n	%	n	%		
Tuổi	<60	11	22,4	38	77,6	1,38 (0,51-3,73)	$p=0,612$
	≥ 60	10	28,6	25	71,4		
Giới tính	Nam	20	28,2	51	71,8	4,71 (0,27-38,6)	$p=0,169$
	Nữ	1	7,7	12	92,3		
Nồng độ AFP (ng/ml)	AFP ≤ 20	12	28	31	72	1,38 (0,51-3,72)	$p=0,566$
	AFP > 20	09	22	32	78		
Độ mô học ung thư	I	7	17	34	83	1	$p=0,239$
	II	10	34,4	19	65,6	0,39 (0,13-1,2)	
	III	4	28,6	10	71,4	0,51 (0,12-2,12)	

Tỷ lệ đột biến của các nhóm ung thư có độ mô học I, II, III tương ứng là 17, 34,4 và 28,6%. Khi so sánh tỷ lệ đột biến giữa các nhóm này, không tìm thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa đột biến -124C>T và độ mô học ung thư ở nhóm bệnh nhân nghiên cứu ($p=0,239$).

Nghiên cứu cũng đánh giá mối liên quan giữa đột biến -124C>T với một số yếu tố nguy cơ của ung thư biểu mô tế bào gan (bảng 4). So sánh tỷ lệ đột biến -124C>T giữa nhóm mẫu HCC nhiễm HBV (23,1%) và nhóm mẫu HCC không nhiễm HBV (31,6%), không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,548$). Tương tự, tỷ lệ đột biến -124C>T giữa nhóm mẫu HCC nhiễm HCV và HCC không nhiễm HCV đều là 25%, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=1,0$).

Bảng 4. Mối liên quan giữa đột biến -124C>T và một số yếu tố nguy cơ của HCC.

Yếu tố nguy cơ		Đột biến -124C>T		Không đột biến		OR (95%CI)	p
		n	%	n	%		
Nhiễm HBV	Có	15	23,1	50	76,9	0,65 (0,21-2)	$p=0,548$
	Không	06	31,6	13	68,4		
Nhiễm HCV	Có	01	25	03	75	1 (0,1-10,17)	$p=1,0$
	Không	20	25	60	75		
Xơ gan	Có	05	29,5	12	70,5	1,33 (0,41-4,34)	$p=0,532$
	Không	16	23,9	51	76,1		
Sử dụng rượu bia	Có	09	26,5	12	73,5	1,14 (0,42-3,1)	$p=0,797$
	Không	25	24	38	76		

Sự phân bố đột biến -124C>T trong nhóm HCC có xơ gan có tỷ lệ là 29,5%, không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm HCC không mắc xơ gan có tỷ lệ là 23,9% ($p=0,532$). Khi so sánh tỷ lệ đột biến -124C>T giữa nhóm bệnh nhân HCC có sử dụng rượu bia (26,5%) và nhóm HCC không sử dụng rượu bia (24%) cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,797$).

Như vậy, trong nghiên cứu này, không tìm thấy mối liên quan giữa tỷ lệ đột biến -124C>T và tình trạng nhiễm HBV, nhiễm HCV, mắc xơ gan và sử dụng rượu bia ở nhóm bệnh nhân HCC.

4. Bàn luận

Đột biến vùng promoter gen *TERT* trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan chủ yếu tại 2 vị trí -146C>T và -124C>T. Nghiên cứu trên 84 bệnh nhân HCC chỉ phát hiện được đột biến -124C>T, không phát hiện được đột biến -146C>T, tương đồng với nghiên cứu của F. Pezzuto và cs (2017) [10]. Trong nghiên cứu của H.W. Lee và cs (2017) [11], có sự khác biệt về tỷ lệ đột biến tại 2 vị trí -146C>T và -124C>T, lần lượt là 30,4 và 69,6%. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ đột biến -124C>T là 25% và tỷ lệ không có đột biến là 75%. Tỷ lệ này cũng gần tương đồng với kết quả nghiên cứu của H.W. Lee và cs (2017) [11] trên 160 bệnh nhân HCC người Hàn Quốc với tỷ lệ đột biến lên tới 28,8%, không đột biến là 71,2%; nghiên cứu của X. Yang và cs (2016) [9] trên 276 bệnh nhân HCC người Trung Quốc có tỷ lệ đột biến vùng promoter gen *TERT* là 30,8% và không có đột biến là 69,2%. Tuy nhiên, tình trạng đột biến vùng promoter gen *TERT* trên bệnh nhân trong nghiên cứu này khá thấp so với

tỷ lệ đột biến -124C>T ở các nước Nhật (50,3%) [12], Italia (41,8%) [13], Hoa Kỳ (44%) và Pháp (59%) [14]. Sự khác biệt này có thể do sự khác biệt về vùng địa lý, gen, lối sống và các tác động ngoại cảnh.

Ở Việt Nam, HCC hay gặp ở độ tuổi từ 19 đến 89 [15], cũng phù hợp với độ tuổi của bệnh nhân HCC trong nghiên cứu này. Tuổi trung bình của nhóm đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi là $55,96 \pm 10,9$, tương đồng với độ tuổi trung bình của bệnh nhân HCC là 58 ($56,5 \pm 11,2$) trong nghiên cứu của X. Yang và cs (2016) [9] và 57 ± 10 theo nghiên cứu của tác giả J.A. Marrero và cs (2005) [16]. Nhóm nghiên cứu không tìm thấy mối liên quan giữa tỷ lệ đột biến và tuổi bệnh nhân, khác với kết quả nghiên cứu của nhóm X. Yang và cs (2016) [9] trên 276 bệnh nhân, tỷ lệ đột biến cao hơn ở nhóm ≥ 60 (36,8%) so với nhóm < 60 tuổi (25,9%), với $p=0,04$. Sự khác biệt này có thể do cỡ mẫu của nghiên cứu chưa đủ lớn.

Trong nghiên cứu của nhóm tác giả, tỷ lệ bệnh nhân mắc HCC có đột biến vùng promoter gen *TERT* ở nam cao hơn ở nữ, nhưng chưa có sự tương quan giữa đột biến với giới tính, cũng tương đồng với nghiên cứu của X. Yang và cs (2016) [9]. Ngược lại, tỷ lệ đột biến này có tương quan với giới tính nam ($p=0,027$) trong nghiên cứu của H.W. Lee và cs (2017) [11]. Nguyên nhân nam giới mắc bệnh nhiều hơn nữ giới có thể do một số yếu tố nguy cơ gây bệnh như: tần suất mắc viêm gan virus B, C là khác nhau, hay thói quen sử dụng rượu, thuốc lá... khác nhau.

Chỉ số AFP huyết thanh là một marker ung thư của HCC. Nồng độ AFP thấp (< 20 ng/ml) ở bệnh nhân HCC được xác định có tương quan với đột biến promoter gen *TERT* [9, 14], nhưng mối liên quan này không có ở bệnh nhân HCC trong nghiên cứu của chúng tôi. Đột biến *TERT* thường xuất hiện ở giai đoạn sớm của quá trình ung thư. Đột biến -124C>T được phát hiện với tỷ lệ cao ở nhóm bệnh nhân HCC có độ mô học II trong nghiên cứu này, cũng như một số nghiên cứu khác nhưng không có sự tương quan giữa đột biến và độ mô học ung thư [9, 10].

Nhiễm virus viêm gan B là yếu tố nguy cơ chiếm tỷ lệ cao nhất trong số các yếu tố nguy cơ của HCC. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh nhân HCC nhiễm HBV là 77,4 và 23,1% số bệnh nhân này có đột biến -124C>T, còn tỷ lệ đột biến ở bệnh nhân HCC không nhiễm HBV là 31,6%. Kết quả này cũng tương đồng với tỷ lệ đột biến ở nhóm HCC nhiễm HBV và không nhiễm HBV lần lượt là 28,3 và 31,6% ở nghiên cứu của X. Yang và cs (2016) [9] hay 26 và 39% ở nghiên cứu của D. Cevik và cs (2015) [8]. Các nghiên cứu của nhóm X. Yang và cs (2016) [9], D. Cevik và cs (2015) [8] đều không tìm thấy mối liên quan giữa yếu tố nguy cơ HBV và tỷ lệ đột biến promoter gen *TERT* giống như kết quả nghiên cứu HCV là nguyên nhân chủ yếu gây nên ung thư biểu mô tế bào gan sau HBV mạn tính. Tuy nhiên, tỷ lệ HCC nhiễm HCV trong nghiên cứu

của chúng tôi thấp (4,8%) và trên cỡ mẫu nhỏ nên không thấy được mối liên quan giữa nhiễm HCV và tình trạng đột biến vùng promoter gen *TERT*. Tỷ lệ đột biến vùng promoter *TERT* khoảng 30-40% đối với HCC liên quan đến HBV và 60-80% đối với HCC liên quan đến HCV [17]. Đột biến promoter *TERT* có thể xuất hiện trong ung thư gan giai đoạn sớm trong điều kiện xơ gan dẫn đến biến đổi ác tính. Do đó, đột biến promoter *TERT* có thể là dấu ấn cho nguy cơ cao của biến đổi ác tính trong mô xơ gan [17]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, tỷ lệ đột biến ở bệnh nhân HCC mắc xơ gan là 29,5% và bệnh nhân HCC không xơ gan là 23,9%, nhưng sự khác biệt là không có ý nghĩa thống kê ($p=0,532$). Trong nghiên cứu của X. Yang và cs (2016) [9], tỷ lệ đột biến vùng promoter gen *TERT* ở nhóm bệnh nhân mắc xơ gan (42,3%) cao hơn nhóm bệnh nhân không mắc xơ gan (31,8%), nhưng cũng không có mối liên quan giữa tình trạng đột biến và nguy cơ xơ gan.

Rượu, bia không phải là yếu tố trực tiếp gây HCC nhưng nó thúc đẩy quá trình viêm gan, xơ gan dẫn đến HCC. Theo nghiên cứu của chúng tôi, có tới 40% bệnh nhân HCC có sử dụng rượu bia, tỷ lệ đột biến -124C>T ở nhóm HCC sử dụng rượu bia là 26,5% và chưa thấy có mối liên quan giữa tình trạng sử dụng rượu bia và tỷ lệ đột biến ($p=0,797$).

Như vậy, nghiên cứu này chưa phát hiện được mối liên quan giữa tình trạng đột biến vùng promoter gen *TERT* và các yếu tố nguy cơ trên bệnh nhân HCC như nhiễm virus HBV, HCV, xơ gan và sử dụng rượu bia.

5. Kết luận

Nhóm nghiên cứu phát hiện được đột biến tại vị trí -124C>T với tỷ lệ 25%, không phát hiện được đột biến tại vị trí -146C>T của vùng promoter gen *TERT* trên 84 bệnh nhân HCC. Chưa tìm thấy mối liên quan giữa đột biến -124C>T vùng promoter gen *TERT* với các yếu tố nguy cơ gây ung thư biểu mô tế bào gan như nhiễm virus viêm gan B, nhiễm virus viêm gan C, xơ gan và sử dụng rượu bia. Để có đánh giá chính xác hơn, nghiên cứu nên tiếp tục được tiến hành trên cỡ mẫu lớn hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài mã số 108.02-2019.307, thuộc Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED). Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Quỹ và Bệnh viện K đã cung cấp mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Cancel Today, *Factsheets*, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/704-viet-namfactsheets.pdf>, accessed 15 January 2021.
- [2] Y. Cong, J. Wen, S. Bacchetti (1999), "The human telomerase catalytic subunit *hTERT*: Organization of the gene and characterization of the promoter", *Human Molecular Genetics*, **8**(1), pp.137-142, DOI: 10.1093/hmg/8.1.137.

- [3] B. Heidenreich, P.S. Rachakonda, I. Hosen, et al. (2015), "*TERT* promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences", *Oncotarget*, **6**(12), pp.10617- 10633, DOI: 10.18632/oncotarget.3329.
- [4] B. Vogelstein, K.W. Kinzler (2004), "Cancer genes and the pathways they control", *Nature Medicine*, **10**(8), pp.789-799, DOI: 10.1038/nm1087.
- [5] S. Horn, A. Figl, P.S. Rachakonda, et al. (2013), "*TERT* promoter mutations in familial and sporadic melanoma", *Science*, **339**(6122), pp.959-961, DOI: 10.1126/science.1230062.
- [6] F.W. Huang, E. Hodis, M.J. Xu, et al. (2013), "Highly recurrent *TERT* promoter mutations in human melanoma", *Science*, **339**(6122), pp.957-959, DOI: 10.1126/science.1229259.
- [7] C.K. Park, S.H. Lee, J.Y. Kim, et al. (2014), "Expression level of *TERT* is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma", *Oncotarget*, **5**(10), pp.3399-3407, DOI: 10.18632/oncotarget.1975.
- [8] D. Cevik, G. Yildiz, M. Ozturk (2015), "Common telomerase reverse transcriptase promoter mutations in hepatocellular carcinomas from different geographical locations", *World Journal of Gastroenterology*, **21**(1), pp.311-317, DOI: 10.3748/wjg.v21.i1.311.
- [9] X. Yang, X. Guo, Y. Chen, et al. (2016), "Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma", *Oncotarget*, **7**(19), pp.27838-27847, DOI: 10.18632/oncotarget.8539.
- [10] F. Pezzuto, L. Buonaguro, F.M. Buonaguro, et al. (2017), "Frequency and geographic distribution of *TERT* promoter mutations in primary hepatocellular carcinoma", *Infectious Agents and Cancer*, **12**(27), DOI: 10.1186/s13027-017-0138-5.
- [11] H.W. Lee, T.I. Park, S.Y. Jang, et al. (2017), "Clinicopathological characteristics of *TERT* promoter mutation and telomere length in hepatocellular carcinoma", *Medicine (Baltimore)*, **96**(5), DOI: 10.1097/MD.0000000000005766.
- [12] Y. Totoki, K. Tatsuno, K.R. Covington, et al. (2014), "Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes", *Nature Genetics*, **46**(12), pp.1267-1273, DOI: 10.1038/ng.3126.
- [13] D. Lombardo, C. Saita, D. Giosa, et al. (2020), "Frequency of somatic mutations in *TERT* promoter, TP53 and CTNNB1 genes in patients with hepatocellular carcinoma from Southern Italy", *Oncol. Lett.*, **19**(3), pp.2368-2374, DOI: 10.3892/ol.2020.11332.
- [14] J.C. Nault, M. Mallet, C. Pilati, et al. (2013), "High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions", *Nat. Commun.*, **4**(22), DOI: 10.1038/ncomms3218.
- [15] V.Q. Le, V.H. Nguyen, V.H. Nguyen, et al. (2019), "Epidemiological characteristics of advanced hepatocellular carcinoma in the northern region of Vietnam", *Cancer Control*, **26**(1), DOI: 10.1177/1073274819862793.
- [16] J.A. Marrero, R.J. Fontana, A. Barrat, et al. (2005), "Prognosis of hepatocellular carcinoma: Comparison of 7 staging systems in an American cohort", *Hepatology*, **41**(4), pp.707-716, DOI: 10.1002/hep.20636.
- [17] J.C. Nault, J. Calderaro, L.D. Tommaso, et al. (2014), "Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis", *Hepatology*, **60**(6), pp.1983-1992, DOI: 10.1002/hep.27372.

Nhận xét kết quả hóa trị bổ trợ phác đồ 4AC-4T kết hợp Anastrozole cho bệnh nhân ung thư vú ER dương tính/Her2 âm tính giai đoạn II-III

Trịnh Lê Huy^{1*}, Thân Văn Thịnh²

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

²Bệnh viện Ung bướu Hà Nội, 42A Thanh Nhân, phường Thanh Nhân, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 9/8/2021; ngày chuyển phản biện 11/8/2021; ngày nhận phản biện 30/8/2021; ngày chấp nhận đăng 3/9/2021

Tóm tắt:

Hóa trị phác đồ 4AC-4T (Anthracycline-Cyclophosphamide/Taxane) và thuốc nội tiết Anastrozole được cho là có vai trò quan trọng trong điều trị bổ trợ bệnh ung thư vú (UTV) có thụ thể Estrogen (ER-estrogen receptor) dương tính giai đoạn II-III. Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang, hồi cứu kết hợp tiến cứu trên 95 bệnh nhân (BN) UTV có thụ thể Estrogen dương tính và thụ thể Her2 âm tính giai đoạn II-III được điều trị tại Bệnh viện Ung bướu Hà Nội từ tháng 1/2015 đến tháng 1/2020. Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá kết quả điều trị UTV có thụ thể nội tiết dương tính bằng phác đồ hóa chất bổ trợ 4AC-4T kết hợp Anastrozole. Kết quả thu được cho thấy, tỷ lệ sống thêm không bệnh sau năm thứ 1, 2, 3, 4 và 5 lần lượt là 100, 99, 94,1, 88,3 và 88,3%. Sau 2 năm đầu, tỷ lệ sống thêm toàn bộ đạt 100%, sau năm thứ 3 là 98,1%, năm thứ 4 và thứ 5 là 95,9%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian sống thêm không bệnh với yếu tố tình trạng di căn hạch, yếu tố giai đoạn II và III. Qua nghiên cứu có thể kết luận, phác đồ hóa chất 4AC-4T kết hợp Anastrozole áp dụng cho các BN UTV thụ thể nội tiết dương tính trong nghiên cứu này đem lại hiệu quả đáng kể.

Từ khóa: Anastrozole, giai đoạn II-III, Her2 âm tính, thụ thể Estrogen dương tính, ung thư vú, 4AC-4T.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

UTV đứng hàng đầu trong các bệnh ung thư ở phụ nữ và là nguyên nhân thứ hai gây tử vong sau ung thư phổi trên thế giới. Tại Việt Nam, nghiên cứu cho thấy UTV là bệnh có tỷ lệ mắc cao nhất trong các loại ung thư ở nữ giới. Tỷ lệ mắc mới theo tuổi năm 2010 ước tính là 28,1/100.000 phụ nữ [1].

Liệu pháp nội tiết là một trong những phương pháp điều trị UTV bởi có khoảng 70% số trường hợp BN UTV có thụ thể Estrogen dương tính [2]. Hệ thống điều trị nội tiết mới, thuộc nhóm ức chế aromatase (Aromatase inhibitor - AI) giúp cải thiện thời gian sống thêm cho BN [3]. Đã có một số nghiên cứu trong và ngoài nước về việc điều trị Anastrozole (Arimidex) cho BN UTV đã mãn kinh, tuy nhiên chưa có nghiên cứu về việc đánh giá kết quả điều trị sau 5 năm và phân tích một số yếu tố ảnh hưởng tới điều trị trên nhóm điều trị hóa chất phác đồ 4AC-AT. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm đánh giá kết quả điều trị bệnh UTV có thụ thể Estrogen dương tính và Her2 âm tính bằng phác đồ hóa chất bổ trợ 4AC-4T kết hợp Anastrozole.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thời gian và địa điểm

Gồm các BN UTV giai đoạn II-III được điều trị tại Bệnh viện Ung bướu Hà Nội từ tháng 1/2015 đến tháng 1/2020.

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

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Tiêu chuẩn chọn BN nghiên cứu:

- BN UTV giai đoạn II-III theo phân loại của UICC 2002.
- Đã mãn kinh.
- Thụ thể Estrogen dương tính (lớn hơn 10%).
- Thụ thể mô bệnh học là ung thư thể ống xâm nhập. Đã được phẫu thuật cắt tuyến vú triệt căn biến đổi, vét hạch nách (phẫu thuật MRM - Modified radical mastectomy).
- Được điều trị bổ trợ bằng hoá chất phác đồ 4AC-4T đủ chu kỳ và Anastrozole.
- Có đủ hồ sơ bệnh án lưu trữ.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Hồ sơ bệnh án không đầy đủ, thất lạc.
- Mắc ung thư thứ 2 hoặc các bệnh lý cấp tính khác (suy gan, suy thận, tai biến mạch não, nhồi máu cơ tim...).
- Her2 dương tính hoặc xét nghiệm FISH dương tính.
- BN không đạt các tiêu chuẩn trên.

2.3. Cỡ mẫu

Cỡ mẫu được xác định bằng công thức áp dụng cho

Efficacy results of 4AC-4T and Anastrozole adjuvant therapy in stage II-III hormone receptor-positive breast cancer

Le Huy Trinh^{1*}, Van Thinh Than²

¹Department of Oncology, Hanoi Medical University,

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

²Hanoi Oncology Hospital,

42A Thanh Nhan Street, Thanh Nhan Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 9 August 2021; revised 30 August 2021; accepted 3 September 2021

Abstract:

Chemotherapy regimen 4AC-4T (Anthracycline-Cyclophosphamide/Taxane) and Anastrozole are considered to have a significant role in the adjuvant treatment of stage II-III estrogen receptor-positive breast cancer. In this study, the authors used a combination of cross-sectional, retrospective, and prospective study designs on 95 estrogen receptor-positive and Her2 receptor negative stage II-III cancer patients treated at the Hanoi Oncology Hospital from January 1, 2015, to January 1, 2020. The research aims to evaluate the results of treatment of hormone receptor-positive breast cancer with adjuvant chemotherapy regimen 4AC-4T combined with Anastrozole. Results showed that DFS (disease-free survival) rates of 1, 2, 3, 4, and 5 years were 100, 99, 94.1, 88.3, and 88.3%, respectively. OS (overall survival) rates at 2, 3, 4, and 5 years were respectively: 100, 98.1, 95.9, and 95.9%. There was a statistically significant correlation between DFS and lymph node metastasis; between stages II and III. This study exhibited that 4AC-4T and Anastrozole are effective chemotherapeutic regimens for hormone receptor-positive breast cancer.

Keywords: Anastrozole, breast cancer, ER-positive, Her2-negative, stage II-III, 4AC-4T.

Classification number: 3.2

nguyên cứu ngang mô tả với tỷ lệ đáp ứng phác đồ là 0,94 [4], độ chính xác mong muốn là 0,4, 95% khoảng tin cậy.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả hồi cứu có theo dõi dọc.

2.5. Cách thức tiến hành

- Thu thập hồ sơ bệnh án theo mẫu bệnh án.
- Chọn BN đủ tiêu chuẩn vào nghiên cứu.
- Ghi nhận các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng trước khi điều trị.

- BN được điều trị phác đồ 4AC-4T kết hợp Anastrozole.

2.6. Các biến số nghiên cứu

- **Đặc điểm quần thể BN:** tình trạng di căn hạch nách trên bệnh phẩm sau mổ, giai đoạn bệnh sau mổ.

- **Kết quả điều trị:** thời gian sống thêm không bệnh, liên quan giữa thời gian sống thêm không bệnh với các yếu tố: tình trạng di căn hạch nách, giai đoạn bệnh sau mổ. Thời gian sống thêm toàn bộ, mối tương quan giữa thời gian sống thêm toàn bộ và các yếu tố: tình trạng di căn hạch nách, giai đoạn bệnh sau mổ.

2.7. Phân tích số liệu

Phần mềm sử dụng trong nghiên cứu là SPSS 20.0. Các chỉ tiêu nghiên cứu bao gồm: thời gian sống thêm của nhóm BN nghiên cứu; đánh giá khả năng sống thêm với một số yếu tố liên quan.

2.8. Đạo đức nghiên cứu

- Việc tiến hành nghiên cứu có xin phép và được sự đồng ý của Lãnh đạo Bệnh viện Ung bướu Hà Nội.
- Thông tin về tình trạng bệnh và thông tin cá nhân khác của BN được giữ bí mật.
- Các thông tin thu được của BN chỉ nhằm mục đích nghiên cứu.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

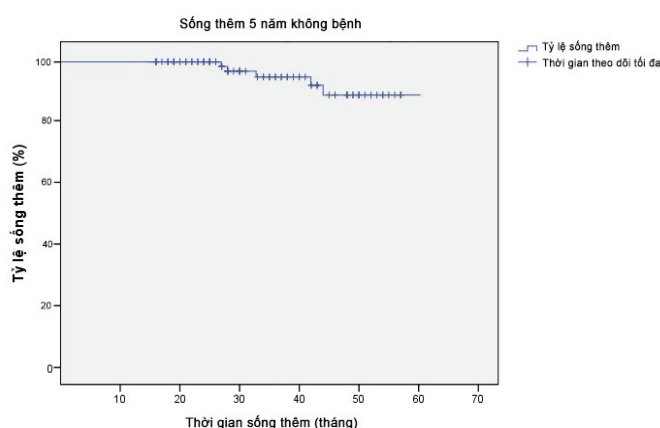
BN có tuổi trung bình là $56,5 \pm 86,18$, trong đó tuổi nhỏ nhất là 46 và cao nhất là 71. Lứa tuổi 51-55 chiếm tỷ lệ cao nhất (34,7%). UTV gặp ở vị trí trên ngoài cao nhất (47,6%), vị trí thấp nhất là dưới trong (7,6%). Đường kính trung bình của u là $2,91 \pm 0,76$ cm. Độ mô học hay gặp nhất là II (chiếm 85,3%). Di căn hạch chiếm chủ yếu với tỷ lệ 72,7%, không di căn hạch chiếm 27,3% (bảng 1).

Bảng 1. Tình trạng di căn hạch nách.

Di căn hạch nách	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
Chưa di căn	26	27,3
Di căn 1-3 hạch	39	41,1
Di căn 4-9 hạch	22	23,2
Di căn ≥ 10 hạch	8	8,4
Tổng	95	100,0

3.2. Đánh giá kết quả điều trị

Tỷ lệ sống thêm không bệnh sau năm thứ 1 là 100%, năm thứ 2 là 99%, năm thứ 3 là 94,1%, năm thứ 4 và 5 là 88,3% (biểu đồ 1). Sau 2 năm đầu, tỷ lệ sống thêm toàn bộ đạt 100%, sau năm thứ 3 là 98,1%, sau năm thứ 4 và 5 là 95,9%.



Biểu đồ 1. Thời gian sống thêm không bệnh của tất cả BN.

Tình trạng di căn hạch nách là yếu tố tiên lượng đối với thời gian sống thêm không bệnh tại thời điểm 5 năm. Nhóm di căn hạch nách có tỷ lệ sống thêm không bệnh tại thời điểm 5 năm là 70,2%, thấp hơn đáng kể so với 96,2% của nhóm không di căn hạch nách. Tỷ lệ này ở BN giai đoạn II (96,3%) cao hơn có ý nghĩa so với giai đoạn III (67,5%) (bảng 2).

Bảng 2. So sánh thời gian sống thêm không bệnh với các yếu tố.

Yếu tố	Tỷ lệ % sống thêm	Số tái phát, di căn	p
Di căn hạch nách			
Có	70,2	5	0,002
Không	96,2	1	
Giai đoạn			
II	96,3	1	0,001
III	67,5	5	

Di căn hạch nách cũng là một yếu tố tiên lượng xấu làm giảm thời gian sống thêm toàn bộ. Nhóm có di căn hạch có tỷ lệ sống thêm là 87,1%, nhóm không di căn hạch có tỷ lệ sống thêm là 100%. Tỷ lệ BN còn sống tại thời điểm 5 năm ở BN giai đoạn II là 100%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với giai đoạn III là 86,2% (bảng 3).

Bảng 3. So sánh thời gian sống thêm toàn bộ với các yếu tố.

Yếu tố	Tỷ lệ % sống thêm	Số lượng tử vong	p
Di căn hạch nách			
Có	87,1	2	0,034
Không	100	0	
Giai đoạn			
II	100	0	0,026
III	86,2	2	

4. Bàn luận

Tuổi trung bình của BN trong nghiên cứu của chúng tôi là 56, các BN đều là những phụ nữ đã mãn kinh với độ tuổi từ 46 đến 71. N.B. Duc (2003) [4] nghiên cứu trên 151 phụ nữ UTV cho thấy, độ tuổi BN trung bình là 48,7. T.V. Thuan

(2005) [5] nghiên cứu trên 346 BN UTV cho thấy độ tuổi người bệnh trung bình là 48,2. Như vậy, độ tuổi trung bình trong nghiên cứu này cao hơn so với các nghiên cứu trước đó.

Thời gian theo dõi BN trung bình trong nghiên cứu này là 35,6 tháng. Phần lớn người bệnh được theo dõi trong 3 năm, một số được theo dõi 4 và 5 năm. Thời gian sống thêm không bệnh của BN tại thời điểm 1, 2, 3, 4 và 5 năm lần lượt là 100, 99, 94,1, 88,3 và 88,3%. Nghiên cứu của N.B. Duc (2003) [4] điều trị hỗ trợ bằng cắt buồng trứng kết hợp với Tamoxifen trên BN UTV còn kinh nguyệt giai đoạn II-III cho thấy, tỷ lệ sống thêm không bệnh tại thời điểm 1, 2, 3 và 4 năm lần lượt là 96,5, 91,2, 80,7 và 75,4%. So sánh với [4], kết quả sống thêm không bệnh trong nghiên cứu của chúng tôi có phần cao hơn bởi tác động của Arimidex so với Tamoxifen trong việc giảm tỷ lệ tái phát cho BN UTV có thụ thể nội tiết dương tính. Nghiên cứu của L. Rydén và cs (2016) [6] một lần nữa cho thấy, Anastrozole mang lại lợi ích so với Tamoxifen đơn trị khi tăng 3% tỷ lệ sống thêm không bệnh tại thời điểm 5 năm (95%CI: 0,83-0,94).

Trong nghiên cứu này, thời gian sống thêm toàn bộ tại thời điểm 1, 2, 3, 4 và 5 năm lần lượt là 100, 100, 98,1, 95,9 và 95,9%. Có thể nói, kết quả thu được từ nghiên cứu của chúng tôi là tương đồng khi so sánh với kết quả của các tác giả khác ở trong nước và thế giới. N.B. Duc (2003) [4] cho thấy, tỷ lệ sống thêm toàn bộ trong các năm 1, 2, 3 và 4 là 100, 98,2, 91,2 và 86%. N. Davidson và cs (1999) [7] nghiên cứu điều trị hỗ trợ cho những phụ nữ UTV ở giai đoạn mô được cho thấy, tỷ lệ BN còn sống sau 5 năm là 67% ở nhóm được hóa trị hỗ trợ phác đồ AC, ở những BN được kết hợp với cắt buồng trứng thì tỷ lệ này tăng lên đến 70%; ở những BN được kết hợp cắt buồng trứng và dùng Tamoxifen thì tỷ lệ này lên tới 78%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có phần cao hơn kết quả [7], bởi lẽ đối tượng nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào các đối tượng thụ thể nội tiết dương tính, Her2 âm tính và đa phần BN chưa di căn hạch hay di căn dưới 3 hạch. Hóa chất nền tảng Anthracyclin đóng vai trò quan trọng trong điều trị hỗ trợ UTV giai đoạn II-III ở hầu hết các thể mô bệnh học, tuy nhiên ở nhóm BN thụ thể nội tiết dương tính, Her2 âm tính cần thêm nhiều nghiên cứu để xác định lợi ích của nhóm Anthracyclin [8].

Tỷ lệ sống thêm không tái phát di căn (không bệnh) sau 5 năm ở nhóm có di căn hạch nách là 70,2%, ở nhóm không di căn hạch nách là 96,2%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,002$). Tỷ lệ sống thêm toàn bộ ở nhóm người bệnh có di căn hạch nách là 87,1%, ở nhóm không di căn hạch nách là 100% ($p=0,034$). Như vậy, một lần nữa nghiên cứu của chúng tôi khẳng định vai trò tiên lượng sống thêm của tình trạng di căn hạch nách trong nhóm BN UTV có thụ thể nội tiết dương tính và Her2 âm tính.

Giai đoạn bệnh cũng là yếu tố tiên lượng quan trọng liên quan tới tỷ lệ sống thêm trong nhóm BN UTV có thụ thể

nội tiết dương tính và Her2 âm tính. Tỷ lệ sống thêm không bệnh tại thời điểm 5 năm đối với BN giai đoạn II là 96,3%, giai đoạn III là 67,5% ($p=0,001$). Tỷ lệ sống thêm toàn bộ tại thời điểm 5 năm đối với giai đoạn II là 100%, giai đoạn III là 86,2%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,026$).

A. Bianco và cs (2001) [9] nghiên cứu điều trị bổ trợ cho các phụ nữ UTV giai đoạn II-III còn kinh nguyệt, có thụ thể nội tiết dương tính bằng kết hợp hóa chất với uống Tamoxifen cũng cho thấy vai trò tiên lượng của giai đoạn bệnh tới thời gian sống thêm không bệnh. Tỷ lệ này sau 3 và 5 năm là 89,4 và 82,5% đối với giai đoạn II. Ở giai đoạn III, tỷ lệ này giảm, có ý nghĩa thống kê, lần lượt là 61,6 và 54,4%.

5. Kết luận

Phác đồ hóa chất 4AC-4T kết hợp Anastrozole là một phác đồ an toàn, đem lại hiệu quả đáng kể cho BN UTV thụ thể nội tiết dương tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.N. Shulman, W. Willett, A. Sievers, et al. (2010), "Breast cancer in developing countries: Opportunities for improved survival", *Journal of Oncology*, **2010**, DOI: 10.1155/2010/595167.
- [2] D.T. Can (2000), "Studying estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma by immunohistochemical staining", *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, **4(4)**, pp.63-66 (in Vietnamese).
- [3] G. Bonadonna, A. Moliterni, M. Zambetti, et al. (2005), "30 years' follow up of randomised studies of adjuvant CMF in operable breast cancer: Cohort study", *BMJ*, **330(7485)**, DOI: 10.1136/bmj.38314.622095.8F.
- [4] N.B. Duc (2003), "Results of adjuvant endocrine therapy in patients with stage II-III premenopausal breast cancer with positive Estrogen receptors", *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, pp.107-112 (in Vietnamese).
- [5] T.V. Thuan (2005), *Evaluating The Results of Adjuvant Chemotherapy with AC Regimen Combined with Endocrine Therapy in Patients with Stage II-III Breast Cancer with Positive Estrogen Receptors*, Doctoral Thesis in Medicine, Hanoi Medical University (in Vietnamese).
- [6] L. Rydén, M.H. Arnlind, S. Vitols, et al. (2016), "Aromatase inhibitors alone or sequentially combined with Tamoxifen in postmenopausal early breast cancer compared with Tamoxifen or placebo-meta-analyses on efficacy and adverse events based on randomized clinical trials", *The Breast*, **26**, pp.106-114, DOI: 10.1016/j.breast.2016.01.006.
- [7] N.E. Davidson, A.M. O'Neill, A.M. Vukov, et al. (1999), "Effect of chemohormonal therapy in premenopausal, node (+), receptor (+) breast cancer: An eastern cooperative oncology group phase III intergroup trial (E5188, INT- 0101)", *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **18(3)**, pp.122-130.
- [8] J. Henderson, P. Adams, K. Barber (2019), "Factors determining Anthracycline use in hormone receptor positive, early-stage breast cancer", *Clinical Breast Cancer*, **19(3)**, pp.e475-e480, DOI: 10.1016/j.clbc.2019.01.012.
- [9] R. Sharma, A. Hamilton, J. Beith (2001), "Systematic review of luteinising hormone-releasing hormone agonists in adjuvant therapy of early breast cancer", *National Breast Cancer Centre*, 55pp.

Thực trạng sàng lọc bệnh thalassemia và một số yếu tố liên quan ở phụ nữ mang thai đến khám tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương

Nguyễn Thị Huyền Trang¹, Trần Danh Cường², Trần Thơ Nhị¹, Ngô Toàn Anh²,
Vũ Thị Huyền¹, Lê Thị Minh Phương³, Nguyễn Thị Trang^{1*}

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

²Bệnh viện Phụ sản Trung ương, 43 Tràng Thi, phường Hàng Bông, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Dịch Vọng Hậu, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/9/2021; ngày chuyển phản biện 16/9/2021; ngày nhận phản biện 5/10/2021; ngày chấp nhận đăng 8/10/2021

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định thực trạng sàng lọc bệnh tan máu bẩm sinh (thalassemia) và tìm hiểu một số yếu tố liên quan đến sàng lọc căn bệnh này ở phụ nữ mang thai (PNMT) đến khám tại bệnh viện. Đối tượng và phương pháp: sử dụng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang, định lượng kết hợp với định tính. Tổng số mẫu gồm 550 thai phụ đến khám tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương từ tháng 4/2020 đến tháng 3/2021, được sàng lọc bằng xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi, điện di huyết sắc tố và xét nghiệm đột biến gen thalassemia. 17 thai phụ được phỏng vấn để tìm hiểu nhận thức về một số yếu tố liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia. Kết quả: tỷ lệ sàng lọc thalassemia dương tính ở thai phụ là 12,7%. Thể α -thalassemia chiếm tỷ lệ lớn nhất là 67,1%, thể β -thalassemia chiếm tỷ lệ là 12,9%. Bệnh lý huyết sắc tố E và các thể phối hợp khác cũng được phát hiện. Yếu tố nguy cơ chủ yếu ảnh hưởng đến tỷ lệ sàng lọc bệnh thalassemia bao gồm dân tộc, tiền sử sản khoa và tình trạng thiếu máu. Bên cạnh đó, các yếu tố về gia đình và văn hóa, xã hội cũng ảnh hưởng tới quyết định của thai phụ. Hầu hết, PNMT không có hiểu biết về bệnh thalassemia nên họ rất lo lắng cho sức khỏe của thai nhi và những lần sinh con tiếp theo. Kết luận: từ những phát hiện trên cho thấy, nhận thức của PNMT về bệnh thalassemia còn thấp, họ chưa quan tâm đến việc sàng lọc sớm bệnh thalassemia. Vì vậy, cần tuyên truyền nâng cao nhận thức cho thai phụ và gia đình về bệnh thalassemia.

Từ khóa: phụ nữ mang thai, thalassemia, yếu tố liên quan, yếu tố nguy cơ.

Chỉ số phân loại: 3.3

1. Đặt vấn đề

Bệnh thalassemia là một nhóm bệnh rối loạn máu di truyền, đặc trưng bởi sự giảm hoặc ức chế sản xuất và tổng hợp các chuỗi globin của hemoglobin [1]. Nguyên nhân gây bệnh là do đột biến gen quy định tổng hợp chuỗi globin dẫn tới hiện tượng vỡ hồng cầu và gây ra tình trạng thiếu máu ở bệnh nhân. Mức độ phổ biến của bệnh tùy thuộc vào từng quốc gia, từng khu vực. Theo Tổ chức Y tế Thế giới, bệnh huyết sắc tố ảnh hưởng tới 71% số nước trên thế giới. Hàng năm có khoảng 330.000 trẻ sinh ra bị bệnh (trong đó 83% là hồng cầu hình liềm và 17% là bệnh thalassemia) [2]. Đây là bệnh thiếu máu di truyền phổ biến trên thế giới, phân bố khắp toàn cầu nhưng có tính địa dư rõ rệt: tỷ lệ cao ở Địa Trung Hải, Trung Đông, châu Á, Thái Bình Dương [2, 3]. Bệnh có 2 nhóm chính là α -thalassemia và β -thalassemia tùy theo nguyên nhân đột biến ở gen α -globin hay β -globin [3]. Dạng α -thalassaemia nghiêm trọng nhất là hội chứng Hb Bart hydrops thai nhi khi thai chết trong tử cung hoặc

ngay sau khi sinh [4]. Ở người phụ nữ có thai bị phù thai Hb Bart's, nếu có kèm phù rau thai thì mẹ nhiều nguy cơ tiền sản giật và băng huyết sau đẻ [3]. Bệnh β -thalassemia thể nặng do đột biến đồng hợp tử của gen beta-globin, là thể lâm sàng nặng nhất với biểu hiện thiếu máu, tan máu nặng nề kèm theo nhiều biến chứng nghiêm trọng, người bệnh cần phải truyền máu suốt đời [3, 5].

Việt Nam đang là một trong những nước có tỷ lệ mắc bệnh cao trên bản đồ thalassemia thế giới (theo thống kê năm 2020, có khoảng 13% dân số mang gen bệnh) [6]. Năm 2014, Hội Tan máu bẩm sinh Việt Nam (VITA) đã cảnh báo sự bùng nổ thalassemia ở Việt Nam với khoảng 20.000 người bệnh; ước tính mỗi năm có khoảng 2.000 trẻ sinh ra mắc bệnh [7]. Trong một nghiên cứu về khảo sát gánh nặng thiếu máu liên quan đến bệnh thalassemia ở PNMT tại Thừa Thiên - Huế cho thấy, tỷ lệ chung của bệnh là 7,3%. Trong số 77 phụ nữ bị thiếu máu, có 20 phụ nữ (chiếm 26%) có gen thalassemia [8]. Để chăm sóc sức khỏe cho PNMT tốt

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

Status of screening for thalassemia and some related factors among pregnant women visiting the National Hospital of Obstetrics and Gynecology

Thi Huyen Trang Nguyen¹, Danh Cuong Tran²,
Tho Nhi Tran¹, Toan Anh Ngo², Thi Huyen Vu¹,
Thi Minh Phuong Le³, Thi Trang Nguyen^{1*}

¹Hanoi Medical University,

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

²National Hospital of Obstetrics and Gynecology,

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

³University of Medicine and Pharmacy VNU,

144 Xuan Thuy Street, Dich Vong Hau Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 13 September 2021; revised 5 October 2021; accepted 8 October 2021

Abstract:

This study aims to determine the current status of thalassemia and find out some related factors to screening of thalassemia in pregnant women visiting the hospital. **Materials and Methods:** a cross-sectional study, including quantitative and qualitative research. A total of 550 women who visited the hospital from April 2020 to March 2021 were screened by full blood count, hemoglobin electrophoresis, and thalassemia mutation test. In-depth interviews with 17 pregnant women to find out their awareness about some related factors to screening of thalassemia. **Results:** The prevalence of pregnant women screened positive for thalassemia was 12.7%. The α -thalassemia accounted for the largest proportion of 67.1%, the β -thalassemia form accounted for 12.9%. Hemoglobin E and other combinations have also been detected. Risk factors affected screening for thalassemia include ethnicity, obstetric history, and anemia status. Besides, family and socio-cultural factors also affected the decision of pregnant women. Most pregnant women didn't know about thalassemia, so they were very nervous about the health of their fetuses and future births. **Conclusion:** From the above findings, awareness among pregnant women about thalassemia is still low, they do not pay attention to early screening for thalassemia. Therefore, it is necessary to raise awareness for pregnant women and their families about thalassemia disease.

Keywords: pregnant women, related factors, risk factors, thalassemia.

Classification number: 3.3

hơn, giảm tỷ lệ trẻ sinh ra mắc bệnh thalassemia thể nặng thì việc thực hiện chương trình khám sàng lọc, tư vấn di truyền hôn nhân là rất cần thiết. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về thực trạng bệnh thalassemia ở PNMT đến khám sàng lọc và các yếu tố liên quan còn ít. Nhằm góp phần tìm hiểu thêm về vấn đề này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: mô tả thực trạng bệnh thalassemia ở PNMT đến khám sàng lọc tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương và tìm hiểu một số yếu tố liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 550 PNMT đến khám sàng lọc tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương từ tháng 4/2020 đến tháng 3/2021.

Tiêu chuẩn lựa chọn:

- Gia đình có người bị thalassemia: PNMT, chồng, hoặc có con đã được xác định mang gen bệnh thalassemia, hoặc thai phụ có tiền sử sinh con bị phù thai.

- Thai phụ có kết quả xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi cho thấy nguy cơ mắc thalassemia thông qua các chỉ số MCV (≤ 80 fl), MCH (≤ 28 pg), HGB (≤ 110 g/l) có kết quả điện di huyết sắc tố hoặc kết quả xét nghiệm đột biến gen thalassemia.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Thai phụ không đồng ý hoặc từ chối cung cấp thông tin tham gia nghiên cứu.

- Thai phụ có tình trạng mất máu cấp do chấn thương hay bệnh lý: thiếu máu hồng cầu hình liềm, xuất huyết tiêu hóa, các chảy máu bất thường khác...

- Thai phụ mắc bệnh lý mạn tính gây thiếu máu đã được chẩn đoán trước đó hoặc đang có tình trạng viêm nhiễm như loét dạ dày - tá tràng, nhiễm ký sinh trùng (giun móc/mỏ), bệnh hệ thống hay bệnh lý huyết học khác (tan máu tự miễn, u lympho...).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu sử dụng kết hợp phương pháp nghiên cứu định tính và định lượng.

Nghiên cứu định lượng: sử dụng thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang, hồi cứu và tiến cứu các số liệu về kết quả công thức máu, điện di huyết sắc tố và xét nghiệm gen alpha và beta globin.

Nghiên cứu định tính: nghiên cứu định tính được tiến hành dựa trên các cuộc phỏng vấn sâu và quan sát nhằm tìm hiểu nhận thức của PNMT về bệnh thalassemia và một số

yếu tố liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia.

2.3. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

Cỡ mẫu cho nghiên cứu định lượng: cỡ mẫu được xác định dựa trên công thức tính cỡ mẫu cho 1 tỷ lệ như sau:

$$n = \frac{Z^2 \left(1 - \frac{\alpha}{2}\right) \times p(1-p)}{d^2} \quad (1)$$

trong đó: n: cỡ mẫu nghiên cứu; α : mức ý nghĩa thống kê, chọn $\alpha=0,05$ (tương ứng độ tin cậy 95%); $Z_{(1-\frac{\alpha}{2})}=1,96$ tương ứng với $\alpha=0,05$ sau khi tra bảng; $p=0,013$: tỷ lệ PNMT được sàng lọc bệnh thalassemia dương tính tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương theo nghiên cứu của Đặng Thị Hồng Thiện năm 2019 [3]; $d=0,03$ khoảng sai lệch tuyệt đối.

Thay vào công thức (1) tính được cỡ mẫu tối thiểu cho nghiên cứu là 483 đối tượng nghiên cứu. Sau khi cộng với 10% bỏ cuộc thu được cỡ mẫu là $n=483+50=533$ đối tượng. Thực tế, nghiên cứu thu thập được 550 đối tượng.

Nghiên cứu định lượng sử dụng phương pháp chọn mẫu thuận tiện.

Cỡ mẫu cho nghiên cứu định tính: cỡ mẫu cho nghiên cứu định tính là 20 PNMT được chọn mẫu chủ đích từ 550 phụ nữ ở mẫu nghiên cứu định lượng. Tiêu chuẩn để chọn những phụ nữ cho nghiên cứu định tính từ mẫu của nghiên cứu định lượng là những phụ nữ được chẩn đoán và theo dõi mang gen bệnh thalassemia. Nghiên cứu đã tiếp cận được 20 đối tượng, trong đó có 3 đối tượng không đồng ý phỏng vấn sâu do mệt mỏi và buồn chán, do không có thời gian để phỏng vấn. Còn lại 17 thai phụ đồng ý tham gia và hoàn thành cuộc phỏng vấn sâu.

Các biến số và chỉ số nghiên cứu: đặc điểm nhân khẩu học của đối tượng nghiên cứu (tuổi, tuổi thai, địa chỉ, dân tộc), kết quả xét nghiệm (tổng phân tích tế bào máu ngoại vi, điện di huyết sắc tố, xét nghiệm đột biến gen), nhóm biến số về một số yếu tố liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT. Các trường hợp kết quả điện di huyết sắc tố cho thấy, HbH, Hb Bart's có thể chẩn đoán xác định thai phụ mắc hội chứng HbH hay Hb Bart's. Các kết quả khác của điện di huyết sắc tố góp phần định hướng thể bệnh alpha hoặc beta thalassemia cần phải làm xét nghiệm gen.

Tiêu chuẩn đánh giá: thai phụ có kết quả xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi cho thấy nguy cơ mắc thalassemia thông qua các chỉ số MCV (<80 fl), MCH (<28 pg), HGB (<110 g/l) và xét nghiệm sắt huyết thanh, ferritin huyết thanh bình thường, có kết quả điện di huyết sắc tố hoặc kết quả xét nghiệm đột biến gen thalassemia.

Xử lý và phân tích số liệu: số liệu sau khi thu thập được làm sạch và nhập liệu bằng phần mềm Excel 2016. Số liệu

được xử lý và phân tích bằng phần mềm Stata 14.0. Thống kê mô tả được sử dụng để mô tả đặc điểm đối tượng nghiên cứu, tính tỷ lệ % bệnh thalassemia. Thống kê suy luận: sử dụng các test thống kê (Fisher's exact test hoặc test khi bình phương) để kiểm định sự khác biệt và phân tích một số yếu tố liên quan bằng hồi quy đơn biến logistic.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Bảng 1. Một số đặc điểm của đối tượng tham gia nghiên cứu.

Thông tin chung	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Tuổi		
< 25	77	14,0
25-29	149	27,1
30-34	156	28,4
≥ 35	168	30,5
Tuổi thai		
<13 tuần	110	20,0
13-22 tuần	301	54,7
23-28 tuần	89	16,2
29-37 tuần	49	8,9
≥ 38 tuần	1	0,2
Dân tộc		
Kinh	478	86,9
Mường	17	3,1
Tày	22	4,0
Thái	13	2,4
Nùng	8	1,4
Khác	12	2,2
Thiếu máu		
Có	32	5,8
Không	518	94,2

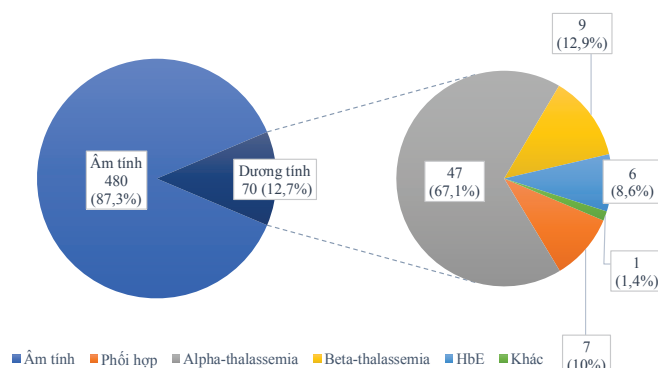
Kết quả bảng 1 cho thấy, nhóm tuổi của PNMT hay gặp nhất là những người từ 35 tuổi trở lên có thai - thuộc nhóm nguy cơ cao theo tuổi mẹ (chiếm tỷ lệ 30,5%). Tuổi thai được làm xét nghiệm nhiều nhất là 13-22 tuần (chiếm 54,7%). Trong 550 phụ nữ có thai được sàng lọc bệnh thalassemia thì người dân tộc Kinh là chủ yếu (chiếm 86,9%), các dân tộc khác như Sán Dìu, Dao, Giáy chiếm tỷ lệ rất ít.

Nghiên cứu định tính gồm 17 phụ nữ có độ tuổi từ 21 đến 38 cho thấy, phần lớn phụ nữ nội trợ ở nhà, làm việc chủ yếu ở nhà máy hoặc là nông dân hay nhân viên hành

chính. Trình độ học vấn của phụ nữ từ trung học cơ sở đến tốt nghiệp cao đẳng/đại học. Có 1 phụ nữ đã được chẩn đoán bệnh thalassemia từ khi còn nhỏ, số còn lại chưa biết về bệnh này.

3.2. Thực trạng bệnh thalassemia ở PNMT

Tỷ lệ sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT:



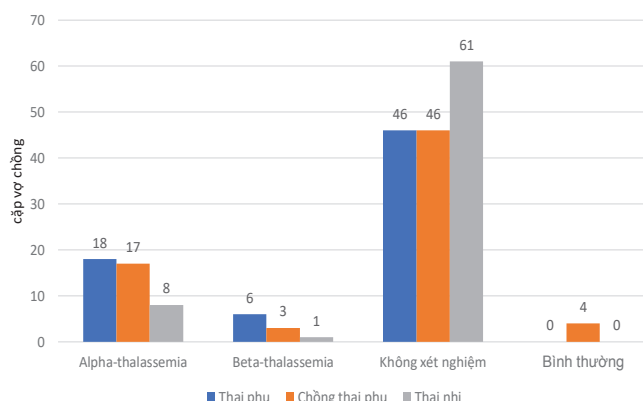
Hình 1. Tỷ lệ sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT.

Theo nghiên cứu của D.T.H. Thien (2019) [3] tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương từ năm 2015 đến 2018: trong 9.516 thai phụ có 1.237 (13%) PNMT có hồng cầu nhỏ, trong đó có 123 PNMT (10% của PNMT có hồng cầu nhỏ) có chồng cũng mang gen thalassemia cùng thể bệnh nên phải chẩn đoán trước sinh. Như vậy, về lý thuyết sẽ còn 1 tỷ lệ (cao hơn 10%) PNMT có mang gen thalassemia và chồng không mang gen thalassemia hoặc mang gen thalassemia không cùng thể bệnh với vợ nên không cần chẩn đoán trước sinh.

Kết quả hình 1 cho thấy, trong tổng số 550 đối tượng nghiên cứu được sàng lọc bệnh thalassemia thì phát hiện được 70 trường hợp dương tính, chiếm tỷ lệ 12,7% [có 59 thai phụ (chiếm 84,3%) biểu hiện thiếu máu hồng cầu nhỏ và nhược sắc qua xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi và 11 thai phụ (chiếm 15,7%) được xét nghiệm mang đột biến gen bệnh thalassemia].

Trong số 70 trường hợp sàng lọc bệnh thalassemia dương tính, có 47 trường hợp thuộc thể α -thalassemia chiếm tỷ lệ lớn nhất là 67,1% (có 36 PNMT được sàng lọc bằng điện di huyết sắc tố theo dõi mang gen α -thalassemia và 11 PNMT đã xét nghiệm đột biến gen được chẩn đoán mang gen bệnh); có 9 trường hợp thuộc thể β -thalassemia chiếm tỷ lệ 12,9% (có 4 PNMT được chẩn đoán mang gen bệnh β -thalassemia và 5 PNMT được sàng lọc theo dõi mang gen β -thalassemia). Bệnh lý huyết sắc tố E chiếm 8,6%, các thể phối hợp gồm HbE kết hợp theo dõi mang gen β -thalassemia và HbE kết hợp mang gen α -thalassemia và β -thalassemia. Có 1 trường hợp mang bệnh lý huyết sắc tố C, chiếm 1,4%.

Kết quả xét nghiệm đột biến gen thalassemia



Hình 2. Kết quả xét nghiệm đột biến gen thalassemia ở nhóm thai phụ và gia đình thai phụ có nguy cơ mắc thalassemia.

Kết quả hình 2 cho thấy, trong số 70 cặp vợ chồng có kết quả sàng lọc nguy cơ mắc bệnh thalassemia của vợ dương tính, chỉ có 24 cặp (chiếm 34,3%) làm xét nghiệm đột biến gen thalassemia. Có 17 cặp vợ chồng (chiếm 24,3%) đều mang gen α -thalassemia, trong số đó có 8 thai nhi được chẩn đoán đột biến gen α -thalassemia (chiếm 47,1%). Có 3 cặp vợ chồng (chiếm 4,3%) đều mang gen β -thalassemia, trong số này có 1 thai nhi được chẩn đoán đột biến gen β -thalassemia (chiếm 33,3%).

3.3. Một số yếu tố liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT

Yếu tố cá nhân

Bảng 2. Một số yếu tố cá nhân liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT.

	Sàng lọc thalassemia (+) n (%)	Sàng lọc thalassemia (-) n (%)	OR (95%CI)
Dân tộc			
Kinh	35 (7,3)	443 (92,7)	1
Khác*	35 (88,2)	37 (11,8)	11,97 (6,73-21,3)
Tiền sử sản khoa			
Chưa có tiền sử	58 (10,9)	474 (89,1)	1
Có tiền sử	12 (66,7)	6 (33,3)	16,34 (5,91-45,20)
Tình trạng thiếu máu			
Không thiếu máu	40 (7,7)	478 (92,3)	1
Có thiếu máu	30 (93,8)	2 (6,2)	179,25 (41,33-777,47)

*: dân tộc Tày, Thái, Mường, Nùng, Dao, Sán Diu, Giáy.

Kết quả phân tích đơn biến ở bảng 2 cho thấy, một số yếu tố cá nhân liên quan đến tỷ lệ sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT bao gồm dân tộc, tiền sử sản khoa và tình trạng

thiếu máu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, những PNMT thuộc các dân tộc Tày, Thái, Mường đến khám sàng lọc thalassemia tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương có khả năng phát hiện nguy cơ cao mắc thalassemia qua sàng lọc cao hơn 11 lần so với PNMT là người dân tộc Kinh. Kết quả này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. PNMT đã từng sinh con mắc bệnh thalassemia được chẩn đoán mang gen bệnh và phù thai có khả năng phát hiện dương tính với thalassemia qua sàng lọc cao gấp 16,34 lần PNMT chưa từng có tiền sử sản khoa liên quan đến bệnh thalassemia. PNMT có biểu hiện thiếu máu có khả năng phát hiện dương tính với thalassemia qua sàng lọc cao gấp 179,25 lần so với những PNMT không có biểu hiện thiếu máu.

Kết quả nghiên cứu định tính cũng cho thấy rằng theo quan điểm của PNMT thì yếu tố dân tộc có ảnh hưởng đến bệnh thalassemia. Sau khi được bác sỹ tư vấn về bệnh thì một số phụ nữ chia sẻ là những dân tộc thiểu số như Mường, Tày... có xác suất mắc bệnh cao hơn so với dân tộc Kinh. Một phụ nữ chia sẻ, sau khi đến khám thì mới biết đến bệnh thalassemia và được bác sỹ giải thích là dân tộc thiểu số thì xác suất bị bệnh này cao hơn.

Đối với trường hợp PNMT đã từng được chẩn đoán mắc bệnh thalassemia từ khi còn nhỏ thì họ cũng có những hiểu biết nhất định về bệnh thalassemia. Bệnh nhân được biết về bệnh qua bác sỹ tư vấn khi đi điều trị tại bệnh viện. Theo quan điểm của họ, yếu tố về dân tộc được cho là có ảnh hưởng nhiều đến bệnh thalassemia.

Yếu tố gia đình: Thalassemia là bệnh di truyền gen lặn trên nhiễm sắc thể thường, do đó việc sàng lọc và xét nghiệm đột biến gen của PNMT và chồng được tiến hành để xác định loại đột biến gen thalassemia, từ đó làm cơ sở để tính nguy cơ mắc bệnh cho thai nhi và có hướng xử trí phù hợp. Những cặp vợ chồng đều mang gen bệnh thì có nguy cơ sinh con mắc bệnh cao hơn so với những cặp vợ chồng chỉ có một người mang gen bệnh thalassemia.

Phụ nữ khi mang thai thực sự rất cần sự quan tâm của chồng và người thân trong gia đình. Và khi được hỏi về thái độ của chồng và người thân thì câu trả lời nhận được từ hầu hết các đối tượng nghiên cứu là được chồng và gia đình quan tâm, ủng hộ và động viên trong việc ra quyết định với bệnh thalassemia này. Tuy nhiên, không phải người phụ nữ nào cũng may mắn được chồng và gia đình quan tâm, ủng hộ quyết định của họ. Một số ít phụ nữ báo cáo rằng họ muốn làm tiếp xét nghiệm chẩn đoán gen bệnh thalassemia để có thể biết về nguy cơ mang gen bệnh khi mang thai lần sau nhưng chồng phản đối nên quyết định không làm nữa.

Yếu tố về cơ sở y tế, văn hóa và xã hội

Ngoài yếu tố cá nhân và gia đình thì yếu tố văn hóa, xã hội cũng ảnh hưởng đến sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT

như là việc cung cấp thông tin về bệnh từ phía cơ sở y tế, tính sẵn có về dịch vụ xét nghiệm sàng lọc và chẩn đoán gen bệnh, phong tục tập quán của các dân tộc.

- Thứ nhất, một số phụ nữ nhận thấy việc cung cấp thông tin về bệnh thalassemia từ các cơ sở y tế là chưa đầy đủ để họ có thể hiểu rõ về bệnh. Sau khi nghe tư vấn về bệnh thalassemia tại cơ sở y tế thì vẫn chưa hiểu rõ và cần các bác sỹ giải thích sâu hơn.

- Thứ hai, tính sẵn có của các xét nghiệm sàng lọc và chẩn đoán gen bệnh thalassemia cũng là yếu tố có ảnh hưởng đến khả năng tiếp cận của PNMT. Một số phụ nữ chia sẻ tại tuyến y tế cơ sở không có đầy đủ trang thiết bị và công nghệ hiện đại để có thể sàng lọc bệnh thalassemia cho PNMT. Chính vì vậy, khi họ đi khám thai thì không được làm các xét nghiệm sàng lọc về bệnh này.

- Thứ ba, có 5/17 phụ nữ cho rằng, phong tục tập quán cũng là một yếu tố có liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia. Theo quan điểm của họ thì phong tục kết hôn cận huyết ở một vài dân tộc thiểu số có thể là nguyên nhân dẫn đến sự trùng gen và di truyền bệnh thalassemia qua các thế hệ. Việc không biết dẫn tới không đi khám sàng lọc làm tăng tỷ lệ người mắc bệnh này.

4. Bàn luận

4.1. Tỷ lệ sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ PNMT sàng lọc bệnh thalassemia dương tính là 12,7%. Kết quả này tương đồng với tỷ lệ sàng lọc thalassemia dương tính trên PNMT trong nghiên cứu của DT.H. Thien năm 2019 [3] là 13%. Tuy nhiên, tỷ lệ này cao hơn so với nghiên cứu của V. Gupta và cs (2015) [9] tại Ấn Độ cho tỷ lệ PNMT được sàng lọc bệnh thalassemia dương tính tại bệnh viện là 5,9%. Mặt khác, tỷ lệ này lại thấp hơn so với tỷ lệ PNMT được sàng lọc thalassemia dương tính trong các nghiên cứu thực hiện ở Thái Lan và Lào (lần lượt là 25,4 và 23,7%) [10, 11]. Sự khác biệt này có thể là do tỷ lệ sàng lọc thalassemia khác nhau ở các chủng tộc và quốc gia trên thế giới.

Việc xét nghiệm di truyền học phân tử tìm đột biến gen bệnh thalassemia ở PNMT có kết quả sàng lọc dương tính khá quan trọng để chẩn đoán kiểu gen cho hai vợ chồng. Kết quả xét nghiệm di truyền này có giá trị cả đời, các thầy thuốc dựa trên kết quả đó, phân tích theo cơ chế di truyền để tư vấn nguy cơ di truyền cho mỗi lần mang thai của hai vợ chồng [3]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chỉ có 34,3% PNMT có kết quả xét nghiệm đột biến gen thalassemia. Qua phỏng vấn định tính chúng tôi thấy rằng, tỷ lệ này còn thấp là do PNMT quyết định không sàng lọc tiếp để chẩn đoán gen bệnh vì điều kiện kinh tế khó khăn mà chi phí xét

nghiệm đột biến gen thalassemia cho mỗi người khá cao hoặc vợ chồng hiếm muộn nên vẫn quyết định sinh con và theo dõi sau sinh. Những PNMT chỉ có kết quả xét nghiệm đột biến gen thalassemia mà không có kết quả xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi, lý do có thể là trước đây họ đã từng được chẩn đoán mang gen bệnh thalassemia hoặc đã làm xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi ở cơ sở khác hoặc đã từng có tiền sử sản khoa được tư vấn sàng lọc rồi nhưng chưa làm xét nghiệm tìm đột biến gen bệnh thalassemia.

4.2. Một số yếu tố liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT

Nghiên cứu thực hiện tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương nên chủ yếu người Kinh đến khám khá đông. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ các dân tộc thiểu số mang gen bệnh thalassemia rất cao. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác như của N.C. Khanh và cs (1986) [12], T.C. Khanh (1993) [13] đã chỉ ra rằng, tỷ lệ mang gen β -thalassemia và bệnh huyết sắc tố ở người dân tộc ít người miền Bắc rất cao, nhất là ở người Thái và người Mường (lần lượt là 33,3 và 16,6% ở người Thái và 32,5 và 25% ở người Mường). Nghiên cứu của B.Q. Khanh và cs (2019) [14] cũng cho thấy kết quả tương tự, tỷ lệ mang gen thalassemia và bệnh huyết sắc tố chung chiếm 64,7%, là rất cao trong cộng đồng gồm 9 dân tộc thiểu số ở Tây Nguyên.

Dựa vào phân loại mức độ thiếu máu theo tiêu chuẩn của WHO đối với PNMT khi được chẩn đoán thiếu máu (chỉ số HGB < 110 g/l), trong nghiên cứu của D.P.T. Huong (2019) [15] có 5,8% PNMT có biểu hiện thiếu máu ở mức độ nhẹ và vừa lần lượt là 53,1 và 46,9%. Nghiên cứu của Q.F. Ge và cs (2016) [16] tại Trung Quốc cũng cho phát hiện tương tự như kết quả của chúng tôi, hầu hết PNMT với bệnh thalassemia đều có biểu hiện thiếu máu nhẹ.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra một yếu tố quan trọng khác là tiền sử sản khoa có liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT. Trong số phụ nữ có tiền sử sản khoa liên quan đến bệnh thalassemia, có 66,7% người có kết quả sàng lọc dương tính mang gen bệnh thalassemia. Nhiều phụ nữ được phỏng vấn chia sẻ họ đã có tiền sử phù thai, thậm chí đình chỉ thai nghén vì phù thai nhiều lần nhưng không biết mình mang gen bệnh thalassemia. Họ không đi làm các xét nghiệm tiếp theo liên quan đến bệnh vì nghĩ rằng lần này mang thai chưa may mắn, lần sau sinh con sẽ bình thường. Một số phụ nữ khác báo cáo rằng, họ đã được nhân viên y tế tư vấn về bệnh thalassemia nhưng không hiểu rõ tình trạng mang gen cũng như nguy cơ cho những lần sinh con tiếp theo, vì thế lần này mang thai có bất thường

thì họ mới đi khám. Vậy nên yếu tố nhận thức của PNMT về bệnh thalassemia cũng là một yếu tố có liên quan được tìm thấy trong nghiên cứu này. Hầu hết phụ nữ không biết về bệnh thalassemia trước khi đến khám thai tại bệnh viện. Họ không nhận thức được tầm quan trọng của việc sàng lọc sớm gen bệnh thalassemia và hậu quả nặng nề cả về thể chất lẫn tinh thần đối với trẻ sinh ra mắc bệnh thể nặng. Chính vì vậy, PNMT thường chủ quan và không đi khám sàng lọc gen bệnh thalassemia, dẫn đến nhiều trường hợp đáng tiếc xảy ra. Nghiên cứu của T. Hanprasertpong và cs (2018) [17] cũng có phát hiện tương tự như kết quả của chúng tôi, cho thấy kiến thức của PNMT ở Thái Lan về tầm soát bệnh thalassemia trước sinh còn thấp. Bên cạnh đó, trình độ hiểu biết và thái độ của PNMT về bệnh thalassemia có ảnh hưởng đến việc quyết định thực hiện sàng lọc trước sinh của họ.

Sự quan tâm, hỗ trợ, đặc biệt từ phía chồng và gia đình cũng là một yếu tố khác được tìm thấy trong nghiên cứu có ảnh hưởng đến PNMT với bệnh thalassemia. Trong nghiên cứu này, đa số phụ nữ đều chia sẻ họ được chồng và gia đình quan tâm, ủng hộ trong mọi quyết định. Nghiên cứu của F.K. Boardman và cs (2019) [18] cũng chỉ ra sự tương đồng với kết quả nghiên cứu này, cho thấy phụ nữ được chồng và gia đình ủng hộ quan điểm của mình. Tuy nhiên, không phải mọi quyết định của phụ nữ đều nhận được sự ủng hộ, hỗ trợ từ phía gia đình. Một số ít phụ nữ trong nghiên cứu của chúng tôi chia sẻ họ muốn làm xét nghiệm tìm phân tử đột biến chẩn đoán gen bệnh thalassemia để biết về nguy cơ di truyền bệnh cho con nhưng lần mang thai tiếp theo nhưng chồng phản đối nên không làm nữa. Điều này cũng là một khoảng trống trong việc sàng lọc và phát hiện chính xác tỷ lệ người mang gen bệnh thalassemia.

Nghiên cứu của N.T.T. Ha và cs năm 2019 [19] cũng có phát hiện tương tự với kết quả này, cho thấy tỷ lệ mang gen thalassemia và bệnh huyết sắc tố ở một số dân tộc có xu hướng kết hôn cận huyết trong cùng dân tộc sống tập trung ở Bắc Trung Bộ đều rất cao.

Vì vậy, cần tuyên truyền phổ biến kiến thức về bệnh thalassemia và một số yếu tố liên quan đến sàng lọc mang gen bệnh cho PNMT và gia đình biết qua nhiều hình thức. Tuyên truyền để cộng đồng hạn chế kết hôn cận huyết, đặc biệt ở một vài dân tộc thiểu số nhằm góp phần làm giảm tỷ lệ người mắc bệnh thalassemia.

5. Kết luận

Qua nghiên cứu thực trạng bệnh thalassemia ở PNMT đến khám sàng lọc tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương và một số yếu tố liên quan, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

Tỷ lệ sàng lọc bệnh thalassemia dương tính là 12,7%, trong đó thể α -thalassemia chiếm tỷ lệ lớn nhất là 67,1%, thể β -thalassemia chiếm tỷ lệ lớn thứ 2 là 12,9%, bệnh lý huyết sắc tố E và các thể phối hợp cũng được phát hiện.

Một số yếu tố cá nhân có liên quan đến sàng lọc bệnh thalassemia ở PNMT bao gồm: nhóm các dân tộc Mường, Thái, Tày có khả năng phát hiện dương tính với thalassemia qua sàng lọc cao hơn dân tộc Kinh (OR=11,97); những người có tiền sử sản khoa liên quan đến bệnh thalassemia có khả năng phát hiện dương tính với thalassemia qua sàng lọc cao hơn những người chưa có tiền sử (OR=16,34); những PNMT bị thiếu máu có khả năng phát hiện dương tính với thalassemia qua sàng lọc cao hơn nhiều so với những người không bị thiếu máu (OR=179,25).

Yếu tố gia đình có liên quan đến thái độ của chồng và người thân trong việc ủng hộ vợ làm sàng lọc nguy cơ mắc bệnh thalassemia.

Yếu tố về xã hội có ảnh hưởng đến tỷ lệ sàng lọc bệnh thalassemia thấp ở PNMT từ phía cơ sở y tế bao gồm việc cung cấp thông tin về bệnh chưa đầy đủ, thiếu trang thiết bị chẩn đoán gen bệnh tại tuyến cơ sở hoặc yếu tố văn hóa như là phong tục kết hôn cận huyết ở một vài dân tộc thiểu số.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Origa, F. Comitini (2019), "Pregnancy in thalassemia", *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, **11**(1), DOI: 10.4084/MJHID.2019.019.
- [2] N.T.T. Ha (2017), *Research on Globin Gene Mutation Characteristics and Monitoring of Iron Chelation Treatment in Thalassemia Patients at The National Institute of Hematology and Blood Transfusion in The Period 2013-2016*, Doctoral Thesis in Medicine, Hanoi Medical University (in Vietnamese).
- [3] D.T.H. Thien (2019), *Research on Screening for Thalassemia in Pregnant Women Coming for Examination and Treatment at The National Hospital of Obstetrics and Gynecology*, Doctoral Thesis in Medicine, Hanoi Medical University (in Vietnamese).
- [4] S. Pharephan, P. Sirivatanapa, S. Makonkawkeyoon, et al. (2016), "Prevalence of α -thalassaemia genotypes in pregnant women in northern Thailand", *Indian J. Med. Res.*, **143**(3), pp.315-322, DOI: 10.4103/0971-5916.182622.
- [5] T. Hassan, M. Zakaria, M. Fathy, et al. (2018), "Association between genotype and disease complications in Egyptian patients with beta thalassemia: A cross-sectional study", *Scientific Reports*, **8**(1), DOI: 10.1038/s41598-018-36175-9.
- [6] Thai Nguyen Province Health Department (2020), "Celebrating World Thalassemia Day (08/5/2020)", http://soytethainguyen.gov.vn/tin-don-vi/-/asset_publisher/XQT17zvLF0Iw/content/huong-ung-ngay-thalassemia-the-gioi-08-5-2020-?inheritRedirect=true, accessed 9 May 2020 (in Vietnamese).
- [7] D.T.H. Thien, N.M. Thang (2016), "Study on some factors related to thalassemia in pregnant women at prenatal diagnosis center, National Hospital of Obstetrics and Gynecology 2015", *Vietnam Association of Obstetrics and Gynecology*, **14**(1), pp.14-18, DOI: 10.46755/vjog.2016.1.656 (in Vietnamese).
- [8] S. Siridamrongvattana, N.V. Hoa, K. Sanchaisuriya, et al. (2013), "Burden of anemia in relation to thalassemia and iron deficiency among Vietnamese pregnant women", *Acta Haematologica*, **130**(4), pp.281-287, DOI: 10.1159/000351168.
- [9] V. Gupta, P. Sharma, R. Jora, et al. (2015), "Screening for thalassemia carrier status in pregnancy and pre-natal diagnosis", *Indian Pediatric*, **52**(9), pp.808-809.
- [10] C. Wanapirak, W. Muninthorn, T. Sanguansermisri, et al. (2004), "Prevalence of thalassemia in pregnant women at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital", *Journal of The Medical Association of Thailand*, **87**(12), pp.1415-1418.
- [11] O. Savongsy, S. Fucharoen, G. Fucharoen, et al. (2008), "Thalassemia and hemoglobinopathies in pregnant Lao women: Carrier screening, prevalence and molecular basis", *Annals of Hematology*, **87**(8), pp.647-654, DOI: 10.1007/s00277-008-0490-z.
- [12] N.C. Khanh, D.B. Truc, L.C. Sy (1986), "Contribute to understanding the prevalence of hemoglobinopathies in some ethnic minorities in the North", *Journal of Practical Medicine*, **5**, pp.24-28 (in Vietnamese).
- [13] T.C. Khanh (1993), "Frequency of hemoglobin disease in Vietnam", *Vietnam Medical Journal*, **174**(8), pp.11-16 (in Vietnamese).
- [14] B.Q. Khanh, N.T.T. Ha, N.M. Quan, et al. (2019), "Investigation of the situation about thalassemia and hemoglobinopathies in ethnic groups in Northeast of Vietnam", *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, **23**(6), pp.230-236 (in Vietnamese).
- [15] D.P.T. Huong (2019), *Research on Clinical and Laboratory Characteristics in Pregnant Women Carrying The Thalassemia Gene at The National Institute of Hematology and Blood Transfusion in 2018-2019*, Master Thesis in Medicine, Hanoi Medical University (in Vietnamese).
- [16] Q.F. Ge, Y. Wang, Y. Zhang, et al. (2020), "Clinical features of pregnant women with thalassemia in non endemic area", *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, **28**(6), pp.2022-2027, DOI: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2020.06.037 (in Chinese).
- [17] T. Hanprasertpong, K. Raungrongmorakot, A. Geater, et al. (2018), "Survey on knowledge, attitude, acceptance and related factors among pregnant women in Thailand regarding antenatal thalassaemia screening", *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **38**(7), pp.950-955, DOI: 10.1080/01443615.2018.1443060.
- [18] F.K. Boardman, R. Hale (2019), "I didn't take it too seriously because I'd just never heard of it: experiential knowledge and genetic screening for thalassaemia in the UK", *Journal of Genetic Counseling*, **28**(1), pp.141-154, DOI: 10.1002/jgc4.1042.
- [19] N.T.T. Ha, N.T. Van, N.M. Quan, et al. (2019), "Epidemiological situation of thalassemia/hemoglobin genes in some ethnic groups in the North Central region", *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, **23**(3), pp.286-291, (in Vietnamese).

Khảo sát khả năng hạ glucose huyết của lá Xuân hoa răng (*Pseuderanthemum crenulatum*) trên mô hình chuột đái tháo đường bằng alloxan

Dương Thị Bích^{1*}, Dư Thế Anh¹, Trì Kim Ngọc¹, Nguyễn Hữu Phúc¹,
Nguyễn Xuân Linh¹, Bành Thanh Hùng², Huỳnh Ngọc Trung Dung¹

¹Trường Đại học Tây Đô, 68 Trần Chiên, phường Lê Bình, quận Cái Răng, TP Cần Thơ, Việt Nam

²Chi cục Kiểm lâm tỉnh An Giang, 10/1 Châu Văn Liêm, phường Mỹ Bình, TP Long Xuyên, tỉnh An Giang, Việt Nam

Ngày nhận bài 5/7/2021; ngày chuyển phản biện 8/7/2021; ngày nhận phản biện 29/7/2021; ngày chấp nhận đăng 3/8/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát khả năng ức chế α -glucosidase, hạ glucose huyết trên chuột gây đái tháo đường bằng alloxan và độc tính cấp của cao chiết ethanol 96% lá Xuân hoa răng (*Pseuderanthemum crenulatum*). Kết quả cho thấy, cao ethanol lá Xuân hoa răng có khả năng ức chế α -glucosidase ở nồng độ $IC_{50}=66,01 \mu\text{g/ml}$, mạnh hơn 1,8 lần đối chứng dương acarbose ($IC_{50}=122,2 \mu\text{g/ml}$). Sau 21 ngày cho chuột đái tháo đường uống cao ở liều 1 g/kg thể trọng làm hạ 42,02% nồng độ glucose huyết của chuột so với ngày đầu bắt đầu điều trị, tương đương với đối chứng dương điều trị bằng gliclazide (10 mg/kg) là 41,78%. Bên cạnh đó, lá Xuân hoa răng không thể hiện độc tính qua đường uống trên chuột ở liều 5 g/kg (tương đương với 357 g lá tươi/kg thể trọng) sau 72 giờ quan sát. Như vậy, lá Xuân hoa răng có thể sử dụng trong ổn định glucose huyết và cần có thêm những nghiên cứu kiểm chứng để có thể đưa cây Xuân hoa răng sử dụng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường.

Từ khóa: đái tháo đường, mô hình chuột đái tháo đường, Xuân hoa răng.

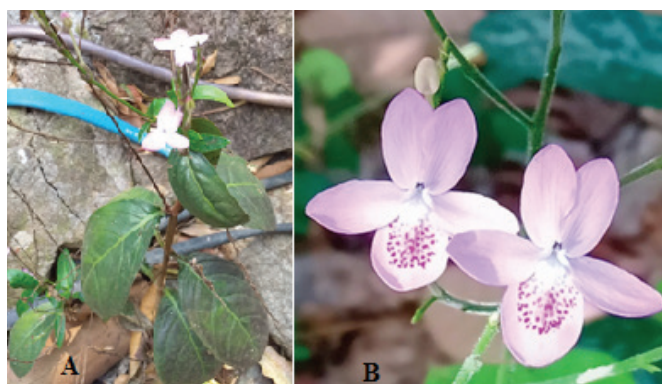
Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, đã có nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu cây thuốc có khả năng bổ sung và thay thế thuốc điều trị đái tháo đường (ĐTĐ). Nhiều loài được xác định có khả năng kiểm soát glucose huyết và ít tác dụng phụ, trong đó những loài thực vật đã được nghiên cứu và sử dụng như lá Ồi, lá Vối, lá Sen, Bằng lăng nước, Trà xanh, Khô qua... Việc nghiên cứu tìm kiếm những thực vật hỗ trợ trong điều trị bệnh ĐTĐ vẫn đang tiếp tục.

Xuân hoa răng là một loài thực vật thuộc chi Xuân hoa (*Pseuderanthemum*), họ Ô rô (*Acanthaceae*), phát triển nhiều ở miền Trung và miền Nam Việt Nam [1]. Ở Núi Cẩm (An Giang), Xuân hoa răng phát triển ở Vồ Bạch Tượng, được người dân địa phương gọi là Lan quét (hình 1) và thường được dùng trong các bữa ăn giúp ổn định đường huyết của người bệnh ĐTĐ. Đây là kinh nghiệm sử dụng được liệu từ thiên nhiên của người dân địa phương. Tuy nhiên, chưa có công bố khoa học nào về tác dụng dược lý của cây. Vì vậy, đề tài này thực hiện nhằm đánh giá khả năng hạ glucose huyết và kiểm tra độc tính để cung cấp thêm thông tin khoa học về tác dụng dược lý của cây Xuân hoa răng.

*Tác giả liên hệ: Email: dtbich@tdtu.edu.vn



Hình 1. Cây Xuân hoa răng ở Núi Cẩm (An Giang). (A) Cây Xuân hoa răng; (B) Hoa Xuân hoa răng.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Lá Xuân hoa răng thu hái vào tháng 9/2020 tại Vồ Bạch Tượng (Núi Cẩm, An Giang). Xuân hoa răng được xác định dựa vào khóa định loại về chi Xuân hoa của P.H. Ho (1999) [2], N.K. Khoi và cs (2015) [1], đồng thời kết hợp với kết quả phân tích trình tự DNA (mã số đăng ký lưu trữ trình tự trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI MW934595.1) với các đặc điểm nhận diện: cây bụi, thân có lông tơ; cuống lá dài 1-4 cm, có lông tơ, phiến lá hình trứng - bầu dục đến thuôn -

Hypoglycemic effect of leaf extract of *Pseuderanthemum crenulatum* leaves in an alloxan-induced diabetic mice

Thi Bích Duong^{1*}, The Anh Du¹, Kim Ngoc Tri¹,
Huu Phuc Nguyen¹, Xuan Linh Nguyen¹,
Thanh Hung Banh², Ngoc Trung Dung Huynh¹

¹Tay Do University, 68 Tran Chien Street,
Le Binh Ward, Cai Rang District, Can Tho City, Vietnam

²An Giang Forest Protection Department,
10/1 Chau Van Liem Street, My Binh Ward, Long Xuyen City, An Giang Province, Vietnam

Received 5 July 2021; revised 29 July 2021; accepted 3 August 2021

Abstract:

In this study, the hypoglycaemic effects of ethanol extracts from *Pseuderanthemum crenulatum* leaves were investigated. The evaluated trials included: *in vitro* α -glucosidase inhibitory activity; oral glucose tolerance test in normoglycemic mice; hypoglycemia in an alloxan-induced diabetic mice model, and oral toxicity assay. The results showed that the ethanol extract of *P. crenulatum* leaves was able to inhibit α -glucosidase enzyme at IC_{50} =66.01 μ g/ml, 1.8 times higher than acarbose control (IC_{50} was 122.2 μ g/ml). After 21 days of using leaf extract of *P. crenulatum* (1 g/kg) to treat diabetic mice, the blood glucose was reduced by 42.02%. This result was equivalent to gliclazide (10 mg/kg) which reduced the blood glucose of diabetic mice by 41.78%. The oral toxicity test results at a dose of 5 g/kg equivalent to 357 g of fresh leaf/kg after 72 hours was not exhibited acute oral toxicity in mice. In summary, there is a need for more studies on the ability of *P. crenulatum* leaves to treat diabetes.

Keywords: diabetes, diabetic mouse models, *Pseuderanthemum crenulatum*.

Classification number: 3.4

mác, 6-7 cặp gân lá; trục phát hoa hình tháp, hoa hình đỉnh, ống dài 2,5-3,5 cm, tràng 5 cánh không đều, màu trắng đến tím nhạt, chia thành môi (môi trên 2 thùy, môi dưới 3 thùy); tràng lớn có nhiều chấm màu tím đậm; có 2 nhị, không nhị lép, thò ra khỏi ống tràng.

Chuột nhắt trắng đực (*Swiss albino*) được cung cấp từ Viện Vắc-xin và Sinh phẩm Y tế. Chuột nuôi ổn định một tuần với chế độ ăn uống đầy đủ, ở điều kiện nhiệt độ và ánh sáng ổn định.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Điều chế cao: lá Xuân hoa răng thu về được rửa sạch, sấy ở nhiệt độ 40°C đến độ ẩm dưới 13%, xay thành bột và chiết cao toàn phần với ethanol 96% theo phương pháp chiết nóng [3]. Dung môi bổ sung vào được liệu theo tỷ lệ 10:1, đun hồi lưu ở 70°C với thời gian 3 giờ. Sau khi đun, dịch chiết được lọc và cô ở 70°C đến cao đạt độ ẩm dưới 20% [4]. Kết quả thu được cao chiết ethanol 96% từ lá Xuân hoa răng có độ ẩm 8,14% với hiệu suất chiết là 8,7%.

Khảo sát khả năng ức chế enzym α -glucosidase: phương pháp dựa trên phản ứng thủy phân cơ chất *p*-nitrophenyl α -glucopyranosid (*p*-NPG) khi có mặt α -glucosidase, tạo ra sản phẩm *p*-nitrophenol (*p*-NP) và α -D-glucose [5]. Phản ứng được thực hiện trên đĩa 96 giếng. Nồng độ ban đầu của cao khảo sát được pha từ 2.000 μ g/ml giảm dần đến 50 μ g/ml, α -glucosidase (0,2 U/ml) được pha trong dung dịch đệm phosphate 0,1 M (pH 6,8). Hỗn hợp phản ứng gồm 60 μ l dung dịch mẫu và 50 μ l α -glucosidase trong dung dịch đệm, được ủ ở 37°C trong 10 phút. Sau đó bổ sung 50 μ l dung dịch *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*-NPG) pha trong đệm phosphate 0,1 M (pH 6,8) và tiếp tục ủ trong 20 phút. Kết thúc phản ứng, các mẫu được đo độ hấp thụ quang bằng máy đọc vi đĩa (Biotek, USA) ở bước sóng 405 nm. Mẫu đối chứng acarbose được làm song song với mẫu thử. Hoạt tính ức chế α -glucosidase được tính theo công thức: Khả năng ức chế (%) = $(A_{\text{chứng}} - A_{\text{mẫu}}) / A_{\text{chứng}} \times 100$ (A : là kết quả trung bình của 3 lần đo độ hấp thụ quang). Giá trị IC_{50} được xác định dựa vào phương trình đường cong phi tuyến tính $y = \ln(x) + b$.

Khảo sát dung nạp glucose trên chuột qua đường uống [6]: chuột 5 tuần tuổi trọng lượng trung bình 23,1 $\pm$ 1 g được chia thành 5 lô: lô đối chứng, lô thử nghiệm uống nước cất và 3 lô uống cao ethanol lá Xuân hoa răng (liều 0,1, 0,5 và 1 g/kg thể trọng). Sau 1 giờ, tiếp tục cho các lô thử nghiệm uống glucose (liều 2 g/kg thể trọng). Tiến hành lấy máu tĩnh mạch đuôi chuột định lượng glucose huyết bằng máy đo đường huyết cầm tay Accu-chek active sau khi cho uống glucose ở thời điểm 30, 60 và 120 phút.

Khảo sát khả năng hạ glucose huyết trên chuột ĐTĐ bằng alloxan:

Tạo mô hình chuột ĐTĐ bằng alloxan [7]: chuột 7 tuần tuổi trọng lượng trung bình 34,5 $\pm$ 2 g được chia thành 2 lô: lô 1 tiêm nước cất, lô 2 tiêm alloxan monohydrate (Merck) với liều 180 mg/kg thể trọng, tiêm phúc mô (lượng tiêm 0,1 ml/10 g trọng lượng chuột). Các lô chuột được cho ăn uống bình thường, sau 7 ngày lấy máu tĩnh mạch đuôi kiểm tra glucose huyết lúc đói (sau khi chuột nhịn đói 12 giờ). Những chuột có glucose huyết trên 200 mg/dl [8] được tuyển chọn sử dụng cho thí nghiệm hỗ trợ hạ glucose huyết của cao ethanol lá Xuân hoa răng.

Khảo sát hạ glucose huyết trên chuột ĐTĐ: thí nghiệm được bố trí 6 lô, mỗi lô gồm 5 chuột (bảng 1).

Bảng 1. Bố trí các lô thử nghiệm khả năng hạ glucose huyết của cao chiết lá Xuân hoa răng.

Lô thử nghiệm	Số chuột (n)
Lô 1: Chuột bình thường không dùng thuốc, cao (đối chứng)	5
Lô 2: Chuột ĐTD không điều trị (đối chứng âm)	5
Lô 3: Chuột ĐTD điều trị bằng gliclazid 30 mg (Glumeron 30 - DHG pharma) với liều 10 mg/kg (đối chứng dương)	5
Lô 4: Chuột ĐTD điều trị bằng cao liều 1 g/kg thể trọng chuột	5
Lô 5: Chuột ĐTD điều trị bằng cao liều 2 g/kg thể trọng chuột	5
Lô 6: Chuột ĐTD điều trị bằng cao liều 3 g/kg thể trọng chuột	5

Chỉ tiêu theo dõi: glucose huyết được kiểm tra vào 8-9 giờ sáng (cho chuột nhịn đói từ 8 giờ tối hôm trước) ở các thời điểm: ngày 1, 7, 14 và 21; theo dõi hoạt động ăn, uống, vận động và trọng lượng.

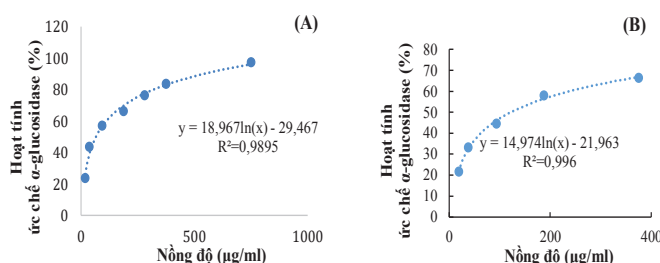
Thử độc tính cấp bằng đường uống: sử dụng mô hình thử nghiệm liều cố định [9]. Liều chọn thử nghiệm là 5 g/kg thể trọng chuột thí nghiệm với tổng số chuột thí nghiệm là 5 con. Thời gian theo dõi sự sinh tồn qua các hoạt động ăn, uống và vận động của chuột là 72 giờ.

Phương pháp đánh giá kết quả: sử dụng công cụ ANOVA trong phần mềm SPSS 20 để phân tích. Kết quả được trình bày dưới dạng MEAN $\pm$ SEM.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khả năng ức chế α -glucosidase

Khả năng ức chế α -glucosidase của cao lá Xuân hoa răng qua khảo sát đạt giá trị IC_{50} =66,01 μ g/ml, mạnh gấp 1,8 lần đối chứng dương acarbose (IC_{50} =122,2 μ g/ml) (hình 2A và 2B) và mạnh gấp 15 lần cao chiết từ lá Hoàn ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk) với IC_{50} =1.000 μ g/ml [10], đây là cây cùng chi (*Pseuderanthemum*) với Xuân hoa răng. Qua đó cho thấy việc sử dụng lá Xuân hoa răng của người dân vùng Núi Cấm để ổn định glucose huyết là rất phù hợp.



Hình 2. Khả năng ức chế α -glucosidase. (A) Cao lá Xuân hoa răng; (B) Acarbose.

3.2. Khả năng dung nạp glucose trên chuột thí nghiệm

Sau 30 phút thử nghiệm dung nạp glucose, các lô thử nghiệm có glucose huyết trung bình tăng khác biệt ($p<0,05$). Đến thời điểm kết thúc (120 phút) glucose huyết trung bình ở lô 2 (uống glucose) và 5 (uống cao liều 1 g/kg) bằng nhau (110 mg/dl). Tuy nhiên, do mức glucose huyết trung bình ở lô 5 tại thời điểm bắt đầu (125 mg/dl) cao hơn lô 2 (97,3 mg/dl) khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) nên tỷ lệ phần trăm glucose huyết ở lô 5 (-12%) giảm mạnh hơn lô 2 (13,2%) (bảng 2). Lô 3 và 4 (uống cao liều 0,1 g/kg và 0,5 g/kg) có glucose huyết cao hơn so với ban đầu (17,9% và 10,4%) và cao hơn lô 2 ở thời điểm kết thúc. Qua đó cho thấy, cao ethanol lá Xuân hoa răng có khả năng ức chế dung nạp glucose ở liều 1 g/kg thể trọng chuột thí nghiệm trong thời gian sử dụng cao chiết.

Bảng 2. Nồng độ glucose huyết của chuột sau uống glucose và cao lá Xuân hoa răng.

Lô thử nghiệm	Nồng độ glucose huyết trung bình (mg/dl)			
	Ban đầu	Sau 30 phút	Sau 60 phút	Sau 120 phút
1 (uống nước)	103,3 $\pm$ 5,3 ^{ab}	116,3 $\pm$ 6,7 ^a (12,6%)	105,5 $\pm$ 5,2 ^a (2,2%)	85,5 $\pm$ 7,4 ^a (-17,2%)
2 (glucose + nước)	97,3 $\pm$ 10,1 ^{ab}	174,6 $\pm$ 24,5 ^a (79,5%)	127,8 $\pm$ 5,4 ^{ab} (31,3%)	110,0 $\pm$ 6,4 ^{ab} (13,2%)
3 (cao 0,1 g + glucose)	86,5 $\pm$ 2,4 ^a	141,8 $\pm$ 14,4 ^a (63,9%)	151 $\pm$ 11,6 ^a (74,5%)	102 $\pm$ 7,9 ^{ab} (17,9%)
4 (cao 0,5 g + glucose)	108,5 $\pm$ 8,9 ^{ab}	131,5 $\pm$ 9,4 ^a (21,2%)	144,5 $\pm$ 10,1 ^b (33,1%)	119,8 $\pm$ 10,7 ^b (10,4%)
5 (cao 1 g + glucose)	125 $\pm$ 4,5 ^b	172,5 $\pm$ 34,2 ^a (38%)	155,3 $\pm$ 9,1 ^a (24,2%)	110,0 $\pm$ 6,4 ^{ab} (-12%)

Ghi chú: số mang mũ chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê trong phép thử Tukey với mức ý nghĩa $p<0,05$; (-): tỷ lệ glucose huyết trung bình giảm so với trước khi dung nạp glucose.

3.3. Khả năng hạ glucose huyết trên mô hình chuột ĐTD bằng alloxan

Hiệu quả hạ glucose huyết của chuột gây ĐTD bằng alloxan khi uống cao ethanol lá Xuân hoa răng được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Nồng độ glucose huyết trung bình của chuột ĐTD sau thời gian điều trị bằng cao lá Xuân hoa răng.

Thử nghiệm thứ	Glucose huyết lúc đói (mg/dl)			
	Ngày 1	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21
Bình thường	101,4 $\pm$ 2,3 ^a	109,6 $\pm$ 3,7 ^a	116,6 $\pm$ 3 ^a	102,8 $\pm$ 2,5 ^a
Không điều trị	248,6 $\pm$ 49,8 ^{bc}	326,6 $\pm$ 72,2 ^b	329,2 $\pm$ 30,8 ^c	304 $\pm$ 20,6 ^c
Gliclazide (10 mg/kg)	354,2 $\pm$ 31,6 ^b	253,8 $\pm$ 32,9 ^{ab}	226,2 $\pm$ 22,8 ^{bc}	206,2 $\pm$ 13,3 ^b
Cao (1 g/kg)	280,8 $\pm$ 25,6 ^{bc}	217,2 $\pm$ 6 ^{ab}	163,4 $\pm$ 18,1 ^{ab}	151,2 $\pm$ 7,4 ^{abc}
Cao (2 g/kg)	218,1 $\pm$ 5,9 ^{ab}	349,5 $\pm$ 57,6 ^b	284 $\pm$ 55,2 ^{bc}	197 $\pm$ 54,5 ^{bc}
Cao (3 g/kg)	328 $\pm$ 23,6 ^c	218,4 $\pm$ 25,6 ^{ab}	188 $\pm$ 8,2 ^{ab}	131 $\pm$ 4,3 ^{ab}

Ghi chú: các số mang mũ chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê trong phép thử Tukey với mức ý nghĩa $p<0,01$.

Sau khi tiêm alloxan 7 ngày, chuột ĐTD trong các lô thử nghiệm có mức glucose huyết trung bình từ 218,1 $\pm$ 5,9 đến 354,2 $\pm$ 31,6 mg/dl. Qua 14 ngày điều trị, các lô sử dụng thuốc

gliclazide và cao ethanol lá Xuân hoa răng có glucose huyết trung bình giảm khác biệt so với lô không điều trị ($p < 0,01$). Ở ngày 21, các lô sử dụng cao (liều 1, 2 và 3 g/kg thể trọng) có mức glucose huyết trung bình (151,2, 197 và 131 mg/dl) thấp hơn lô dùng gliclazide (206,2 mg/dl) khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Từ kết quả trên cho thấy cao ethanol lá Xuân hoa răng có khả năng hạ glucose huyết ở chuột bệnh ĐTĐ ở liều 1 g/kg thể trọng trên chuột thử nghiệm.

Nhìn chung trọng lượng trung bình của chuột trong thời gian khảo sát có thay đổi. Tuy nhiên, sự thay đổi trọng lượng ở các lô thử nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (bảng 4). Từ đó cho thấy cao chiết lá Xuân hoa răng có khả năng làm hạ glucose huyết ở chuột bệnh ĐTĐ và không gây sụt cân ở chuột thí nghiệm.

Bảng 4. Trọng lượng trung bình của chuột trong thời gian điều trị ĐTĐ bằng cao lá Xuân hoa răng.

Thí nghiệm	Trọng lượng trung bình của chuột (g)		
	Ngày 1	Ngày 14	Ngày 21
Bình thường	34,4±1,3 ^a	36,4±0,9 ^b	38,8±1 ^b
Không điều trị	34,2±0,5 ^a	34,2±1,2 ^{ab}	33,4±2,3 ^{ab}
Gliclazid (10 mg/kg)	29,8±1,5 ^a	31±0,8 ^a	32±0,7 ^a
Cao (1 g/kg)	30,4±1 ^a	32,4±0,9 ^{ab}	34,4±1,2 ^{ab}
Cao (2 g/kg)	32,2±1,3 ^a	33,8±0,6 ^{ab}	34±1 ^{ab}
Cao (3 g/kg)	32,2±1,3 ^a	33,8±0,6 ^{ab}	34±1,2 ^{ab}

Ghi chú: các số mang mũ chữ cái khác nhau trong cùng một cột khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ trong phép thử Tukey.

3.4. Khảo sát độc tính bằng đường uống

Sau 72 giờ uống cao chiết lá Xuân hoa răng ở nồng độ 5 g/kg thể trọng cho thấy, tất cả chuột thí nghiệm không có biểu hiện bất thường, các hoạt động như: ăn, uống và vận động bình thường. Từ đó cho thấy sử dụng cao với liều 5 g/kg, tương ứng với 357 g lá tươi/kg thể trọng không có khả năng gây độc.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết lá Xuân hoa răng với ethanol 96% có khả năng ức chế α -glucosidase với giá trị $IC_{50} = 66,01 \mu\text{g/ml}$ và hạ glucose huyết trên mô hình chuột ĐTĐ ở nồng độ 1 g/kg thể trọng mà không làm giảm trọng lượng cơ thể của chuột. Lá Xuân hoa răng không gây ngộ độc trên chuột thí nghiệm ở liều 5 g/kg cao, tương đương

với 357 g lá tươi/kg thể trọng. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy lá Xuân hoa răng có tiềm năng sử dụng trong việc ổn định glucose huyết. Tuy nhiên, cần có nhiều nghiên cứu tiếp theo để phân lập và xác định các hoạt chất cũng như tác dụng hạ glucose huyết của các hoạt chất này, mở ra triển vọng đưa cây Xuân hoa răng vào nghiên cứu sử dụng hỗ trợ điều trị bệnh nhân ĐTĐ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.K. Khoi, D.V. Hai (2015), "Research on the classification of the genus Xuan Hoa (*Pseuderanthemum* Radlk) of the Acanthaceae family in Vietnam", 6th National Scientific Conference on Ecology and Biological Resources, pp.193-199 (in Vietnamese).
- [2] P.H. Ho (1999), *An Illustrated Flora of Vietnam, Part 3*, Youth Publishing House, 1027pp (in Vietnamese).
- [3] N.K.P. Phung (2007), *Method for Isolating Organic Compounds*, Vietnam National University - Ho Chi Minh City Publishing House, pp.28-54 (in Vietnamese).
- [4] Vietnam Ministry of Health (2017), *Vietnam Pharmacopoeia V - Appendix 1.1*, Medical Publishing House, pp.1-9 (in Vietnamese).
- [5] H.Q. Dong, M. Li, F. Zhu, et al. (2012), "Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes", *Food Chemistry*, **130**(2), pp.261-266, DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.030.
- [6] National Institute Of Medicinal Materials (2006), *Methods for Studying The Pharmacological Effects of Herbal Drugs*, Science and Technology Publishing House, pp.199-206 (in Vietnamese).
- [7] N. Hamza, B. Berke, C. Cheze, et al. (2012), "Preventive and curative effect of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds in C57BL/6J models of type 2 diabetes induced by high-fat diet", *Journal of Ethnopharmacology*, **142**(2), pp.516-522, DOI: 10.1016/j.jep.2012.05.028.
- [8] H.T.H. Trang, P.T.N. Bich, P.X. Xinh, et al. (2014), "Investigating the hypoglycemic effects of some herbs on an *in vivo* mouse model", *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science*, **9**(1), pp.35-42 (in Vietnamese).
- [9] Vietnam Ministry of Health (2015), *Decision No. 141/QĐ-K2DT dated October 27, 2015 - Directions for Pre-Clinical and Clinical Testing of Oriental Medicine and Medicinal Herbs* (in Vietnamese).
- [10] P. Pulbutr, S. Nualkaew, S. Rattanalkiat, et al. (2016), "Inhibitory actions of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. leaf ethanolic extract and its phytochemicals against carbohydrate-digesting enzymes", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **6**(2), pp.93-99, DOI: 10.1016/j.apjtb.2015.10.010.

Hai phương pháp định lượng Amlodipine besilate và Atorvastatin calcium trong chế phẩm bằng phép đo quang phổ bước sóng kép

Nguyễn Đức Thiện*, Nguyễn Thị Mỹ Linh, Lê Thị Phương Anh, Điều Diễm Quỳnh

Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 23/9/2021; ngày chuyển phản biện 27/9/2021; ngày nhận phản biện 15/10/2021; ngày chấp nhận đăng 20/10/2021

Tóm tắt:

Hai phương pháp đo bằng quang phổ đơn giản, rõ ràng, chính xác dựa vào việc lựa chọn 2 bước sóng được phát triển để xác định đồng thời Amlodipine besilate (AML) và Atorvastatin calcium (ATO) dạng bào chế viên nén trên thị trường. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ sử dụng 2 bước sóng là 238 và 288 nm. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ cho các thông số: khoảng tuyến tính 4-40 $\mu\text{g/ml}$; độ đúng với AML là $100,22 \pm 0,7856$, ATO là $100,12 \pm 0,6439$; độ lặp lại với AML là 0,9122, ATO là 0,8968. Phương pháp tỷ lệ hấp thụ sử dụng 2 bước sóng là 221 và 238 nm. Phương pháp tỷ lệ hấp thụ cho các thông số: khoảng tuyến tính 4-40 $\mu\text{g/ml}$; độ đúng với AML là $100,6 \pm 0,9562$, ATO là $100,86 \pm 0,8596$; độ lặp lại với AML là 1,0124, ATO là 1,1045. Cả 2 phương pháp này đều cho thấy có thể định lượng AML và ATO trong hỗn hợp của chúng mà không cần bất kỳ sự tách chiết nào cả. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ cho thấy khả năng áp dụng nhanh, đơn giản đối với cả hỗn hợp thuốc trong phòng thí nghiệm và thuốc thương mại.

Từ khóa: Amlodipine besilate, Atorvastatin calcium, hỗn hợp, phân tích, phổ tỷ lệ.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

AML có công thức hóa học $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_8\text{S}$, là thuốc được dùng lâu dài để điều trị tăng huyết áp và cơn đau thắt ngực mãn tính [1]. ATO là thuốc hạ lipid máu tổng hợp và là chất ức chế men khử 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-coA). Men này xúc tác cho sự biến đổi của HMG-CoA thành mevalonate, một bước đầu tiên và quyết định về mức độ trong quá trình tổng hợp cholesterol. Công thức hóa học của ATO là $(\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{FN}_2\text{O}_5)_2\text{Ca}_2\text{H}_2\text{O}$ và trọng lượng phân tử là 1209,42 [2].

Có nhiều phương pháp được báo cáo cho xác định AML và ATO ở các dạng bào chế khác nhau để ước tính nồng độ AML và ATO trong hỗn hợp 2 chất này [3, 4], bao gồm sắc ký, quang phổ, điện hóa và hóa học. Các phương pháp sắc ký, điện hóa và hóa học thường đòi hỏi các bước chuẩn bị phức tạp, kỹ lưỡng, đôi khi cần thiết bị đắt tiền. Trong khi đó, phương pháp quang phổ UV-Vis chỉ cần thiết bị máy quang phổ có sẵn trong các phòng thí nghiệm phân tích và không yêu cầu chuẩn bị phức tạp. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày 2 phương pháp sử dụng quang phổ bước sóng kép là phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ [5] và phương pháp tỷ lệ hấp thụ ở 2 bước sóng [6] để xác định đồng thời AML và ATO ở dạng bào chế trong phòng thí nghiệm và dạng viên nén trên thị trường.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Các chất chuẩn AML hàm lượng 99,8%, ATO hàm lượng 99,84% nguồn gốc từ Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Ethanol và HCl đạt tiêu chuẩn phân tích. Dung môi pha mẫu là hỗn hợp dung dịch ethanol 96% và HCl 0,1 N với tỷ lệ thể tích là 3:2. Các chế phẩm có chứa đồng thời AML và ATO gồm: viên nén Zoamco-A tỷ lệ 5 mg/10 mg (Công ty Cổ phần Pymepharco, Việt Nam, số lô 201220), viên nén Caduet tỷ lệ 5 mg/20 mg (Công ty Pfizer, Mỹ, số lô DD6231).

Để định lượng hoạt chất trong các chế phẩm sử dụng 20 viên đem nghiền mịn và cân chính xác một lượng tương đương với 8 mg AML và 8 mg ATO, cho tương ứng vào 2 bình định mức 100 ml, thêm dung môi, lắc, siêu âm khoảng 20 phút và thêm dung môi cho vừa đủ 100 ml. Tiến hành lọc loại bỏ 20-30 ml dịch lọc đầu. Tiếp đến, mỗi bình lấy 8 ml dịch lọc cho vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi vừa đủ, được dung dịch AML nồng độ 80 $\mu\text{g/ml}$ và ATO nồng độ 80 $\mu\text{g/ml}$, lắc đều. Phép đo quang phổ được thực hiện với máy quang phổ Hitachi U1900 UV-Vis được kết nối với máy vi tính (hệ điều hành Window) bằng phần mềm chuyên dụng Solution 2.2. Chế độ: bước sóng bắt đầu là 200 nm - kết thúc 400 nm; kiểu dữ liệu: độ hấp thụ A; độ rộng 4,0 nm; tốc độ quét: 100 nm/phút; cuvet thạch anh 1 cm. Phổ thu sẽ được sơ bộ lọc nhiễu bằng bộ lọc Savitzky Galay (số lần 2, số điểm 15).

*Tác giả liên hệ: Email: thiennd@hup.edu.vn

Two methods for determination of a binary mixture of Amlodipine besylate and Atorvastatin calcium using dual-wavelength spectrophotometry

Duc Thien Nguyen*, Thi My Linh Nguyen,
Thi Phuong Anh Le, Diem Quynh Dieu

Ha Noi University of Pharmacy,

13-15 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 23 September 2021; revised 15 October 2021; accepted 20 October 2021

Abstract:

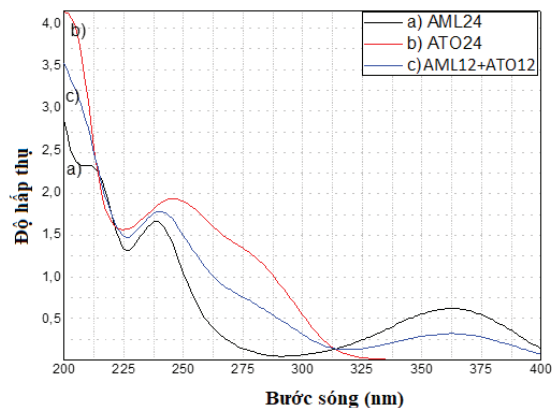
Two simple, clear, and accurate spectrophotometric methods based on two-wavelength selections, were developed for the simultaneous determination of Amlodipine besylate (AML) and Atorvastatin calcium (ATO) in tablet dosage forms. The ratio difference method uses amplitudes between 238 and 288 nm. The measured amplitudes for the parameters: linear range 4-40 $\mu\text{g/ml}$; precision for AML is 100.22 ± 0.7856 , repeatability is 0.9122, precision for ATO is 100.12 ± 0.6439 , repeatability is 0.8968. The absorption ratio method using two wavelengths is 221 and 238 nm. The absorption rate method for parameters: linear range 4-40 $\mu\text{g/ml}$; precision for AML is 100.6 ± 0.9562 , repeatability is 1.0124, precision for ATO is 100.86 ± 0.8596 , repeatability is 1.1045. Both quantitative methods showed that AML and ATO could be quantified in their mixtures without any extraction at all. The absorption ratio method exhibited quick, simple applicability to both laboratory and commercial drug mixtures.

Keywords: Amlodipine besylate, analysis, Atorvastatin calcium, binary mixtures, ratio spectra.

Classification number: 3.4

3. Kết quả

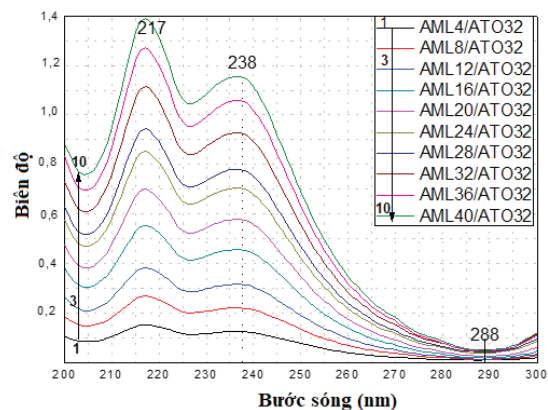
Tiến hành đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn AML 24 $\mu\text{g/ml}$, ATO 24 $\mu\text{g/ml}$ và dung dịch hỗn hợp AML 12 $\mu\text{g/ml}$ + ATO 12 $\mu\text{g/ml}$ trong khoảng bước sóng 200-400 nm.



Hình 1. Phổ hấp thụ của 24 $\mu\text{g/ml}$ AML (a), 24 $\mu\text{g/ml}$ ATO (b) và 12 $\mu\text{g/ml}$ AML với 12 $\mu\text{g/ml}$ ATO (c) sử dụng dung môi (3 ethanol 96%: 1 HCl 0,1 N) làm mẫu trắng.

Kết quả đo phổ của AML và ATO nồng độ 24 $\mu\text{g/ml}$ ở hình 1 cho thấy, 2 phổ này có sự chồng chất lên nhau trong vùng UV-Vis. Điều này gây cản trở việc sử dụng phương pháp đo quang phổ UV thông thường để xác định đồng thời chúng trong hỗn hợp nhị phân. Còn kết quả đo phổ hấp thụ của dung dịch hỗn hợp ở hình 1 cho biết độ hấp thụ của hỗn hợp có tính chất cộng tính trong khoảng 200-300 nm.

3.1. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ ở 2 bước sóng

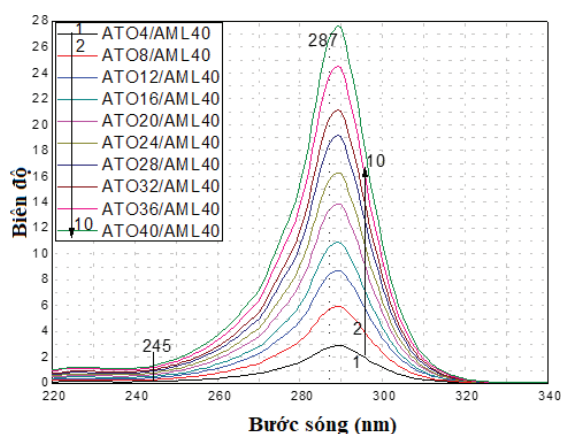


Hình 2. Phổ hấp thụ tỷ lệ của AML (nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$) sử dụng phổ ATO (nồng độ 32 $\mu\text{g/ml}$) là thừa số và dung môi (3 ethanol 96%: 1 HCl 0,1 N) làm mẫu trắng.

Đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn AML có nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi dung dịch cách nhau 4 $\mu\text{g/ml}$) với mẫu trắng là dung môi. Sau đó, vẽ và chồng phổ hấp thụ tỷ lệ của AML (nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$), sử dụng phổ ATO (nồng độ 32 $\mu\text{g/ml}$) là thừa số và ethanol làm mẫu trắng (hình 2). Từ giá trị phổ hấp thụ tỷ lệ có thể chọn các cặp bước bất kỳ để

hiệu biên độ của độ hấp thụ có giá trị tăng hay giảm tuyến tính. Với AML các cặp bước sóng như 217-227, 217-238 và 217-288 nm không được lựa chọn vì độ tuyến tính kém. Chúng tôi tiếp tục lựa chọn 217-238, 227-288, 238-288 và 238-288 nm cho kết quả tốt nhất. Tương quan tuyến tính thu được giữa hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ ở 238-288 nm của các dung dịch chuẩn AML nồng độ 4-40 µg/ml với thừa số ATO 32 µg/ml có dạng:

$\Delta P_{238-288} = 0,0279.C - 0,0137$, với hệ số tương quan $r = 0,9988$ (trong đó C là nồng độ dung dịch chuẩn AML tính bằng µg/ml, ΔP là hiệu biên độ độ hấp thụ ở 2 bước sóng 238 và 288 nm).



Hình 3. Phổ hấp thụ tỷ lệ của ATO (nồng độ 4-40 µg/ml) sử dụng phổ AML (nồng độ 40 µg/ml) là thừa số và dung môi (3 ethanol 96%: 1 HCl 0,1 N) làm mẫu trắng.

Đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn ATO có nồng độ 4-40 µg/ml (mỗi dung dịch cách nhau 4 µg/ml) với mẫu trắng là dung môi. Sau đó vẽ và chồng phổ hấp thụ tỷ lệ của ATO (nồng độ 4-40 µg/ml) sử dụng phổ AML (nồng độ 40 µg/ml) là thừa số và dung môi làm mẫu trắng (hình 3). Từ giá trị độ hấp thụ của phổ tỷ lệ đối với ATO các cặp bước sóng 245-227, 300-230, 287-227 và 287-235 nm được lựa chọn và cho thấy hiệu biên độ tỷ lệ cho độ tuyến tính thấp. Tiếp tục lựa chọn các cặp bước sóng khác nhau và chúng tôi xác định được cặp 287-245 nm cho kết quả tốt nhất. Tương quan tuyến tính thu được giữa hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ ở 287-245 nm của các dung dịch chuẩn ATO nồng độ 4-40 µg/ml với thừa số AML 40 µg/ml có dạng: $\Delta P_{287-245} = 0,6084.C + 0,3307$ và hệ số tương quan $r = 0,9993$ (trong đó, C là nồng độ dung dịch chuẩn ATO tính bằng µg/ml, ΔP là hiệu biên độ độ hấp thụ ở 2 bước sóng 287 và 245 nm).

Các dung dịch hỗn hợp của 2 chất AML và ATO được pha chuẩn với các tỷ lệ như ở bảng 1 và được đo phổ hấp thụ từ 200 đến 400 nm. Phổ hấp thụ thu được sẽ được chia cho phổ ATO (nồng độ 40 µg/ml) là thừa số khi xác định nồng độ AML trong dung dịch hỗn hợp và chia cho phổ AML (nồng độ 40 µg/ml) là thừa số khi xác định nồng độ ATO

trong dung dịch hỗn hợp. Kết quả xác định nồng độ AML và ATO trong các dung dịch hỗn hợp với tỷ lệ xác định được cho ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định nồng độ AML và ATO trong hỗn hợp được chế tạo tại phòng thí nghiệm bằng 2 phương pháp.

Nồng độ (µg/ml)		Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ (hàm lượng % so với nhân, nồng độ µg/ml)		Phương pháp tỷ lệ hấp thụ (hàm lượng % so với nhân)	
AML	ATO	AML	ATO	AML	ATO
8	8	100,75 (8,06)	99,38 (7,95)	101,13 (8,09)	99,13 (7,93)
8	16	100,63 (8,05)	100,51 (16,08)	101,50 (8,12)	100,88 (16,14)
8	24	99,38 (7,95)	100,25 (24,06)	99,50 (7,96)	100,96 (24,23)
16	8	100,31 (16,05)	99,38 (7,95)	101,38 (16,22)	101,38 (8,11)
16	24	100,44 (16,07)	100,42 (24,10)	100,81 (16,13)	101,08 (24,26)
24	8	99,63 (23,91)	99,38 (7,95)	99,58 (23,90)	101,50 (8,12)
24	16	100,38 (24,08)	100,75 (16,12)	100,63 (24,15)	101,32 (16,21)
Trung bình		100,22	100,01	100,65	100,89
SD		0,5139	0,6075	0,6869	0,8098
RSD (%)		0,5128	0,6074	0,6825	0,8026

3.2. Phương pháp tỷ lệ hấp thụ

Hình 1 cho phổ hấp thụ của AML có đỉnh hấp thụ cực đại ở 2 bước sóng 238 và 362,5 nm; phổ hấp thụ ATO có đỉnh hấp thụ cực đại ở 245,5 nm; phổ của dung dịch hỗn hợp AML và ATO có nồng độ bằng nhau thì cho 2 điểm cắt 2 phổ thành phần ở 2 điểm có bước sóng là 214 và 221 nm (λ_{iso}). Chúng tôi lựa chọn $\lambda_1 = \lambda_{iso} = 221$ nm và $\lambda_2 = 238$ nm để tiến hành xác định nồng độ của AML và ATO trong các tính toán thêm chuẩn và trong tính toán với chế phẩm trên thị trường.

Phương trình hồi quy độ hấp thụ của AML trong khoảng nồng độ 4-40 µg/ml, đựng bằng cuvet thạch anh 1 cm với bước sóng 221 nm là $y = 0,0673x + 0,0202$ (hệ số $r = 0,9987$); với bước sóng 238 nm là $y = 0,0686x - 0,0091$ (hệ số $r = 0,9988$). Từ 2 phương trình này ta có $a_{x1} = 0,673$, $a_{x2} = 0,686$.

Phương trình hồi quy độ hấp thụ của ATO trong khoảng nồng độ 4-40 µg/ml, đựng bằng cuvet thạch anh 1 cm với bước sóng 221 nm là $y = 0,0688x + 0,0377$ (hệ số $r = 0,9983$); với bước sóng 238 nm là $y = 0,0772x + 0,0324$ (hệ số $r = 0,9993$). Từ 2 phương trình này ta có $a_{y1} = 0,688$, $a_{y2} = 0,686$. Để xác định nồng độ của AML và ATO theo phương pháp tỷ lệ hấp thụ ta sử dụng công thức sau:

$$C_{AML} = \frac{Q_M - Q_Y}{Q_X - Q_Y} \times \frac{A_1}{a_{x1}} \quad \text{và} \quad C_{ATO} = \frac{Q_M - Q_X}{Q_Y - Q_X} \times \frac{A_1}{a_{y1}}$$

trong đó: $Q_M = A_2/A_1$, $Q_X = a_{x2}/a_{x1}$ và $Q_Y = a_{y2}/a_{y1}$; A_1 và A_2 là độ hấp thụ của dung dịch hỗn hợp ở $\lambda_1 = \lambda_{iso} = 221$ nm và $\lambda_2 = \lambda_{maxAML} = 238$ nm.

Kết quả xác định nồng độ AML và ATO trong các dung dịch hỗn hợp với tỷ lệ lựa chọn pha chế trong phòng thí nghiệm được xác định cho ở bảng 1.

Sử dụng 2 phương pháp để xác định nồng độ 2 hoạt chất AML và ATO trong các dung dịch hỗn hợp được tạo ra từ các viên nén Zoamco-A và Caduet bằng kỹ thuật thêm chuẩn, các kết quả thu được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định nồng độ AML và ATO trong viên nén bằng 2 phương pháp với kỹ thuật thêm chuẩn.

Biệt dược	Hoạt chất	Thêm chuẩn		Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ		Phương pháp tỷ lệ hấp thụ			
		Ban đầu	Thêm	Khối lượng*	%	Khối lượng*	%		
Zoamco-A	AML	6	4	3,956	98,80	3,945	98,63		
			6	5,962	99,37	5,954	99,23		
			8	8,028	100,35	8,058	100,73		
		Trung bình		99,51		99,53			
		SD		0,7840		1,0817			
		RSD		0,7879		1,0968			
	ATO	12	8	8,028	100,35	7,922	99,03		
			12	11,961	99,68	11,879	98,99		
		16	16,084	100,53	16,094	100,59			
			Trung bình		100,19		99,54		
Caduet	AML	6	4	3,961	99,03	3,938	98,45		
			6	6,012	100,2	6,025	100,42		
			8	8,024	100,3	8,032	100,40		
		Trung bình		99,84		99,76			
		SD		0,6790		1,1316			
		RSD		0,6803		1,1344			
	ATO	16	14	14,105	100,75	14,176	101,26		
			22	22,138	100,63	22,149	100,68		
		26	25,855	99,44	25,872	99,50			
			Trung bình		100,27		100,48		
				SD		0,7242		0,8968	
				RSD		0,7222		0,8926	

*: khối lượng tìm được là giá trị trung bình của 10 lần.

Các thông số thẩm định phương pháp phân tích được thực hiện theo yêu cầu của ICH [7] được thể hiện ở bảng 3. Với phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ các thông số thẩm định có đầy đủ trong bảng 3. Còn phương pháp tỷ lệ hấp thụ xác định nồng độ của AML và ATO sử dụng theo các công thức nên bảng 3 không có các thông số đánh giá như độ dốc, hệ số chặn và hệ số tương quan.

Bảng 3. Các thông số thẩm định phương pháp phân tích xác định nồng độ đồng thời AML và ATO trong một hỗn hợp.

Thông số đánh giá	Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ		Phương pháp tỷ lệ hấp thụ	
	AML	ATO	AML	ATO
Độ đúng (trung bình±RSD)	100,22±0,7856	100,12±0,6439	100,67±0,9562	100,86±0,8596
Độ chính xác				
Độ lặp lại ^a	0,9122	0,8968	1,0124	1,1045
Độ chụm trung gian ^b	1,0786	1,0142	1,1044	1,1127
Độ ổn định ^c	0,976	1,0011	1,0284	1,1126
Độ dốc	0,0279	0,6084	-	-
Hệ số chặn	-0,0137	0,3307	-	-
Hệ số tương quan	0,9988	0,9993	-	-
Khoảng tuyến tính (µg/ml)	4-40	4-40	4-40	4-40

a: trung bình của 3 nồng độ 12, 16 và 20 µg/ml chất AML và ATO 3 lần trong 1 ngày; b: trung bình của 3 nồng độ 12, 16 và 20 µg/ml chất AML và ATO 3 lần trong 3 ngày; c: trung bình của 3 nồng độ 12, 16 và 20 µg/ml chất AML và ATO sử dụng 75 và 80% dung môi.

4. Bàn luận

Hai phương pháp xác định AML và ATO đều sử dụng 2 bước sóng để phân tích hỗn hợp 2 chất. Trong đó, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ cho phép lựa chọn 2 bước sóng bất kỳ để xác định nồng độ 2 chất, còn phương pháp tỷ lệ hấp thụ sẽ phải lựa chọn một bước sóng có độ hấp thụ cực đại và một bước sóng có độ hấp thụ 2 chất bằng nhau (λ_{iso}). Điều này cho thấy, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ có nhiều ưu điểm hơn và có nhiều lựa chọn hơn. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ cũng có ưu điểm hơn là sử dụng đơn giản, chỉ cần một bước lập tỷ lệ và một bước trừ 2 đỉnh của phổ tỷ lệ.

So với phương pháp quang phổ đạo hàm thì 2 phương pháp này không phải tìm một bước sóng thích hợp tương ứng với điểm giao nhau với hợp chất gây nhiễu [8]. Hoặc một số hợp chất còn phải sử dụng đạo hàm bậc cao (3 hoặc 4) để xác định một chất mà không bị nhiễu từ chất kia [9]. Với phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao thì dung môi đắt tiền, điều kiện phân tích phức tạp, nhưng đây vẫn là phương pháp thường được sử dụng trong Dược điển của các nước trên thế giới [10]. Có thể thấy rằng, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ rất phù hợp để phân tích kiểm soát chất lượng thường quy của các hợp chất thương mại trong các phòng kiểm soát chất lượng ở các công ty sản xuất dược phẩm, cũng như ở các trung tâm kiểm nghiệm thuốc và mỹ phẩm các tỉnh, thành phố.

5. Kết luận

Có thể nhận thấy rằng, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ là đơn giản, chính xác, có tính chọn lọc và hoàn toàn có thể được sử dụng để xác định nồng độ các chất trong

một hỗn hợp gồm 2 thành phần. Phương pháp tỷ lệ hấp thụ cũng có thể dùng để xác định nồng độ các chất trong một hỗn hợp gồm 2 thành phần nhưng các phép tính toán phức tạp, độ chính xác không cao. Trong phương pháp tỷ lệ hấp thụ sử dụng 2 bước sóng: một là bước sóng có độ hấp thụ cực đại của một chất, bước sóng thứ 2 là ở bước sóng mà 2 chất ở cùng nồng độ có độ hấp thụ bằng nhau. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ sử dụng 2 bước sóng là đỉnh đến đáy hoặc là 2 bước sóng bất kỳ. Ưu điểm lớn của phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ là có thể lựa chọn 2 bước sóng bất kỳ để xét hiệu biên độ, thừa số chia của tỷ lệ cũng có nhiều lựa chọn. Ngoài ra, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ có thể sử dụng được trong điều kiện các phòng thí nghiệm thiếu các dụng cụ sắc ký đắt tiền, hợp chất phân tích không cần chiết tách phức tạp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Fares, J.J. Dinicolantonio, J.H. O'keefe, et al. (2016), "Amlodipine in hypertension: A first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes", *Open Heart*, **3**(2), DOI: 10.1136/openhrt-2016-000473.
- [2] T. Elsaman, E. Ibrahim, M.E. Adam (2020), "Development and validation of uv-spectrophotometric method for the determination of Atorvastatin calcium using sodium citrate as hydrotropic agent", *Pharm. Chem. J.*, **54**(4), pp.422-429, DOI: 10.1007/s11094-020-02214-x.
- [3] N. Shulyak, M. Piponski, S. Kovalenko, et al. (2021), "Development of a novel, fast, simple HPLC method for determination of Atorvastatin and its impurities in tablets", *Sci. Pharm.*, **89**(2), DOI: 10.3390/scipharm89020016.
- [4] H. Danafar, M. Hamidi (2016), "Method validation of Amlodipine and Atorvastatin by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method in human plasma", *Cogent Med.*, **3**(1), DOI: 10.1080/2331205X.2015.1129790.
- [5] E.S. Elzanfaly, A.S. Saadn, A.E.B.A. Elaleem (2012), "A smart simple spectrophotometric method for simultaneous determination of binary mixtures", *J. Pharm. Anal.*, **2**(5), pp.382-385, DOI: 10.1016/j.jpha.2012.04.004.
- [6] H.M. Lotfy, M.A.M. Hegazy (2013), "Simultaneous determination of some cholesterol-lowering drugs in their binary mixture by novel spectrophotometric methods", *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **113**, pp.107-114, DOI: 10.1016/j.saa.2013.04.064.
- [7] P. Borman, D. Elder (2017), "Q2(R1) validation of analytical procedures", *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*, pp.127-166, DOI: 10.1002/9781118971147.ch5.
- [8] E.H. Mohamed, H.M. Lotfy, M.A. Hegazy, et al. (2017), "Different applications of isosbestic points, normalized spectra and dual wavelength as powerful tools for resolution of multicomponent mixtures with severely overlapping spectra", *Chem. Cent. J.*, **11**(1), DOI: 10.1186/s13065-017-0270-8.
- [9] C.M.E. Maraghy, E.H. Mohamed (2018), "Successive stability indicating spectrophotometric technique for simultaneous determination of quetiapine fumarate and its three major related compounds", *Curr Anal. Chem.*, **16**(4), pp.447-455, DOI: 10.2174/1573411014666180709145526.
- [10] K. Peleshok, M. Piponski, E.A. Ajie, et al. (2021), "Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment", *Pharmacia*, **68**(1), pp.43-51, DOI: 10.3897/pharmacia.68.e53631.

Các yếu tố ảnh hưởng đến sự hài lòng của người bệnh với chất lượng khám chữa bệnh tại các bệnh viện công ở TP Hồ Chí Minh

Nguyễn Thị Ngọc Phương^{1*}, Nguyễn Thị Cẩm Hồng², Nguyễn Thị Hồng Thúy³, Nguyễn Thanh Phong²

¹Trường Đại học Tiền Giang, 119 ấp Bắc, phường 5, TP Mỹ Tho, tỉnh Tiền Giang, Việt Nam

²Bệnh viện Chợ Rẫy, TP Hồ Chí Minh, 201B Nguyễn Chí Thanh, phường 12, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trung tâm Y tế Quận 3, 116 Trần Quốc Thảo, phường 14, quận 3, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 19/7/2021; ngày chuyển phản biện 22/7/2021; ngày nhận phản biện 12/8/2021; ngày chấp nhận đăng 16/8/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu xác định và đo lường các yếu tố ảnh hưởng đến sự hài lòng (SHL) của người bệnh về chất lượng khám chữa bệnh (KCB) ở các bệnh viện công tại TP Hồ Chí Minh. Dữ liệu được thu thập từ 369 người bệnh đến KCB tại các bệnh viện công thông qua bảng hỏi được thiết kế sẵn bằng phương pháp chọn mẫu thuận tiện. Các thống kê mô tả, đánh giá độ tin cậy qua hệ số Cronbach's Alpha, phân tích nhân tố khám phá (EFA) và phân tích hồi quy đa biến đã được sử dụng. Kết quả cho thấy, có 6 yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh với chất lượng khám chữa bệnh tại các bệnh viện công trên địa bàn TP Hồ Chí Minh, được sắp xếp theo thứ tự từ cao xuống thấp như sau: (1) Sự quan tâm phục vụ người bệnh (QT), (2) Cơ sở vật chất (VC), (3) Chi phí khám chữa bệnh (CP), (4) Thủ tục khám chữa bệnh (TT), (5) Hiệu quả công tác khám chữa bệnh (HQ) và (6) Các dịch vụ hỗ trợ (DV). Từ đó, nhóm tác giả đề xuất một số giải pháp giúp nâng cao SHL của người bệnh khi đến KCB tại các bệnh viện công ở TP Hồ Chí Minh, đồng thời cung cấp thêm bằng chứng giúp Bộ Y tế hiệu chỉnh bộ công cụ khảo sát SHL của người bệnh phù hợp hơn trong bối cảnh hiện nay.

Từ khóa: các bệnh viện công, sự hài lòng của người bệnh, TP Hồ Chí Minh, yếu tố ảnh hưởng.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

KCB là một trong những nhiệm vụ quan trọng bậc nhất của bệnh viện công lẫn bệnh viện tư [1]. Chất lượng dịch vụ KCB là mức độ đạt được các mục tiêu cơ bản của bệnh viện và khả năng đáp ứng kỳ vọng của người bệnh [2]. Chất lượng KCB tốt, dịch vụ y tế an toàn, thủ tục đơn giản, chi phí phù hợp và hiệu quả trong công tác KCB sẽ mang lại SHL cho nhiều người bệnh [3-5]. Để thực hiện nhiệm vụ này, các bệnh viện cần có đội ngũ nhân sự chuyên nghiệp, trang thiết bị bảo đảm an toàn, tổ chức chặt chẽ... [6, 7].

Là một trong những đơn vị đi đầu cả nước về lĩnh vực cung cấp các dịch vụ y tế như chăm sóc sức khỏe, công tác KCB, đào tạo nguồn nhân lực y tế, TP Hồ Chí Minh tập trung ở 25 bệnh viện, 2 viện và 1 trung tâm công hạng I; 23 bệnh viện và 3 trung tâm công hạng II; 5 bệnh viện và khu điều trị công hạng III và 3 bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế. Ngoài ra, có 56 bệnh viện tư với 4.222 giường bệnh [8]. Kể từ năm 2017, hơn 50 bệnh viện tại TP Hồ Chí Minh đang dần thực hiện mô hình tự chủ tài chính [9] nhưng vẫn xem quản lý chất lượng dịch vụ KCB là nhiệm vụ trọng tâm, thường xuyên, liên tục cải tiến trên cơ sở pháp luật, khoa học, đáp ứng nhu cầu nâng cao chất lượng bệnh viện. Trong những năm gần đây, các bệnh viện công trên địa bàn TP Hồ

Chí Minh xác định SHL của người bệnh là thước đo chất lượng các dịch vụ bệnh viện, từng bước đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của người bệnh [10]. Hệ thống các bệnh viện công tại TP Hồ Chí Minh có sự cải thiện rõ rệt, số lượt KCB năm 2019 vượt hơn 50 triệu lượt (tăng 12,1% so với năm 2018) [11], tuy nhiên cũng còn tồn tại nhiều bất cập, ảnh hưởng đến SHL của người bệnh như cách giao tiếp, ứng xử của nhân viên bệnh viện, trang thiết bị hỗ trợ, trình độ năng lực và tay nghề của đội ngũ y, bác sĩ, thủ tục KCB... [7, 12].

Có thể nói, sự gia tăng nhanh chóng số lượng bệnh viện tư hiện nay là hồi chuông cảnh tỉnh cho các bệnh viện công trong việc cung cấp các dịch vụ y tế, đặc biệt là nâng cao chất lượng dịch vụ KCB, làm hài lòng và thu hút nhiều người bệnh sử dụng dịch vụ bệnh viện. Tuy nhiên, các nghiên cứu để xác định những yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh với chất lượng KCB một cách bài bản, nghiêm túc và khoa học còn hạn chế. Do vậy, nghiên cứu này là hết sức cần thiết, đúng theo tinh thần của Bộ Y tế “các bệnh viện phải thường xuyên đánh giá SHL của người bệnh”, từ đó đề xuất một số giải pháp nhằm nâng cao chất lượng KCB tại các bệnh viện công trên địa bàn TP Hồ Chí Minh, đồng thời nghiên cứu và cung cấp thêm bằng chứng giúp Bộ Y tế hiệu chỉnh bộ công cụ khảo sát SHL của người bệnh phù hợp hơn với bối cảnh hiện nay.

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

Factors affecting patient satisfaction with the quality of medical examination and treatment of public hospitals in Ho Chi Minh city

Thi Ngoc Phuong Nguyen^{1*}, Thi Cam Hong Nguyen²,
Thi Hong Thuy Nguyen³, Thanh Phong Nguyen²

¹Tien Giang University, 119 Bac Hamlet,
Ward 5, My Tho City, Tien Giang Province, Vietnam

²Cho Ray Hospital, Ho Chi Minh City, 201B Nguyen Chi Thanh Street, Ward
12, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Health Centre District 3, Ho Chi Minh City,
116 Tran Quoc Thao Street, Ward 14, District 3, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 19 July 2021; revised 12 August 2021; accepted 16 August 2021

Abstract:

The research identified the factors affecting patient satisfaction with the quality of medical examination and treatment of public hospitals in Ho Chi Minh city. Data was collected from 369 patients who used medical examination and treatment services in public hospitals through a pre-designed questionnaire using the convenient sampling method. Descriptive statistical methods, reliability testing through Cronbach's Alpha, exploratory factor analysis (EFA), and multiple linear regression were used in this study. Research results showed that six factors affecting patient satisfaction with the quality of medical examination and treatment at public hospitals in Ho Chi Minh city are arranged in order from the highest to lowest as follows: (1) respect and caring, (2) facilities, (3) costs of medical examination and treatment, (4) medical examination and treatment procedures, (5) effectiveness of medical examination and treatment, and (6) other support services. As a result, the research raised some solutions to help improve patient satisfaction with medical examination and treatment of public hospitals in Ho Chi Minh city and provided more evidence to assist the Ministry of Health to enhance the Patient Experience Survey Toolkit more appropriately in the current context.

Keywords: factors affecting, Ho Chi Minh city, patient satisfaction, public hospitals.

Classification number: 3.5

2. Cơ sở lý thuyết và mô hình nghiên cứu

2.1. Cơ sở lý thuyết

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), bệnh viện là cơ sở cung cấp các dịch vụ y tế như khám, điều trị, chăm sóc, bảo vệ sức khỏe của người bệnh và là nơi đào tạo nhân lực phục vụ lĩnh vực y tế. Chất lượng KCB là một trong những dịch vụ y tế, là kết quả của các hoạt động tương tác giữa bệnh viện và người bệnh, không chỉ đáp ứng nhu cầu về sức khỏe cho người bệnh [6] mà còn giúp bệnh viện tồn tại và phát triển [12]. Mức độ hài lòng của người bệnh với chất lượng KCB là những đánh giá dựa vào việc sử dụng dịch vụ tại bệnh viện [13], là sự so sánh giữa giá trị mong đợi trước khi sử dụng dịch vụ với giá trị nhận được trong khi sử dụng dịch vụ của người bệnh [14]. SHL của người bệnh là kết quả tổng hợp của chất lượng dịch vụ y tế, trong đó, chất lượng KCB là yếu tố quyết định sự thành bại của bệnh viện. Do đó, việc xác định các yếu tố ảnh hưởng và đo lường mức độ hài lòng với chất lượng KCB của người bệnh tại các bệnh viện công là rất quan trọng.

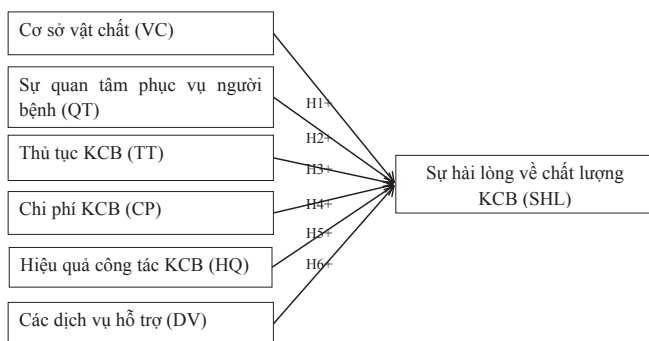
Các nghiên cứu trước đây cho thấy, SHL của người bệnh phụ thuộc rất nhiều vào các yếu tố như nhân viên, lãnh đạo, thông tin, tính hợp lý của viện phí... P.T.H. Ha và cs (2012) [6] cho rằng, chất lượng dịch vụ y tế bao gồm 2 yếu tố: kỹ thuật và chức năng. Tuy nhiên, nghiên cứu chỉ tập trung vào chất lượng chức năng của dịch vụ y tế tại bệnh viện công Việt Nam - Cu Ba Đồng Hới. Theo đó, có 6 yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh: cơ sở vật chất - kỹ thuật của bệnh viện, quy trình KCB, đội ngũ cán bộ y tế, hiệu quả công tác KCB, các dịch vụ hỗ trợ và chi phí KCB. L.T. Chien và cs (2014) [12] đã tiến hành nghiên cứu tại các bệnh viện đa khoa hạng I thuộc Sở Y tế TP Hồ Chí Minh. Kết quả cho thấy, có 7 yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh: cơ sở vật chất, thủ tục hành chính, bác sỹ điều trị, điều dưỡng chăm sóc, vệ sinh, an ninh và trật tự. N.Q. Nghi (2011) [4] nghiên cứu tại các bệnh viện công trên địa bàn Cần Thơ cho rằng, SHL của người bệnh về chất lượng KCB phụ thuộc vào 3 yếu tố: trách nhiệm, sự đảm bảo và đặc biệt là khả năng đáp ứng. T.T.H. Thao (2018) [15] cho rằng, có 6 yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng dịch vụ KCB, tác động dương đến SHL tại Bệnh viện Đa khoa Bà Rịa: sự phù hợp của dịch vụ, thông tin liên lạc, thời gian dành cho cuộc khám, hiệu quả của việc thanh toán viện phí, sự tôn trọng và chu đáo, sự hiệu quả và liên tục.

2.2. Mô hình và giả thuyết nghiên cứu

Dựa vào kết quả nghiên cứu định tính trước đó và các yếu tố ảnh hưởng đến SHL với chất lượng KCB tại các bệnh viện trong mô hình nghiên cứu của P.T.H. Ha và cs (2012) [6], L.T. Chien và cs (2014) [12], chúng tôi đề xuất mô hình SHL của người bệnh với chất lượng KCB tại các bệnh viện

công trên địa bàn TP Hồ Chí Minh (hình 1). Theo đó, thang đo lường các yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh về chất lượng KCB tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh bao gồm 29 biến (5 biến cơ sở vật chất, 5 biến sự quan tâm phục vụ người bệnh, 5 biến thủ tục KCB, 4 biến chi phí KCB, 5 biến hiệu quả công tác KCB, 5 biến các dịch vụ hỗ trợ) và 5 biến SHL của người bệnh.

Từ hình 1, 6 giả thuyết được phát triển, cụ thể như sau:
- Giả thuyết 1 (H1): VC ảnh hưởng tích cực đến SHL.



Hình 1. Mô hình nghiên cứu đề xuất.

- Giả thuyết 2 (H2): QT ảnh hưởng tích cực đến SHL.
- Giả thuyết 3 (H3): TT ảnh hưởng tích cực đến SHL.
- Giả thuyết 4 (H4): CP ảnh hưởng tích cực đến SHL.
- Giả thuyết 5 (H5): HQ ảnh hưởng tích cực đến SHL.
- Giả thuyết 6 (H6): DV ảnh hưởng tích cực đến SHL.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu: đối tượng nghiên cứu là người bệnh hoặc thân nhân người bệnh đi KCB ngoại trú, đã sử dụng dịch vụ KCB tại các bệnh viện công ở TP Hồ Chí Minh. Vị trí khảo sát là khi người bệnh ngồi chờ nhận thuốc tại nhà thuốc. Hiện nay, bệnh viện công tại TP Hồ Chí Minh được sắp xếp theo thứ hạng về chất lượng dịch vụ, có 28 bệnh viện hạng I, 25 bệnh viện hạng II và 5 bệnh viện, khu điều trị hạng III. Ngoài ra, trên địa bàn TP Hồ Chí Minh còn có 3 bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế [11]. Để kết quả khảo sát không có sự chênh lệch giữa các bệnh viện, có độ tin cậy cao, đề tài xem xét nghiên cứu các bệnh viện công thuộc hạng I, II và các bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế. Thời gian khảo sát từ 12/2020 đến 4/2021.

Phương pháp nghiên cứu: phương pháp mô tả cắt ngang có phân tích được sử dụng. Theo J. Hair và cs (2006) [16], H. Trong và cs (2008) [17] cỡ mẫu phụ thuộc vào phương pháp phân tích. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp phân tích nhân tố khám phá (EFA), hồi quy đa biến nên lượng mẫu tối thiểu gấp 5 lần số biến quan sát. Nghiên cứu có 34 biến quan sát nên cỡ mẫu tối thiểu là $34 \times 5 = 170$ quan sát. Tuy nhiên, để đảm bảo độ tin cậy của bộ dữ liệu, phòng ngừa sai sót và tăng tính đại diện, nghiên cứu khảo sát cỡ

mẫu là 390 người bệnh đại diện cho tổng thể những người bệnh đến KCB tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh.

Tiêu chuẩn chọn mẫu: chúng tôi sử dụng phương pháp lấy mẫu định ngạch và thuận tiện. Năm 2020, tổng số lượt khám và điều trị ngoại trú tại các bệnh viện hạng I đạt gần 16 triệu lượt (chiếm 51,6%); bệnh viện hạng II đạt gần 10 triệu (chiếm 32,3%) và các bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế đạt khoảng 5 triệu lượt (chiếm 16,1%). Dựa vào tỷ lệ số lượt KCB ở 3 nhóm bệnh viện, với 390 mẫu, nghiên cứu sẽ khảo sát 200 mẫu ở các bệnh viện hạng I, 130 mẫu ở các bệnh viện hạng II và 60 mẫu ở các bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế. Sau khi xác định cỡ mẫu, chúng tôi sử dụng phương pháp chọn mẫu phi xác suất theo hình thức thuận tiện để chọn các bệnh viện cần phỏng vấn. Vì hạn chế về thời gian, nhân lực nên chỉ tiến hành khảo sát 10/28 bệnh viện hạng I, 7/25 bệnh viện hạng II và 3/3 bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế đại diện cho tổng thể. Bệnh viện hạng I và bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế, nghiên cứu khảo sát 20 mẫu/bệnh viện, riêng bệnh viện hạng II, khảo sát 130 mẫu/7 bệnh viện. Kết quả thu về đầy đủ 390 mẫu, đạt tỷ lệ hồi đáp chung 100%.

Công cụ thu thập thông tin: kết quả nghiên cứu định tính dùng để hiệu chỉnh bảng hỏi, đề tài sử dụng bảng hỏi này để thu thập thông tin từ các người bệnh hoặc thân nhân người bệnh, mỗi đối tượng tương ứng với 1 phiếu khảo sát.

Phương pháp phân tích: phân tích tổng hợp lý thuyết, phân loại hệ thống lý thuyết nhằm đề xuất mô hình nghiên cứu và để kiểm định thang đo, phương pháp định lượng bằng cách sử dụng các công cụ phân tích như hệ số tin cậy Cronbach's Alpha, phân tích các nhân tố khám phá EFA (exploratory factor analysis), phân tích hồi quy tuyến tính để xem xét mối quan hệ giữa các biến quan sát. Dữ liệu được mã hóa và làm sạch thông qua phần mềm SPSS 20.0.

Thang đo Likert 5 mức độ (1: hoàn toàn không đồng ý; 2: không đồng ý; 3: không có ý kiến; 4: đồng ý; 5: hoàn toàn đồng ý) để đo lường 29 biến quan sát, bao gồm: cơ sở vật chất (5 biến quan sát), sự quan tâm phục vụ người bệnh (5 biến quan sát), thủ tục KCB (5 biến quan sát), chi phí KCB (4 biến quan sát), hiệu quả công tác KCB (5 biến quan sát), các dịch vụ hỗ trợ (5 biến quan sát) và 5 biến quan sát về SHL chung của người bệnh.

Sai số và cách khắc phục: sai số xảy ra có thể do cỡ mẫu nhỏ, xử lý số liệu, điều tra viên, thiếu thông tin... Để hạn chế các sai số này, nghiên cứu đã sử dụng cỡ mẫu đủ lớn, giám sát chặt chẽ quá trình thu thập số liệu, theo dõi và kiểm tra khâu xử lý số liệu, thống nhất cách thu thập thông tin của tất cả các điều tra viên. Ngoài ra, có thể kiểm tra ngẫu nhiên các thông tin đã thu thập, nếu phát hiện sai sót trong các bảng hỏi, yêu cầu khảo sát lại. Trong quá trình thu thập số liệu, có sự giám sát và hỗ trợ thường xuyên của nghiên cứu viên.

Đạo đức nghiên cứu: trước khi khảo sát người bệnh và thân nhân người bệnh, nhóm nghiên cứu giải thích về mục đích nghiên cứu và đây là phiếu khảo sát tự nguyện, đối tượng khảo sát có thể từ chối tham gia nghiên cứu. Các thông tin từ người bệnh luôn được bảo mật, thông tin thu được hoàn toàn trung thực, khách quan và chỉ được sử dụng cho mục đích của nghiên cứu này.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm mẫu nghiên cứu

Tổng cộng có 390 người bệnh đồng ý tham gia trả lời bảng câu hỏi, trong đó có 21 bảng hỏi trả lời không đạt yêu cầu, còn lại 369/390 bảng hỏi được sử dụng cho quá trình phân tích dữ liệu (chiếm 94,62%), đáp ứng cỡ mẫu tối thiểu nghiên cứu. Đặc điểm mẫu thu thập được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm mẫu khảo sát.

n=369		Số lượng (người)	Tỷ lệ (%)
Giới tính	Nam	154	41,7
	Nữ	215	58,3
Tuổi	Tuổi từ 20-35	46	12,5
	Tuổi từ 36-55	127	34,4
	Tuổi >55	196	53,1
Trình độ	Từ lớp 12 trở xuống	179	48,5
	Trung cấp/Cao đẳng/Đại học	104	28,2
	Trên đại học	86	23,3
Thu nhập	<3 triệu	138	37,4
	3-6 triệu	182	49,3
	>6 triệu	49	13,3

3.2. Kiểm định độ tin cậy của thang đo

Hệ số Cronbach's Alpha được sử dụng, các biến có hệ số tương quan biến - tổng nhỏ hơn mức quy định (<0,3) sẽ bị loại, các yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh bao gồm 34 biến quan sát và thang đo được chọn khi có độ tin cậy Alpha >0,6 [18].

Bảng 2. Kết quả kiểm định độ tin cậy của thang đo.

STT	Thang đo	Số quan sát	Hệ số Cronbach's Alpha	Hệ số tương quan biến - tổng nhỏ nhất
1	Cơ sở vật chất	5	0,918	0,703
2	Sự quan tâm phục vụ người bệnh	5	0,920	0,688
3	Thủ tục KCB	5	0,916	0,715
4	Chi phí KCB	4	0,912	0,786
5	Hiệu quả công tác KCB	5	0,902	0,727
6	Các dịch vụ hỗ trợ	5	0,921	0,671
7	Sự hài lòng của người bệnh	5	0,852	0,645

Kết quả kiểm định độ tin cậy thông qua hệ số Cronbach's Alpha của 7 thang đo trong mô hình đều >0,6 và tương quan biến - tổng đều >0,3 [18] (bảng 2). Do đó, 34 biến quan sát này đủ điều kiện để đưa vào phân tích nhân tố.

3.3. Phân tích nhân tố khám phá (EFA)

Phân tích nhân tố EFA nhằm chọn lọc các yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất đến mức độ hài lòng của bệnh nhân. Tiêu chuẩn để chấp nhận các biến đo lường khi tổng phương sai trích $\geq 50\%$, $0,5 < \text{KMO} < 1$ và các biến phải có trọng số $\geq 0,4$ [19].

Bảng 3. Kết quả phân tích nhân tố EFA các biến độc lập.

Yếu tố	Mã hóa	Thành phần	Hệ số tải nhân tố					
			1	2	3	4	5	6
Cơ sở vật chất	VC2	Thiết bị máy móc hiện đại	0,805					
	VC4	Cung ứng đầy đủ điện nước	0,803					
	VC3	Đủ ghế ngồi chờ	0,801					
	VC1	Bệnh viện luôn sạch sẽ	0,797					
	VC5	Môi trường thoáng mát	0,788					
Sự quan tâm phục vụ bệnh nhân	QT1	Nhân viên nhiệt tình, vui vẻ	0,889					
	QT4	Bác sỹ khám bệnh tận tình	0,878					
	QT5	Đổi xử công bằng với người bệnh	0,853					
	QT3	Sẵn sàng giúp đỡ người bệnh	0,837					
	QT2	Cung cấp đầy đủ thông tin	0,810					
Thủ tục KCB	TT4	Tổ chức hướng dẫn, đón tiếp người bệnh		0,823				
	TT3	Thủ tục khám bệnh		0,820				
	TT2	Thủ tục nhập viện		0,801				
	TT1	Thủ tục chuyển viện		0,762				
	TT5	Thủ tục thanh toán		0,742				
Chi phí KCB	CP4	Chi phí khám và điều trị			0,787			
	CP3	Chi phí xét nghiệm			0,773			
	CP2	Chi phí thuốc			0,748			
	CP1	Chi phí ăn uống			0,719			
Hiệu quả công tác KCB	HQ5	Kết quả chuẩn đoán				0,942		
	HQ4	Phương pháp điều trị				0,918		
	HQ2	Mức độ chữa khỏi bệnh				0,837		
	HQ1	Thời gian điều trị				0,832		
	HQ3	Đơn thuốc kê phù hợp				0,782		
Các dịch vụ hỗ trợ	DV2	Vật dụng cá nhân					0,854	
	DV5	Vật tư y tế đầy đủ					0,826	
	DV4	Cung ứng thuốc					0,802	
	DV1	Dịch vụ ăn uống					0,729	
	DV3	Dịch vụ mua thuốc					0,647	
KMO			0,879					
Bartlett's Test of Sphericity (Sig)			0,000					
Tổng phương sai trích (%)			74,518					

Kết quả phân tích nhân tố khám phá (EFA) cho 29 biến độc lập với hệ số KMO=0,879>0,5 ($0,5 \leq KMO \leq 1$), mức ý nghĩa Sig.=0,000, hệ số tải nhân tố >0,5 cho thấy phân tích nhân tố là thích hợp. Với 29 biến mô hình tập hợp thành 6 yếu tố có tổng phương sai trích >50% (74,518%), cho biết 6 yếu tố này giải thích được 74,518% biến thiên của dữ liệu, phương sai rút đạt chuẩn, thang đo được chấp nhận (bảng 3).

Bảng 4. Kết quả EFA thang đo SHL.

Mã hóa	Thành phần	Hệ số tải nhân tố
SHL2	Tôi rất hài lòng khi KCB tại đây	0,893
SHL5	Tôi sẽ ở quay trở lại bệnh viện nếu KCB	0,872
SHL3	Tôi sẽ giới thiệu bạn bè đến KCB tại bệnh viện	0,851
SHL4	Tôi hài lòng với các dịch vụ hỗ trợ	0,798
SHL1	Rất thoải mái khi vào KCB tại bệnh viện	0,775
KMO		0,834
Bartlett's Test of Sphericity (Sig)		0,000
Tổng phương sai trích (%)		86,31

Kết quả phân tích EFA cho 5 biến phụ thuộc SHL của người bệnh về chất lượng KCB có hệ số KMO=0,834>0,5 ($0,5 \leq KMO \leq 1$), mức ý nghĩa Sig.=0,000, nghĩa là phân tích nhân tố là thích hợp. Giá trị Eigenvalue là 2,18 (>1), các hệ số tải nhân tố của các biến quan sát đều >0,5, thang đo đạt yêu cầu, 5 biến quan sát được trích thành 1 nhóm với tổng phương sai trích =86,31%>50%, thang đo được chấp nhận. Tóm lại, tất cả các biến quan sát đại diện cho các khái niệm nghiên cứu có độ tin cậy cao, hoàn toàn phù hợp cho phân tích tiếp theo.

3.4. Kết quả phân tích hồi quy đa biến

Phân tích hồi quy đa biến được thực hiện nhằm kiểm định các giả thuyết nghiên cứu, đo lường mức độ ảnh hưởng của các yếu tố đến SHL của người bệnh về chất lượng KCB tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh.

3.5. Kiểm định giả thuyết

Để kiểm định sự phù hợp giữa các biến độc lập ảnh hưởng đến biến phụ thuộc là SHL với chất lượng KCB, hàm hồi quy đa biến với phương pháp rút trích Enter được sử dụng. Kết quả hồi quy đa biến cho thấy, mô hình có hệ số xác định R^2 hiệu chỉnh là 0,812, nghĩa là 81,2% biến thiên SHL của người bệnh về chất lượng KCB trên địa bàn TP Hồ Chí Minh được giải thích bởi 6 biến độc lập, còn lại là do các yếu tố khác chưa được nghiên cứu. Kết quả kiểm định giá trị thống kê F, với Sig.=0,000 (<0,05) cho thấy mô hình hồi quy đa biến đã xây dựng phù hợp với tập dữ liệu ở độ tin cậy 95%.

Bảng 5. Kết quả mô hình hồi quy đa biến.

Nhân tố	Hệ số Beta (β) chưa chuẩn hóa	Hệ số Beta (β) chuẩn hóa	Giá trị t	Giá trị Sig.	Hệ số phóng đại phương sai - VIF
(Hằng số)	-2,128		-7,112	0,000	
VC	0,202	0,129	3,323	0,002	1,386
QT	0,283	0,236	5,346	0,000	1,772
TT	0,178	0,105	2,508	0,012	1,612
CP	0,195	0,145	3,061	0,002	2,127
HQ	0,193	0,162	3,141	0,000	2,251
DV	0,136	0,101	2,110	0,032	2,084

Kết quả mô hình hồi quy đa biến có thể khẳng định các biến độc lập này có ý nghĩa. Theo đó, cơ sở vật chất (VC), sự quan tâm phục vụ người bệnh (QT), thủ tục KCB (TT), chi phí KCB (CP), hiệu quả công tác KCB (HQ) và các dịch vụ hỗ trợ (DV) đều có ý nghĩa thống kê (Sig.<0,05) và hệ số β (+) (bảng 5). Điều này chứng tỏ các biến độc lập ảnh hưởng thuận chiều với biến phụ thuộc (SHL) và hoàn toàn phù hợp với các giả thuyết đặt ra ban đầu. Sự ảnh hưởng này theo trình tự sau: QT ($\beta=0,283$), VC ($\beta=0,202$), CP ($\beta=0,195$), HQ ($\beta=0,193$), TT ($\beta=0,178$) và DV ($\beta=0,136$). Các biến đều có hệ số phóng đại phương sai VIF<10, điều này chứng tỏ không có hiện tượng đa cộng tuyến trong mô hình. Như vậy, các giả thuyết từ H1, H2, H3, H4, H5, H6 đặt ra được chấp nhận. Phương trình hồi quy đa biến thể hiện các yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh về chất lượng dịch vụ KCB tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh có dạng:

$$SHL = -2,128 + 0,283*QT + 0,202*VC + 0,195*CP + 0,193*HQ + 0,178*TT + 0,136*DV$$

3.6. Bàn luận và đề xuất

Dựa vào các lý thuyết về chất lượng dịch vụ bệnh viện, SHL của người bệnh về chất lượng KCB, kết quả nghiên cứu sơ bộ các chuyên gia, các nhà quản lý bệnh viện và tình hình thực tế tại các bệnh viện công, có 6 yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh về chất lượng KCB tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có sự nhất quán so với kỳ vọng ban đầu đặt ra cho đề tài, các yếu tố cơ sở vật chất (VC), sự quan tâm phục vụ người bệnh (QT), thủ tục KCB (TT), chi phí KCB (CP), hiệu quả công tác KCB (HQ) và các dịch vụ hỗ trợ (DV) ảnh hưởng tích cực đến SHL của người bệnh. Tuy nhiên, kết quả ảnh hưởng của các yếu tố này so với kỳ vọng ban đầu có thay đổi về vị trí, cụ thể: sự quan tâm phục vụ người bệnh (QT) là yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến SHL của người bệnh ($\beta=+0,283$), yếu tố thứ hai là cơ sở vật chất phục vụ người bệnh (VC) ($\beta=+0,202$), chi phí KCB (CP) là yếu tố ảnh hưởng thứ ba ($\beta=+0,195$), hiệu quả công tác KCB (HQ) là yếu tố thứ tư ($\beta=+0,193$), thủ tục KCB đứng thứ năm ảnh hưởng đến SHL của người bệnh ($\beta=0,178$) và các dịch vụ hỗ trợ ($\beta=0,136$) là yếu tố cuối cùng ảnh hưởng đến SHL của người bệnh đối với chất lượng KCB tại các bệnh viện công trên địa bàn

TP Hồ Chí Minh. Hệ số hồi quy β của các biến độc lập đều mang dấu (+), do vậy khi các biến độc lập QT, VC, CP, TT, HQ và DV tăng sẽ làm tăng SHL của người bệnh đối với chất lượng KCB tại các bệnh viện công trên địa bàn TP Hồ Chí Minh.

Mặc dù số biến độc lập và tên gọi của các biến ảnh hưởng đến SHL về chất lượng KCB có sự khác biệt so với những nghiên cứu của các học giả khác, nhưng nhìn chung, kết quả nghiên cứu về các yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh về chất lượng KCB tại các bệnh viện công trên địa bàn TP Hồ Chí Minh có sự tương đồng với các nghiên cứu trước đó của V. Sower và cs (2001) [3], N.Q. Nghi (2011) [4], P.T.H. Ha và cs (2012) [6], G. Kamyar và cs (2014) [5], L.T. Chien và cs (2014) [12].

Dựa vào những kết quả thu được, nghiên cứu này đề xuất một số giải pháp như sau:

- Sự quan tâm, phục vụ người bệnh: nhân viên nhiệt tình, vui vẻ, bác sỹ khám tận tình, đối xử công bằng, sẵn sàng giúp đỡ người bệnh có ảnh hưởng rất lớn đến SHL của người bệnh. Vì vậy, đội ngũ nhân viên y tế tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh cần rèn luyện thêm các kỹ năng liên quan (kỹ năng giao tiếp, thuyết phục và xử lý phản đối...). Để làm được điều này, các bệnh viện nên thường xuyên tổ chức các lớp tập huấn, đào tạo, cũng như nhắc nhở trong cuộc họp, giao ban bệnh viện, giáo dục ý thức cho nhân viên, cam kết thi đua thực hành ứng xử và giao tiếp nhằm xây dựng văn hóa, văn minh, lịch sự trong mỗi bệnh viện, thay đổi thái độ và hành vi của nhân viên, giúp họ hiểu rõ SHL của người bệnh có tác động rất lớn đến sự tồn tại và phát triển của bệnh viện.

- Cơ sở vật chất phục vụ bệnh nhân: thiết bị máy móc hiện đại, điện, nước, ghế ngồi chờ đầy đủ và môi trường thoáng mát, sạch sẽ là các biến rất quan trọng ảnh hưởng đến SHL của người bệnh. Bên cạnh môi trường sạch sẽ, thoáng mát, bệnh nhân rất cần hệ thống trang thiết bị y tế phục vụ KCB hiện đại, bảo đảm kết quả có độ tin cậy cao. Do đó, đòi hỏi các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh phải có một hệ thống bảo trì, bảo quản và vận hành tốt các loại trang thiết bị. Ngoài ra, các bệnh viện có thể đầu tư trang thiết bị, máy móc y tế hiện đại, cải tạo, nâng cấp cơ sở vật chất luôn trong trạng thái sẵn sàng hoạt động phục vụ người bệnh.

- Chi phí KCB: những người bệnh được khảo sát cho rằng các chi phí khám, xét nghiệm, thuốc, ăn uống là những chi phí mà họ quan tâm nhất. Trong đó, chi phí KCB là chi phí ảnh hưởng nhiều nhất đến SHL của họ. Do vậy, các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh hiện nay nên rõ ràng, cụ thể, minh bạch trong giá viện phí và các dịch vụ KCB, phải niêm yết công khai các biểu phí ở nơi dễ nhìn thấy nhất. Bên cạnh đó, bệnh viện cần phối hợp với căn tin để cung cấp khẩu

phần ăn phù hợp, đảm bảo dinh dưỡng cho người bệnh với mức giá hợp lý.

- Hiệu quả công tác KCB: kết quả chẩn đoán, phương pháp điều trị, mức độ khỏi bệnh, thời gian điều trị và đơn thuốc phù hợp là những biến liên quan đến chuyên môn ảnh hưởng nhiều đến SHL của người bệnh. Các bệnh viện công nên cho nhân viên tham gia đào tạo, bổ sung kiến thức liên tục do Bộ, Sở Y tế tổ chức; tham gia diễn đàn của các y, bác sỹ có kinh nghiệm chia sẻ trực tuyến trên các trang mạng uy tín. Bên cạnh đó, bản thân mỗi nhân viên cũng phải tự trau dồi, nâng cao hiểu biết để tư vấn và hỗ trợ người bệnh.

- Thủ tục KCB: kết quả khảo sát cho thấy, các bệnh viện công hiện nay đã tổ chức hướng dẫn, hỗ trợ người bệnh tốt hơn. Những người bệnh lớn tuổi có thể tự đi KCB thay vì phải có người nhà dẫn dắt; thủ tục khám, nhập viện, chuyển viện, thanh toán đơn giản dần. Tuy nhiên, mức độ hài lòng đối với yếu tố này vẫn chưa cao (đứng thứ 5/6 yếu tố ảnh hưởng đến SHL của người bệnh ($\beta=0,178$)). Vì vậy, các bệnh viện công cần chuyên môn hóa thủ tục KCB bằng cách gắn nhiều bảng hướng dẫn trên mỗi cửa ra/vào phòng khám, hành lang chờ khám hoặc trước cổng bãi giữ xe, bảng thông báo của bệnh viện... Ngoài ra, trên mỗi phiếu khám có thể in quy trình, thủ tục khám phía sau nhằm tiết kiệm thời gian khi đến KCB.

- Các dịch vụ hỗ trợ: hiện nay trên địa bàn TP Hồ Chí Minh, một số bệnh viện công đã áp dụng công nghệ 4.0 vào KCB (Bệnh viện Chợ Rẫy, Bệnh viện Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Bệnh viện Hòa Hảo...). Người bệnh ở tại nhà lấy số thứ tự khám thông qua app hoặc tổng đài 1080, mọi thông tin sẽ được công khai, minh bạch, không phân biệt thanh toán bảo hiểm y tế. Tuy nhiên, công nghệ này chưa được phổ biến rộng rãi, đặc biệt ở các tuyến quận/huyện. Ngoài ra, các vấn đề về vật tư y tế, cung ứng thuốc, dịch vụ ăn uống cũng chưa làm hài lòng một số người bệnh. Do vậy, các bệnh viện công cần phải thay đổi và hỗ trợ một cách tốt nhất cho người bệnh, có như vậy mới nhận được sự ủng hộ, tăng hiệu quả KCB, tạo nguồn thu nhập vững chắc cho bệnh viện.

Tóm lại, nghiên cứu đã tìm ra 6 yếu tố ảnh hưởng đến SHL với chất lượng KCB tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh, qua đó, làm cơ sở đề xuất giải pháp nâng cao chất lượng bệnh viện, đồng thời cung cấp thêm bằng chứng giúp Bộ Y tế hiệu chỉnh bộ công cụ khảo sát phù hợp hơn trong bối cảnh hiện nay. Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế nhất định: (1) Các yếu tố trong mô hình có tổng phương sai trích là 74,518%, còn 25,482% là do các yếu tố khác tác động như tinh thần trách nhiệm, thông tin... mà nghiên cứu chưa đưa vào mô hình; (2) Mẫu đại diện nghiên cứu nhỏ so với lượng người bệnh vào các bệnh viện công hiện nay; (3) Nghiên cứu cũng chưa đề cập đến sự

khác biệt về SHL của người bệnh đối với chất lượng KCB tại các bệnh viện tuyến Trung ương, tuyến thành phố và tuyến quận/huyện. Những hạn chế này có thể định hướng cho những nghiên cứu tiếp theo.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định và đo lường 6 yếu tố (29 biến quan sát độc lập) ảnh hưởng đến SHL của người bệnh với chất lượng KCB tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh, được sắp xếp theo thứ tự từ cao xuống thấp: (1) Sự quan tâm phục vụ người bệnh (QT), (2) Cơ sở vật chất (VC), (3) Chi phí khám chữa bệnh (CP), (4) Thủ tục khám chữa bệnh (TT), (5) Hiệu quả công tác khám chữa bệnh (HQ) và (6) Các dịch vụ hỗ trợ (DV). Đây sẽ là những thông tin quan trọng giúp các nhà quản lý tạo thương hiệu tốt cho bệnh viện, từ đó, duy trì sự phát triển bền vững của các bệnh viện công nói chung và trên địa bàn TP Hồ Chí Minh nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Vietnam Ministry of Health (2006), *Organization and Management of General Hospitals*, Medical Publishing House (Vietnamese), 260pp.
- [2] WHO (2000), *Workbook 6: Client Satisfaction Evaluations*, 38pp.
- [3] V. Sower, J. Duffy, W. Kilbourne, et al. (2001), "The dimensions of service quality for hospitals: Development of the KQCAH scale", *Health Care Management Review*, **26**(2), pp.47-59, DOI: 10.1097/00004010-200104000-00005.
- [4] N.Q. Nghi (2011), "Influential factors on patient satisfaction with public hospitals in Can Tho city", *Journal of Economic Development*, **208**, pp.56-61.
- [5] G. Kamyar, Z. Mahmood, J.H. Seyed, et al. (2014), "The impact of service quality on patient satisfaction in Malaysian hospitals", *Topclass Journal of Business Management and Innovations*, **1**(2), pp.47-51.
- [6] P.T.H. Ha, T.T.T. Hien (2012), "Evaluating customer satisfaction using medical services at Vietnam - Cuba hospital Dong Hoi - Quang Binh", *Hue University Journal of Science: Social Sciences and Humanity*, **72**(3), pp.75-84, DOI: 10.26459/hujos-ssh.v72i3.3581 (in Vietnamese).
- [7] L.T.K. Ngan, L.T.T. Trang (2014), "Evaluating in-patients' satisfaction level on service quality at the central hospital in Can Tho", *Hue University Journal of Science: Political Science, Economics and Law*, **31**, pp.8-16 (in Vietnamese).
- [8] Vietnam Ministry of Health (2018), *Health Statistics Yearbook*, 277pp (in Vietnamese).
- [9] Website of the Central Economic Committee (2018), "Public and private hospitals are in fierce competition", <https://kinhtetrunguoc.vn/web/guest/kinh-te-xa-hoi/benh-vien-cong-tu-va-o-cuo-c-ca-nh-tranh-gay-ga-t.html>, accessed 5 April 2018 (in Vietnamese).
- [10] Vietnam Ministry of Health (2016), *Decision No. 6858/QĐ-BYT Promulgating The Vietnamese Hospital Quality Criteria Set* (in Vietnamese).
- [11] Ho Chi Minh City Department of Health (2021), *List of Hospitals*, <http://medinet.gov.vn/medinet.html>, accessed 14 February 2021.
- [12] L.T. Chien, N.V. Hung, P.V. Thao (2014), "Research on patient satisfaction with medical examination and treatment at some class I general hospitals under the Department of Health of Ho Chi Minh City", *Journal of Military Medicine and Pharmacy*, **45**, pp.35-43 (in Vietnamese).
- [13] A. Donabedian (2005), "Evaluating the quality of medical care", *Milbank Q.*, **83**(4), pp.691-729, DOI: 10.1111/j.1468-0009.2005.00397.x.
- [14] C. Grönroos (1984), "A service quality model and its marketing implications", *European Journal of Marketing*, **18**(4), pp.36-44, DOI: 10.1108/EUM0000000004784.
- [15] T.T.H. Thao (2018), *Evaluate Customer Satisfaction with The Quality of Medical Examination and Treatment Services of Ba Ria General Hospital*, Master Thesis, University of Economics Ho Chi Minh City.
- [16] J. Hair, W. Black, B. Babin, et al. (2006), *Multivariate Data Analysis*, Pearson Prentice Hall, 816pp.
- [17] H. Trong, C.N.M. Ngoc (2008), *Analyze Research Data with SPSS*, **1**, Hong Duc Publishing House, 316 pp (in Vietnamese).
- [18] J.C. Nunnally, I.H. Bernstein (1994), *Psychometric Theory* (3rd ed.), McGraw-Hill, 752pp.
- [19] D.W. Gerbing, J.C. Anderson (1988), "An updated paradigm for scale development incorporating unidimensionality and its assessment", *Journal of Marketing Research*, **25**(2), pp.186-192, DOI: 10.2307/3172650.

Tỷ lệ nảy mầm, khả năng sinh trưởng và sự tích lũy hoạt chất của 5 giống artichoke nhập nội (*Cynara scolymus* L.) trồng tại tỉnh Lâm Đồng

Hoàng Đắc Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Nguyễn Quang Vinh², Đoàn Mạnh Dũng², Nguyễn Bá Nam³, Lê Văn Thức⁴, Vũ Quốc Luận¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, TP Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam

³Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phù Đổng Thiên Vương, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu Hạt nhân, 1 Nguyễn Tử Lực, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/11/2021; ngày chuyển phản biện 18/11/2021; ngày nhận phản biện 9/12/2021; ngày chấp nhận đăng 13/12/2021

Tóm tắt:

Kết quả nghiên cứu 5 giống artichoke nhập nội (Green Globe - Mỹ, Violet de Provence - Đức, Chenopodiaceae - Israel, Cardon Blanc Ivoire AB - Pháp và Artichaut Imperial Star - Pháp) trồng khảo nghiệm tại TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng cho thấy, cả 5 giống đều ra hoa sau 7 tháng kể từ khi trồng trên đồng ruộng, khả năng sinh trưởng và tính chống chịu sâu bệnh tương đối tốt, tương đương giống bản địa đối chứng A85. Trong đó, 2 giống Cardon Blanc Ivoire AB và Green Globe có tỷ lệ nảy mầm tương đối cao (>70,0%, ngang giống đối chứng), năng suất hoa vượt trội so với các giống còn lại. Tất cả các giống nhập nội đều thể hiện sự đa dạng về thành phần và hàm lượng các hoạt chất chống oxy hóa có trong hoa, cũng như cao hơn đáng kể so với giống đối chứng A85. Các kết quả của nghiên cứu này góp phần cung cấp các thông tin khoa học phục vụ công tác chọn giống để nâng cao năng suất và chất lượng cây artichoke tại Việt Nam.

Từ khóa: cây artichoke, cây dược liệu, hạt giống, HPLC, nhập nội giống.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Artichoke là một loài cây thân thảo thuộc họ *Asteraceae* có giá trị thực phẩm và dược liệu cao [1] có nguồn gốc từ Địa Trung Hải [2]. Các hoạt chất chống oxy hóa và đặc biệt là cynarine trong cây artichoke có lợi trong việc phòng chống ung thư, các bệnh thoái hóa thần kinh, tim mạch và loãng xương [3, 4]. Cây artichoke ưa khí hậu mát, hơi lạnh với nhiệt độ trung bình khoảng 15-18°C nên thường được trồng ở độ cao 1.000-1.500 m so với mực nước biển. Ý và Tây Ban Nha được biết đến là những nơi trồng artichoke nhiều nhất trên thế giới [5] và cũng là nơi có mức độ đa dạng về giống artichoke hàng đầu trên thế giới [6, 7]. Tại Việt Nam, cây artichoke được trồng chủ yếu tại Sa Pa và Mường Khương (Lào Cai), Tam Đảo (Vĩnh Phúc) và nhiều nhất tại Đà Lạt (Lâm Đồng). Tuy nhiên, hiện nay, cây artichoke đã bị đưa vào danh sách những loài có nguy cơ thoái hóa nguồn gen [2] do việc khai thác nguồn gen thiếu chiến lược [6], dịch bệnh nhiều do nhân giống tự phát, thiếu kiểm soát [8] dẫn đến sự suy giảm nghiêm trọng về sản lượng và chất lượng trong những năm gần đây [4, 9].

Cho đến hiện tại, 2 giống artichoke A80 (giống tím) và artichoke A85 (giống xanh) đang được trồng và nhân giống

rộng rãi tại Đà Lạt [4] với giá trị kinh tế chủ yếu thu được từ các đầu hoa non dùng để ăn tươi như một loại rau xanh hoặc đông lạnh và đóng hộp [10]. Tuy nhiên, sự thoái hóa giống, sụt giảm về chất lượng đã và đang làm tăng giá thành sản phẩm artichoke nội địa, giảm khả năng cạnh tranh với các giống nước ngoài vốn đang được thị trường ưa chuộng. Trước yêu cầu cấp thiết đặt ra là cần nhanh chóng đa dạng hóa giống cây artichoke nhằm đáp ứng với nhu cầu ngày càng mở rộng của thị trường, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu khảo nghiệm 5 giống artichoke nhập nội từ một số nguồn khác nhau và so sánh với giống bản địa A85 (đối chứng).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguồn giống nhập nội

Hạt của 5 giống artichoke (*Cynara scolymus* spp.) được nhập khẩu để phục vụ cho công tác nghiên cứu thông qua Công ty TNHH Thương mại Dịch vụ Farmy (số 157, thôn Tân Tiến, xã Đa Rsal, huyện Đam Rông, tỉnh Lâm Đồng), bao gồm giống artichoke Green Globe xuất xứ Mỹ, Violet de Provence xuất xứ Đức; artichoke Chenopodiaceae xuất xứ Israel, Cardon Blanc Ivoire AB và Artichaut Imperial Star xuất xứ Pháp. Trong đó, artichoke A85 (giống xanh)

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

Germination, growth, and secondary compounds accumulation of 5 introduced artichoke cultivars (*Cynara scolymus* L.) cultivated in Lam Dong province

Dac Khai Hoang¹, Manh Cuong Do¹,
Thanh Tung Hoang¹, Quang Vinh Nguyen²,
Manh Dung Doan², Ba Nam Nguyen³, Van Thuc Le⁴,
Quoc Luan Vu¹, Thi Nhu Mai Nguyen¹, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, VAST, 116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Tay Nguyen University,

567 Le Duan Street, Ea Tam Ward, Buon Ma Thuot City, Dak Lak Province, Vietnam

³Da Lat University,

1 Phu Dong Thien Vuong Street, Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

⁴Da Lat Nuclear Research Institute,

1 Nguyen Tu Luc Street, Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

Received 15 November 2021; revised 9 December 2021; accepted 13 December 2021

Abstract:

The results from a study on the evaluation of 5 introduced artichoke cultivars, including Green Globe - USA, Violet de Provence - Germany, Chenopodiaceae - Israel, Cardon Blanc Ivoire AB - France, and Artichaut Imperial Star - France cultivated in Da Lat, Lam Dong province showed that all of them have simultaneously bloomed in 7 months after planting, good health, and well resisted to main insects and diseases, equivalent to local one coded A85. Cardon Blanc Ivoire AB and Green Globe cultivars were considered to be better in terms of germinating ratio (more than 70.0%, as high as A85) and flower productivity. The introduced cultivars were diversified in both composition and antioxidant content in flowers presented by a significantly higher concentration of anti-oxidant substances in flowers analysed by HPLC compared to the control. The results of this study should be of good information used in the selection of varieties to improve the yield and quality of artichoke in Vietnam.

Keywords: artichoke, HPLC, imported varieties, medicinal plants, seeds.

Classification number: 4.1

có sẵn tại Việt Nam (giống bản địa) đã được sử dụng làm đối chứng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá khả năng nảy mầm của các hạt giống artichoke nhập nội trong điều kiện vườn ươm: các hạt sau khi thu nhận được ngâm nước ấm (3 sôi + 2 lạnh) trong 6 giờ, sau đó các

hạt nứt nanh được gieo trong vỉ xốp nhân giống (84 lỗ) có chứa giá thể đất sạch Metro-Mix®350 (Đức) đã được cấp ẩm khoảng 50%. Xác định 2 đầu của hạt giống và gieo đầu nhỏ hơn hướng xuống và sâu khoảng 0,5 cm. Đặt các vỉ đã gieo hạt trong nhà kính và tưới nước phun sương để giữ ẩm cho các hạt nảy mầm 2 lần/ngày trong vòng 10 ngày đầu tiên. Trong đó, nhiệt độ nhà kính được điều chỉnh trong khoảng 18-25°C, độ ẩm 70-75% với ánh sáng tự nhiên có che sáng 40% bằng lưới đen. Sau 10 ngày, khi các cây con đã nảy mầm chế độ tưới được điều chỉnh 1 lần/ngày. Chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ nảy mầm (%), chiều cao cây (cm), số lá/cây và mô tả hình thái các cây con được ghi nhận sau 1 tháng gieo hạt. Trong đó, tỷ lệ nảy mầm của các giống được tính bằng công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ nảy mầm (\%)} = \frac{\text{Số hạt nảy mầm sau 1 tháng}}{\text{Tổng số hạt được gieo}} \times 100.$$

Đánh giá khả năng sinh trưởng của các giống artichoke nhập nội trên điều kiện đồng ruộng: các cây con artichoke sau khi nảy mầm trong vườn ươm 1 tháng được chuyển vào các bầu đất (túi nylon đen 15×5 cm) với giá thể Metro-Mix 350 được tưới ẩm 50%. Chăm sóc các bầu cây con trong nhà kính và tưới phun sương 1 lần/ngày để duy trì độ ẩm cho cây con phát triển bộ rễ. Sau 1 tháng ra bầu đất, các cây con artichoke được chuyển ra trồng trên đồng ruộng. Ruộng trồng artichoke được bón lót bằng phân chuồng hoai mục 30 m³, 50 kg phân lân vi sinh và 100 kg vôi bột cho 1000 m² đất (pH đất khoảng 6-8). Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh (RCBD), lên luống đất (chiều rộng 1,2 m và chiều cao 10 cm). Trồng cây trên đồng với khoảng cách 1,0 m (1000 cây/1000 m²). Thực hiện chế độ chăm sóc và phòng trừ bệnh hại theo hướng dẫn của nhà sản xuất giống trên bao bì và chế độ tưới nước 2 ngày/lần (tùy thuộc vào điều kiện thời tiết và tưới đẫm sau khi bón phân). Chỉ tiêu theo dõi gồm các đặc điểm hình thái lá được quan sát bằng mắt thường như hình dạng, màu sắc, mép lá và lông trên mặt lá, số lá/cây, chiều cao cây (cm), chiều dài lá (cm) được đo bằng thước dây được ghi nhận sau 5 tháng trồng.

Ước tính năng suất hoa của các giống artichoke nhập nội: sau 7 tháng trồng trên đồng ruộng, các giống artichoke trổ hoa được thu hái và ước tính sản lượng. Thu nhận các yếu tố cấu thành năng suất hoa, gồm: số hoa trung bình/cây, khối lượng tươi hoa trung bình/cây (kg) và khối lượng khô hoa trung bình/cây (kg). Chỉ tiêu năng suất lý thuyết trên diện tích gieo trồng 1000 m²/vụ (tương đương 1000 cây) được tính theo công thức sau: Số hoa = Số hoa trung bình/cây × 1000 cây; Khối lượng tươi hoa (kg/1000 m²/vụ) = Khối lượng tươi hoa trung bình/cây (kg) × 1000 cây; Khối lượng khô hoa (kg/1000 m²/vụ) = Khối lượng khô hoa trung bình/cây (kg) × 1000 cây.

Đánh giá sự tích lũy hoạt chất trong hoa của các giống artichoke nhập nội: phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép đầu dò UV (UHPLC-UV) được sử dụng để định tính

và định lượng một số hoạt chất chính có trong hoa của các giống artichoke nhập nội và A85 đối chứng, gồm: Cynarin, Gallic acid, Catechin, Ethyl gallate, Rutin, Ellagic acid, Quercetin, Apigenin-7-O- β -D-glucopyranoside, Apigenin [11, 12]. Theo đó, cân chính xác khối lượng mỗi mẫu, trộn đều với cát (tỷ lệ 1 mẫu 10 cát) sau đó cho vào Cell của máy chiết nhanh E-916. Các mẫu được chiết với hệ thống máy chiết nhanh E-916, dung môi chiết MeOH, nhiệt độ 60°C, áp suất 120 bar, thời gian chiết 2 giờ. Dung dịch chiết được cho vào bình định mức 50 ml bằng MeOH. Mẫu được lọc qua màng lọc 0,45 μ m. Quá trình phân tách các hợp chất bằng hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép đầu dò UV (UHPLC-UV Ultimate 3000 của Hãng Thermo, Mỹ), qua cột BDS Hypersil C18 (250x4,6x5). Dung môi pha động gồm MeOH (A) và H₂O chứa 0,1% H₃PO₄ (B). Quá trình phân tách theo chế độ gradient như sau: từ 0 đến 0,5 phút 97% B, từ 0,5 đến 8,0 phút 97-83% B, từ 8,0 đến 10,0 phút 83-70% B, từ 10,0 đến 15,0 phút 70-55% B, từ 15,0 đến 20,0 phút 55-5% B, từ 20,0 đến 22,0 phút 5-97% B, từ 22,0 đến 23,0 phút 97% B. Tốc độ dòng 1,0 ml/phút với thời gian chạy mẫu 23 phút. Sử dụng đầu dò UV với bước sóng 265 nm, nhiệt độ cột 30°C, quá trình tiêm mẫu bằng hệ thống tự động với thể tích mẫu tiêm là 5 μ l. Tính toán kết quả dựa vào phương trình đường chuẩn của các chất chuẩn ở cùng điều kiện. Trong đó, các chất chuẩn đã được đặt mua từ Sigma-Aldrich (Mỹ).

2.3. Điều kiện thí nghiệm

Tiến hành các thí nghiệm gieo hạt giống artichoke tại vườn ươm thuộc Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên với nhiệt độ 18-25°C, độ ẩm trung bình khoảng 70-75%, ánh sáng tự nhiên có che sáng 40% bằng lưới đen.

Các thí nghiệm đồng ruộng với 3 lần nhắc lại được tiến hành vào vụ đông xuân 2019-2021 tại phường 11, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng (11°56'52.2"N 108°30'04.0"E), nhiệt độ trung bình khoảng 15,8-19,3°C, mức bức xạ tổng khoảng 140 kCalo/cm²/năm, áp suất không khí khoảng 644 mmHg, độ ẩm tương đối không khí dao động trong khoảng 77-91%.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phân tích thống kê SPSS 16.0 dựa trên tiêu chuẩn Duncan's test với $p < 0,05$ [13].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tỷ lệ nảy mầm của các giống artichoke nhập nội trong điều kiện vườn ươm

5 giống artichoke nhập nội đều cho tỷ lệ nảy mầm đạt >55,0% sau 1 tháng gieo hạt (bảng 1), trong đó giống artichoke Cardon Blanc Ivoire AB đạt cao nhất (77,25%), tiếp theo là artichoke Green Globe và đối chứng đạt khoảng 70,0%, các giống còn lại trong khoảng 57,73-61,29%. Chiều

cao cây con của giống artichoke Chenopodiaceae và Cardon Blanc Ivoire AB cao hơn đáng kể so với 4 giống còn lại và đối chứng. Trong khi đó, chỉ tiêu về số lá cho thấy không có sự khác biệt giữa 6 giống artichoke, kể cả đối chứng (4 lá/cây).

Về hình thái, lá cây con của cả 4 giống nhập nội có hình dạng tương tự giống artichoke A85, ngoại trừ giống Chenopodiaceae lá màu xanh bạc và xẻ thùy sâu (bảng 1). Nhìn chung, toàn bộ các giống đều có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện nhà kính, tuy nhiên cây thường dễ bị bệnh lở cổ rễ trong giai đoạn này mầm, cần lưu ý không nên tưới quá ẩm.

Bảng 1. Khả năng nảy mầm và sinh trưởng của 5 giống artichoke nhập nội trong điều kiện vườn ươm sau 1 tháng gieo trồng.

Giống	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Ghi chú
Artichoke Green Globe xuất xứ Mỹ	70,27 ^a	8,56 ^b	4,00 ^a	Cây sinh trưởng tốt, lá có màu xanh đậm, lá xẻ thùy sâu đặc trưng
Artichoke Violet de Provence xuất xứ Đức	60,27 ^c	8,67 ^b	4,00 ^a	Cây sinh trưởng tốt, lá có màu xanh đậm, mép lá có răng cưa rất nhỏ
Artichoke Chenopodiaceae xuất xứ Israel	57,73 ^d	10,67 ^a	4,00 ^a	Cây sinh trưởng tốt, lá có màu xanh bạc đặc trưng, lá xẻ thùy sâu
Cardon Blanc Ivoire AB xuất xứ Pháp	77,25 ^a	10,23 ^a	4,00 ^a	Cây sinh trưởng tốt, lá có màu xanh đậm, mép lá có răng cưa
Artichaut Imperial Star xuất xứ Pháp	61,29 ^c	8,62 ^b	4,00 ^a	Cây sinh trưởng tốt, lá có màu xanh đậm, mép lá có răng cưa nhỏ
Artichoke A85 (đối chứng)	71,56 ^b	8,60 ^b	4,00 ^a	Cây sinh trưởng tốt, lá có màu xanh đậm, mép lá có răng cưa nhỏ

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Về khả năng nảy mầm, 2 giống artichoke Cardon Blanc Ivoire AB và Green Globe có tỷ lệ nảy mầm tương đối cao (trên 70%), tương đương với giống đối chứng, cũng như kết quả nghiên cứu của X. Long và cs (2010) [14] là tỷ lệ nảy mầm của cây artichoke Jerusalem (*Helianthus tuberosus* L.) có thể dao động từ 60 đến 90% tùy thuộc vào kiểu giống. Theo Hiệp hội Kiểm nghiệm Hạt giống Quốc tế (ISTA), tiêu chuẩn chất lượng của lô hạt giống thương phẩm được xác định dựa trên sức sống và khả năng nảy mầm của hạt [15]. Tuy nhiên, phôi trong hạt giống bị giảm khả năng sống sót khi hàm lượng nước tương đối trong hạt giảm xuống ngưỡng chống chịu của hạt trong quá trình bảo quản [16]. Do đó, tỷ lệ nảy mầm của các hạt giống giảm có thể liên quan đến các điều kiện bảo quản và cần được nghiên cứu tối ưu cho từng loài cụ thể [15, 16].

3.2. Khả năng sinh trưởng của các giống artichoke nhập nội trên điều kiện đồng ruộng

Số liệu theo dõi tại thời điểm 5 tháng kể từ khi chuyển ra trồng trên đồng ruộng cho thấy cả 5 giống artichoke đều sinh trưởng tốt và phát triển khỏe mạnh với điều kiện tại Đà Lạt, tương đương với giống bản địa A85 (bảng 2 và hình 1).

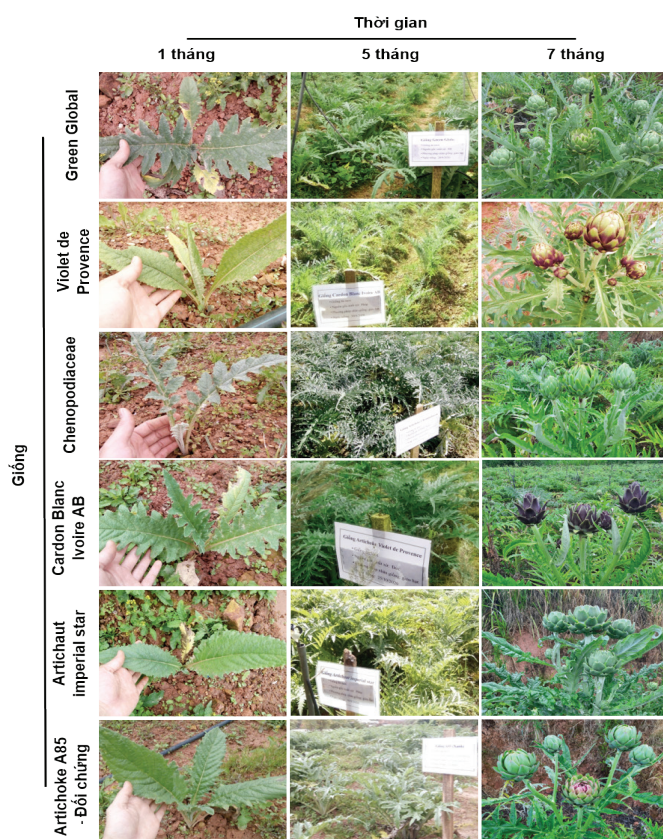
Hai chỉ tiêu chiều cao cây và chiều dài lá đạt giá trị cao nhất ở các giống Chenopodiaceae, Violet de Provence và

A85 đối chứng, trong khi số lượng lá không chênh nhau đáng kể (biến động trong khoảng 13-16 lá/cây). Quan sát hình thái cho thấy, giống Artichaut Imperial Star và Green Globe có hình thái cây thấp nhỏ, trong khi 3 giống còn lại cho thấy hình thái cây tương đối cao và lá có màu xanh đậm phát triển. Đặc biệt, giống artichoke Chenopodiaceae có lá màu xanh bạc đặc trưng nhờ được phủ lớp lông dày trên bề mặt lá và các mép lá xẻ thùy sâu (bảng 2 và hình 1).

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng của 5 giống artichoke nhập nội trên điều kiện đồng ruộng sau 5 tháng trồng.

Giống	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Chiều dài lá (cm)	Mô tả hình thái cây
Artichoke Green Globe xuất xứ Mỹ	97,56 ^a	13,67 ^b	70,75 ^c	Cây thấp, tán lá thưa, lá có màu xanh đậm, lá xẻ thùy sâu đặc trưng
Artichoke Violet de Provence xuất xứ Đức	143,00 ^a	15,67 ^a	125,09 ^a	Cây cao, lá có màu xanh đậm, mép lá có răng cưa rất nhỏ
Artichoke Chenopodiaceae xuất xứ Israel	135,78 ^a	14,00 ^b	113,25 ^a	Cây cao, tán lá rậm, lá có màu xanh bạc đặc trưng, lá xẻ thùy sâu đặc trưng
Cardon Blanc Ivoire AB xuất xứ Pháp	127,25 ^b	16,25 ^a	96,98 ^b	Cây cao, tán lá rậm, lá có màu xanh đậm, mép lá có răng cưa
Artichaut Imperial Star xuất xứ Pháp	104,25 ^c	14,56 ^b	80,25 ^c	Cây thấp, tán lá thưa, lá có màu xanh đậm, mép lá có răng cưa nhỏ
Artichoke A85 (đối chứng)	140,33 ^a	15,28 ^a	118,07 ^a	Cây cao, tán lá rậm, lá có màu xanh đậm, mép lá có răng cưa rất nhỏ

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 1. Sự sinh trưởng của 5 giống artichoke nhập nội và đối chứng sau 1, 5 và 7 tháng trồng trên đồng ruộng.

3.3. Ước tính năng suất hoa của các giống artichoke nhập nội

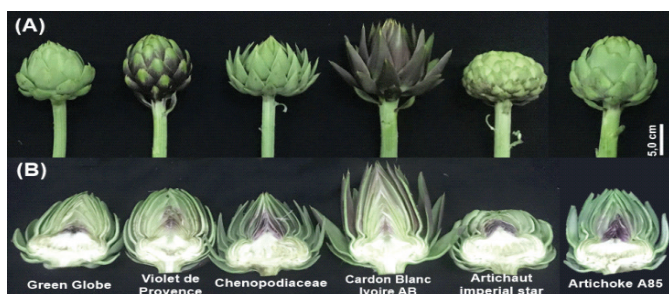
Số liệu bảng 3 (sơ đồ hóa qua hình 1) cho thấy, 2 giống Green Globe và Cardon Blanc Ivoire AB cho năng suất hoa tươi cao nhất (khoảng 9300 đầu hoa, tương ứng 210,66 và 220,67 kg/1000 m² diện tích gieo trồng), các giống còn lại, năng suất thấp hơn và tương đương giống đối chứng (khoảng 6250 đầu hoa/1000 m² diện tích gieo trồng). Khối lượng khô hoa artichoke của 5 giống nhập nội và đối chứng dao động trong khoảng 33,62-39,38 kg/1000 m² diện tích gieo trồng.

Bảng 3. Ước tính năng suất hoa của 5 giống artichoke nhập nội trên diện tích gieo trồng 1000 m².

Giống	Sản lượng ước đạt trên diện tích gieo trồng 1000 m ² /vụ			Ghi chú
	Số hoa	Khối lượng tươi hoa (kg)	Khối lượng khô hoa (kg)	
Artichoke Green Globe xuất xứ Mỹ	9307,13 ^a	210,66 ^{ab}	36,26 ^{ab}	Hoa hình cầu màu xanh đậm, cánh hoa mềm và hơi mọng nước với cánh hoa có hình tim
Artichoke Violet de Provence xuất xứ Đức	6270,34 ^b	200,18 ^b	33,62 ^b	Hoa hình cầu hơi thuôn dài, cánh hoa có gai ở đầu chóp với màu xanh nhạt và đế hoa có màu tím-đỏ
Artichoke Chenopodiaceae xuất xứ Israel	6286,55 ^b	184,76 ^c	37,36 ^{ab}	Hoa hình chóp nhọn, cánh hoa khô, xò màu xanh
Cardon Blanc Ivoire AB xuất xứ Pháp	9301,89 ^a	220,67 ^a	38,27 ^a	Hoa hình chóp nhọn thuôn dài, cánh hoa tím đậm mềm mọng nước và thuôn dài
Artichaut Imperial Star xuất xứ Pháp	6251,00 ^b	183,67 ^c	39,38 ^a	Hoa hình chóp cắt màu xanh hơi pha vàng, cánh tròn chóp hình tim
Artichoke A85 (đối chứng)	6217,23 ^b	200,74 ^b	37,27 ^{ab}	Hoa hình cầu màu xanh đậm, cánh hoa mềm và hơi mọng nước với cánh hoa có hình thuôn dài

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, cả 5 giống artichoke nhập nội đều đồng loạt ra hoa cùng thời điểm tương tự như giống đối chứng (7 tháng sau khi trồng trên đồng ruộng) với hình thái và màu hoa khá đặc trưng, đúng như mô tả của nhà cung cấp (bảng 3 và hình 2A), trong đó, 2 giống Green Globe và A85 (đối chứng) có hoa hình cầu màu xanh đậm, cánh hoa mềm và hơi mọng nước, hình tim (Green Globe) và hình thuôn dài (đối chứng); giống Violet de Provence có hoa hình cầu hơi thuôn dài, cánh hoa có gai ở đầu chóp với màu xanh nhạt và đế hoa có màu tím - đỏ đặc trưng; giống Chenopodiaceae có hoa hình chóp nhọn, cánh hoa xò và khô, có màu xanh đậm; giống Artichaut Imperial Star có hoa màu xanh hoặc màu xanh hơi pha vàng hình chóp cắt, cánh tròn chóp hình tim. Đặc biệt, giống artichoke Cardon Blanc Ivoire AB có hoa hình chóp nhọn thuôn dài, màu sắc cánh hoa tím đậm thu hút, cánh hoa mềm mọng nước và thuôn dài (bảng 3 và hình 2).



Hình 2. Hình thái hoa của 5 giống artichoke nhập nội. (A) Hình thái cánh và màu sắc; **(B)** Hình thái nụ hoa cắt dọc.

Với artichoke, hàm lượng anthocyanin liên quan trực tiếp đến màu sắc của cánh hoa [17] và phụ thuộc vào đặc tính di truyền của từng giống. Trong nghiên cứu này, giống Cardon Blanc Ivoire AB có hoa màu tím sậm hấp dẫn, nguồn cung cấp anthocyanin tốt cho sức khỏe đầy tiềm năng nhờ vào khả năng chống oxy hóa mạnh mẽ đối với các gốc tự do gây hại [18]. Tóm lại, kết quả nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng cả 5 giống artichoke nhập nội đều đạt năng suất và chất lượng tốt, trong đó artichoke Cardon Blanc Ivoire AB (hoa màu tím) và artichoke Green Globe (hoa màu xanh) là 2 giống cho năng suất hoa cao hơn kèm theo hình thức và màu sắc hoa lạ mắt, vì vậy 2 giống này được chúng tôi bước đầu đề xuất như 2 giống tiềm năng có phẩm chất tốt phục vụ công tác tuyển chọn giống cho tỉnh Lâm Đồng.

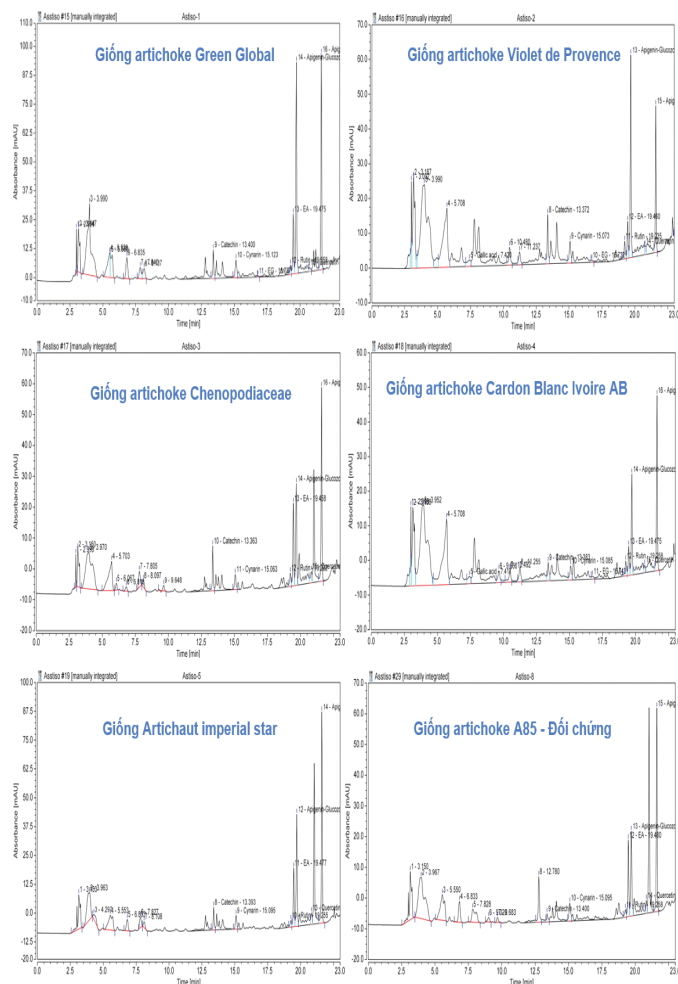
3.4. Sự tích lũy hoạt chất trong hoa của các giống artichoke nhập nội

Kết quả phân tích HPLC cho thấy, hàm lượng dược chất cynarin có trong hoa của 5 giống artichoke nhập nội đều đạt trên 100,00 $\mu\text{g/g}$ mẫu khô, trong đó, 2 giống Cardon Blanc Ivoire AB và Chenopodiaceae đạt cao nhất (167,91 và 158,87 $\mu\text{g/g}$ mẫu khô, tương ứng), cao hơn khá nhiều so với giống đối chứng (127,28 $\mu\text{g/g}$ mẫu khô). Hợp chất Catechin có trong hoa của giống Cardon Blanc Ivoire AB và Green Globe đã được ghi nhận với hàm lượng cao hơn so với các giống khác (1172,25 và 1290,19 $\mu\text{g/g}$ mẫu khô, tương ứng) và cao gấp 3,3-3,7 lần so với đối chứng (bảng 4 và hình 3).

Bảng 4. Sự tích lũy dược chất trong hoa của 5 giống artichoke nhập nội được trồng tại Đà Lạt, Lâm Đồng.

Giống	Hàm lượng các hợp chất có trong mẫu hoa (đơn vị $\mu\text{g/g}$ mẫu khô)							
	Cynarin	Catechin	Gallic acid	Ethyl gallate	Ellagic acid	Quercetin	Rutin	Apigenin-7-O- β -D-glucopyranoside
Artichoke Green Globe xuất xứ Mỹ	137,19 ^a	1290,19 ^a	KPH	KPH	116,64 ^a	82,06 ^a	120,90 ^a	531,77 ^a
Artichoke Violet de Provence xuất xứ Đức	133,65 ^a	707,91 ^c	67,19 ^a	16,23 ^a	36,38 ^a	40,58 ^a	134,73 ^a	366,10 ^a
Artichoke Chenopodiaceae xuất xứ Israel	158,87 ^a	936,40 ^a	KPH	KPH	111,43 ^a	87,24 ^a	82,28 ^a	679,30 ^a
Cardon Blanc Ivoire AB xuất xứ Pháp	167,91 ^a	1172,25 ^b	62,79 ^a	7,80 ^b	36,49 ^a	40,07 ^a	109,18 ^a	625,80 ^b
Artichaut Imperial Star xuất xứ Pháp	116,76 ^b	1085,95 ^b	KPH	4,15 ^c	107,97 ^b	42,24 ^a	108,83 ^a	1100,72 ^a
Artichoke A85 (đối chứng)	127,28 ^b	350,20 ^d	KPH	KPH	112,04 ^a	63,84 ^b	71,54 ^a	462,11 ^a

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan; KPH: không phát hiện.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC phân tích hàm lượng Cynarin, Gallic acid, Catechin, Ethyl gallate, Rutin, Ellagic acid, Quercetin, Apigenin-7-O- β -D-glucopyranoside và Apigenin có trong hoa của 5 giống artichoke nhập nội.

Gallic acid chỉ có ở 2 giống Cardon Blanc Ivoire AB và Violet de Provence với hàm lượng $>60,00$ $\mu\text{g/g}$ mẫu khô; giống Violet de Provence có hàm lượng Ethyl gallate và Rutin trong hoa cao hơn đáng kể so với các giống còn lại (16,23 và 134,73 $\mu\text{g/g}$ mẫu khô, tương ứng). Mặc dù giống Imperial Star không chứa Gallic acid nhưng lại chứa hàm lượng hợp chất Apigenin-7-O- β -D-glucopyranoside và Apigenin (lần lượt là 1100,72 và 501,51 $\mu\text{g/g}$ mẫu khô) cao so với các giống còn lại và đối chứng.

Hai giống Green Globe và Chenopodiaceae tuy không chứa hợp chất Gallic acid và Ethyl gallate nhưng chứa lượng Ellagic acid khá cao (tương ứng là 116,64 và 111,43 $\mu\text{g/g}$ mẫu khô) và Quercetin (tương ứng 82,06 $\mu\text{g/g}$ và 87,24 $\mu\text{g/g}$ mẫu khô) cao hơn đáng kể so với những giống khác (bảng 4 và hình 3).

Từ lâu, cây artichoke đã được sử dụng trong y học cổ truyền để chữa các bệnh về gan, chống ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn và giảm cholesterol [3, 4]. Các đặc

tính tăng cường sức khỏe này của artichoke chủ yếu liên quan đến hàm lượng cao của các hợp chất polyphenol và flavonoid [4]. Những hợp chất này giúp chống oxy hóa mạnh mẽ, làm chậm hoặc ngăn chặn lão hóa nhờ vào khả năng khử các gốc tự do. Tuy nhiên, hàm lượng các hợp chất chống oxy hóa có trong cây artichoke chủ yếu phụ thuộc vào kiểu gen của từng giống cụ thể [19]. Trong nghiên cứu này, cả 5 giống artichoke nhập nội đều thể hiện sự đa dạng cả về thành phần và hàm lượng các hoạt chất chống oxy hóa có trong hoa. Trên tổng thể, hầu hết các hợp chất được đánh giá trong 5 giống nhập nội đều cao hơn đáng kể so với giống đối chứng nội địa A85, từ đó cho thấy tiềm năng về giá trị dược liệu cao của các giống artichoke nhập nội. Kết quả này góp phần mang lại những thông tin khoa học quý giá cho công tác tuyển chọn các giống artichoke để tách, chiết các hoạt chất quý phục vụ cho lĩnh vực y dược học.

4. Kết luận

Từ các kết quả trên, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

1. Năm giống artichoke nhập nội đều giữ được các đặc trưng cơ bản của giống khi trồng tại Đà Lạt, Lâm Đồng, với khả năng sinh trưởng tốt, tỷ lệ nảy mầm và thời gian ra hoa tương tự với giống bản địa A85, trong đó 2 giống Blanc Ivoire AB và Green Globe có tỷ lệ nảy mầm tốt hơn.

2. Năng suất của các giống nhập nội cao hơn giống đối chứng A85 thể hiện qua số hoa/1000 m²/vụ, trọng lượng tươi hoa và khô hoa/1000 m²/vụ, trong đó, giống Cardon Blanc Ivoire AB và Green Globe có sự vượt trội đáng kể, với màu sắc hấp dẫn (màu tím đậm với giống Cardon Blanc Ivoire AB và màu xanh đậm với giống Green Globe).

3. Các giống artichoke nhập nội đều có tiềm năng cao về giá trị dược liệu với sự đa dạng cả về thành phần và hàm lượng các hoạt chất có trong hoa, do đó có thể sử dụng như một loại rau xanh để duy trì và tăng cường sức khỏe con người.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ kinh phí của đề tài cấp tỉnh “Nghiên cứu tuyển chọn bộ giống Artichoke chất lượng cao tại Lâm Đồng”. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P. Bianco, P.G. Robey (2000), “Marrow stromal stem cells”, *Journal of Clinical Investigation*, **105**(12), pp.1663-1668, DOI: 10.1172/JCI10413.

[2] R. Spanò, G. Bottalico, A. Corrado, et al. (2018), “A protocol for producing virus-free artichoke genetic resources for conservation, breeding, and production”, *Agriculture*, **8**(3), DOI: 10.3390/agriculture8030036.

[3] G. Pandino, S. Lombardo, G. Mauromicale, et al. (2011), “Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. Genotypes”, *Food Chemistry*, **126**(2), pp.417-422, DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.001.

[4] H.D. Khai, N.T.N. Mai, H.L.L. Anh, et al. (2021), “Improved *in vitro* rooting and acclimatization of ‘violetta’ artichoke and ‘green globe’ artichoke”, *Journal of Biotechnology*, **19**(1), pp.129-145 (in Vietnamese).

[5] FAO (2021), *FAOSTAT*, <https://www.fao.org/faostat/en/#home>, accessed 14 July 2021.

[6] S. Ancona, G.D. Mastro, M.M. Jenderek, et al. (2021), “Micropropagation supports reintroduction of an apulian artichoke landrace in sustainable cropping systems”, *Agronomy*, **11**(6), DOI: 10.3390/agronomy11061169.

[7] S. Bekheet, V. Sota (2019), “Biodiversity and medicinal uses of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) plant”, *Journal of Biodiversity Conservation and Bioresource Management*, **5**(1), pp.39-54, DOI: 10.3329/jbcbm.v5i1.42184.

[8] D. Gallitelli, T. Mascia, G.P. Martelli (2012), “Viruses in artichoke”, *Advances in Virus Research*, **84**, pp.289-324, DOI: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00008-7.

[9] H.T. Tung, H.D. Khai, D.M. Cuong, et al. (2020), “Assessment of fungi and viruses in artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Da Lat, Lam Dong province”, *Vietnam Journal of Biotechnology*, **18**(4), pp.679-691.

[10] F. Conti, G. Abbate, A. Alessandrini, et al. (2005), *An Annotated Checklist of The Italian Vascular Flora*, Phytotaxa, 421pp.

[11] N.J. Jun, S.C. Kim, K.C. Seong, et al. (2007), “Radical scavenging activity and content of cynarin (1, 3-dicaffeoylquinic acid) in artichoke (*Cynara scolymus* L.)”, *Journal of Applied Biological Chemistry*, **50**(4), pp.244-248.

[12] B.H.T. Thi, M.K. Park (2008), “Total phenolic compounds and flavonoids in the parts of artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Viet Nam”, *Journal of Environmental Science International*, **17**(1), pp.19-27.

[13] D.B. Duncan (1955), “Multiple range and multiple F tests”, *Biometrics*, **11**(1), pp.1-42, DOI: 10.2307/3001478.

[14] X. Long, Z. Huang, Z. Zhang, et al. (2010), “Seawater stress differentially affects germination, growth, photosynthesis, and ion concentration in genotypes of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)”, *Journal of Plant Growth Regulation*, **29**(2), pp.223-231, DOI: 10.1007/s00344-009-9125-4.

[15] International Rules for Seed Testing (1999), “International rules of seed. testing (supplement rules)”, *Seed Science and Technology*, **27**, pp.25-30.

[16] T. Bareke (2018), “Biology of seed development and germination physiology”, *Advances in Plants and Agriculture Research*, **8**(4), pp.336-346, DOI: 10.15406/apar.2018.08.00335.

[17] S.A. Bekheet, M.K.E. Bahr, S. Ali, et al. (2014), “Callus production of globe artichoke and milk thistle: *In vitro* hypolipidemic and antioxidant activities”, *World Journal of Pharmaceutical Research*, **3**(4), pp.1-17.

[18] K. Schütz, M. Persike, R. Carle, et al. (2006) “Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MSn”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **384**(7-8), pp.1511-1517, DOI: 10.1007/s00216-006-0316-6.

[19] G. Pandino, S. Lombardo, R.P. Mauro, et al. (2012), “Variation in polyphenol profile and head morphology among clones of globe artichoke selected from a landrace”, *Scientia Horticulturae*, **138**, pp.259-265, DOI: 10.1016/j.scienta.2012.02.032.

Nghiên cứu bảo quản táo cắt tươi bằng màng bao ăn được alginate có bổ sung cao chiết rong nâu *Sargassum polycystum*

Trần Thị Ngọc Mai^{1*}, Huỳnh Phương Quyên¹, Nguyễn Công Danh¹,
Lê Thị Giang¹, Lê Hoàng Tính¹, Nguyễn Thái Ngọc Uyên²

¹Viện Khoa học ứng dụng, Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh (HUTECH), 475A Điện Biên Phủ, phường 25, quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Khoa học và Công nghệ Vật liệu, 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

Ngày nhận bài 2/8/2021; ngày chuyển phản biện 5/8/2021; ngày nhận phản biện 25/8/2021; ngày chấp nhận đăng 30/8/2021

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả của lớp phủ ăn được alginate có bổ sung glycerol và cao chiết rong nâu *Sargassum polycystum* (màng A-G-S) lên quả táo cắt tươi. Kết quả thu được công thức tạo màng A-G-S có tỷ lệ alginate/nước 1,0%, glycerol 20% và cao chiết bổ sung là 2,0%. Màng A-G-S phủ trên bề mặt táo cắt tươi có khả năng kháng oxy hóa tương đương màng A-G-As, sử dụng chất kháng oxy hóa là acid ascorbic. Thời gian khuyến nghị cho sản phẩm táo cắt tươi phủ màng A-G-S là 12 ngày ở $5 \pm 2^\circ\text{C}$, độ chấp nhận thương mại (CAR) là 59,57%; các giá trị tỷ lệ hao hụt khối lượng (WL), tổng hàm lượng chất rắn hoà tan (TSS)/hàm lượng acid tổng số (TA), hàm lượng polyphenol tổng (TPC) tương ứng là $16,51 \pm 0,52\%$, 30,80 và $0,63 \pm 0,02$ mg/g. Màng có độ dày trung bình $7,04 \mu\text{m}$, bề mặt đồng nhất, có độ dai dẻo nhất định và độ truyền hơi nước (WVTR) của màng đạt $5,31 \times 10^{-4} \text{ g/mm}^2$.

Từ khóa: alginate, màng phủ ăn được, quả táo, rong nâu, *Sargassum*.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, bao bì thực phẩm phát triển khá đa dạng, trong đó sự phát triển của màng phủ ăn được là một công nghệ thân thiện với môi trường, cho phép giảm tác động và chi phí xử lý liên quan đến màng polymer tổng hợp. Màng phủ sinh học ăn được là hệ thống đóng gói đầy hứa hẹn do tính chất không gây ô nhiễm môi trường [1, 2].

Lớp phủ ăn được đã được nghiên cứu rộng rãi trong những năm gần đây, giúp cải thiện thời hạn sử dụng và chất lượng thực phẩm bằng cách cung cấp một hàng rào bảo vệ chống lại tác động vật lý và cơ học; tạo ra một tấm chắn có kiểm soát và hoạt động như một rào cản bán thấm cho khí, hơi và nước. Do đó, việc sử dụng màng ăn được cho phép kéo dài thời hạn sử dụng của nhiều loại thực phẩm [3]. Vật liệu tạo màng chủ yếu từ các polymer sinh học như polysaccharide (tinh bột, chitosan, cellulose, pectin, alginate) hoặc protein (gelatin, whey protein, casei) [4, 5]. Alginate là polysaccharide tự nhiên, được sản xuất chủ yếu từ rong nâu, có khả năng tạo thành gel, màng hay sợi nhờ các tương tác tĩnh điện qua cầu calci (ở nhiệt độ phòng và pH 4-10). Gel alginate được hình thành là do các liên kết ngang giữa các mạch polymer ưa nước trong môi trường nước. Các loại màng alginate có độ đàn hồi cao, bền, chịu dầu và không dính kết [6, 7].

Rong nâu là nguồn tài nguyên phong phú, đa dạng về chủng loại ở khu vực miền Trung Việt Nam; là nguồn nguyên liệu chứa nhiều thành phần kháng oxy hoá quan trọng như

carotenoid, polyphenol, sulphate polysaccharide... [8, 9]. Việc bổ sung cao chiết rong biển vào dịch tạo màng phủ ăn được là hướng bảo quản thực phẩm đang được quan tâm hiện nay [10-12].

Quả táo tây (*Malus domestica*) cung cấp giá trị dinh dưỡng khá cao, tính trên 100 g táo tươi cung cấp năng lượng 229 kJ, protein 0,3 g, lipid 0,4 g, carbohydrate 11,8 g, acid hữu cơ 0,6 g, chất xơ 2,3 g và khoáng 0,3 g. Khi gọt vỏ hoặc cắt miếng táo, các không bào trong tế bào quả bị phá vỡ, các hợp chất phenol được giải phóng. Các phenol này bị chuyển hóa bởi enzyme polyphenol oxidase (còn gọi là tyrosinase) để tạo thành ortho-quinone trong điều kiện có oxy. Các ortho-quinone kết hợp với nhau tạo thành sắc tố nâu melanin, làm giảm giá trị cảm quan của sản phẩm.

Việc tạo lớp phủ lên quả táo cắt tươi bằng dịch tạo màng alginate có bổ sung cao chiết rong nâu *S. polycystum* có khả năng kháng oxy hóa là một giải pháp cho vấn đề hóa nâu làm giảm giá trị cảm quan của sản phẩm táo cắt tươi. Nghiên cứu này ứng dụng lên dòng sản phẩm trái cây cắt tươi, nhằm giữ được nhiều nhất tính chất tự nhiên và kéo dài thời gian bảo quản sản phẩm trái cây cắt tươi; một dòng sản phẩm tiện lợi phù hợp với xu hướng phát triển của xã hội công nghiệp hiện nay.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Quả táo tây (*Malus domestica*) mua từ hệ thống Siêu thị Co.opmart. Quả táo được chọn phải tươi, đồng đều về kích

*Tác giả liên hệ: Email: ttn.mai79@hutech.edu.vn

Effects of alginate-based edible coatings enriched with extract *Sargassum polycystum* on quality attributes of fresh-cut apples

Thi Ngoc Mai Tran^{1*}, Phuong Quyen Huynh¹,
Cong Danh Nguyen¹, Thi Giang Le¹,
Hoang Tinh Le¹, Thai Ngoc Uyen Nguyen²

¹Institute of Applied Sciences, Ho Chi Minh city University of Technology (HUTECH),
475A Dien Bien Phu Street, Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Materials Science and Technology, University of Science,
Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

227 Nguyen Van Cu, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 2 August 2021; revised 25 August 2021; accepted 30 August 2021

Abstract:

The objective of this study was to evaluate the effect of alginate edible coating supplemented with glycerol and brown seaweed extract *Sargassum polycystum* (A-G-S film) on fresh-cut apples. The result obtained with the formula film A-G-S is the concentration of alginate/water 1.0%, glycerol 20%, and additional extract 2.0%. The A-G-S film on the surface of fresh-cut apples has the same antioxidant capacity as A-G-As film, using ascorbic acid as an antioxidant. These fresh-cut apples are recommended to be stored at 5±2°C for 12 days with a commercial acceptance ratio (CAR) of 59.57%. The values of WL, TSS/TA, TPC are respectively 16.51±0.52%, 30.80, and 0.63±0.02 mg/g. The film has an average thickness of 7.04 µm, uniform surface, certain ductility, and water vapor transmittance rate (WVTR) of the film 5.31x10⁻⁴ g/mm².

Keywords: alginate, apple, brown seaweed, edible coating, *Sargassum*.

Classification number: 4.1

cỡ, màu sắc, độ chín, hình dạng và được rửa sạch bằng nước cất. Quả táo được cắt theo chiều dọc thành 6-8 miếng, bỏ vỏ và lõi hạt.

Sodium alginate (HiMedia, Ấn Độ) dạng bột, màu trắng ngà; glycerol (Merck, Đức) dạng lỏng, không màu; acid ascorbic (DSM, Trung Quốc) dạng bột tinh thể màu trắng.

Tảo nâu *S. polycystum* thu từ vùng biển Ninh Thuận. Rong được ngâm, rửa sạch, phơi/sấy ở 45-50°C đến khô, xay nhỏ, ngâm chiết trong ethanol. Dịch chiết đem cô quay chân không để thu cao khô kiệt (độ ẩm khoảng 16%).

2.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng táo cắt tươi phủ màng A-G-S

Phương pháp tạo màng: dung dịch alginate 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 và 2,5% (w/v) được chuẩn bị bằng cách hoà bột alginate vào nước cất nóng khoảng 70°C, khuấy đều cho đến khi hỗn hợp trong suốt. Sau đó để nguội về nhiệt độ phòng, bổ sung glycerol tỷ lệ 20% (v/v) và khuấy đều cho đến khi hỗn hợp đồng nhất. Nồng độ alginate được chọn được bổ sung cao chiết *S. polycystum* với tỷ lệ 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 và 2,5% (w/w). Acid ascorbic dùng làm chất tham chiếu có tỷ lệ 2% (w/v).

Tạo màng bằng phương pháp nhúng với số lượng 30 miếng cho một lần nhúng, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thời gian nhúng giữ trong dung dịch alginate là 5 phút để đảm bảo lớp phủ đồng nhất trên toàn bộ bề mặt của miếng táo. Sau đó, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng, rồi cho vào hộp nhựa đậy kín và bảo quản ở nhiệt độ 5±2°C. Các miếng táo này được đánh giá các chỉ tiêu hoá lý và cảm quan sau mỗi 3 ngày, trong thời gian 18 ngày bảo quản.

Các phương pháp đánh giá chất lượng:

- Xác định WL (%): tỷ lệ hao hụt khối lượng được xác định bằng phương pháp cân và được tính theo công thức:

$$WL (\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

trong đó: W_1 là khối lượng ban đầu của mẫu (g); W_2 là khối lượng mẫu tại mỗi thời điểm khảo sát (g).

- Xác định TSS (%): tổng hàm lượng chất rắn hoà tan được xác định bằng khúc xạ kế (Atago Master-T 0-32% Atc Brix Refractometer, USA) (AOAC 932.12).

- Xác định TA (%): hàm lượng acid tổng số được xác định bằng phương pháp chuẩn độ với dung dịch NaOH 0,1N với chất chỉ thị phenolphthalein 1% (AOAC 942.15).

- Xác định TPC (mg/g) bằng phương pháp Folin-Ciocalteu theo TCVN 9745-1:2013. Hàm lượng polyphenol tổng có trong 1 g mẫu được tính theo công thức sau:

$$TPC (mg/g) = \frac{C_M \cdot v}{m}$$

trong đó: C_M là hàm lượng polyphenol tổng có trong mẫu được tính dựa trên đường chuẩn acid gallic (mg/g); v là thể tích định mức sau khi xử lý mẫu (ml); m là khối lượng mẫu (g).

- Xác định CAR (%): các miếng táo đạt chất lượng được chấp nhận thương mại được xác định theo TCVN 9688:2013 về táo bảo quản lạnh. Tỷ lệ quả chấp nhận thương mại được tính theo công thức:

$$CAR (\%) = \frac{W_2}{W_1} \times 100\%$$

trong đó: W_1 là khối lượng ban đầu của mẫu (g); W_2 là khối lượng mẫu đạt chất lượng theo TCVN 9688:2013 tại mỗi thời điểm khảo sát (g).

- Đánh giá cảm quan về cấu trúc, màu sắc, mùi và vị bằng phương pháp so hàng thị hiếu thang điểm 7 với số người khảo sát là 30 người.

Phương pháp xử lý số liệu:

Xử lý số liệu bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV. Tất cả số liệu được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ SD, các chênh lệch khác biệt thể hiện bằng các ký hiệu ^{a, b, c, d} ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

2.3. Khảo sát tính chất cơ lý của màng A-G-S

Do độ dày và cấu trúc bề mặt màng: bằng kính hiển vi điện tử quét SEM SU3500 (Hitachi, Nhật Bản) độ phóng đại 300.000 lần, thế gia tốc từ 0,5 đến 30 kV, đầu dò SE, BSE và UVD.

Độ bám dính: độ bám dính, đàn hồi, dai và dẻo của màng được xác định bằng cách tạo những vết rạch bằng lưỡi lam, chụp ảnh dưới kính hiển vi quang học CX23 (Olympus, Nhật Bản).

WVTR (g/mm²): cho một lượng nước xác định vào lọ bi, đậy kín bằng màng A-G-S, sau 1 ngày ở điều kiện bảo quản của mẫu nghiên cứu, xác định lượng nước mất đi bằng phương pháp cân. Tốc độ truyền hơi nước trong 1 ngày được tính theo công thức sau:

$$WVTR (g/mm^2) = \frac{\Delta m}{S}$$

trong đó: Δm là chênh lệch khối lượng nước sau 1 ngày (g); S là diện tích màng phủ miệng lọ bi (mm²).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng táo cắt tươi phủ màng A-G-S

Ảnh hưởng của nồng độ alginate và tỷ lệ cao chiết bổ sung vào dịch tạo màng alginate đến chất lượng táo cắt tươi:

Táo cắt miếng làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc với môi trường, do đó hoạt động của các quá trình trao đổi chất như hô hấp, oxy hóa và thoát hơi nước tăng lên. Lớp phủ ăn

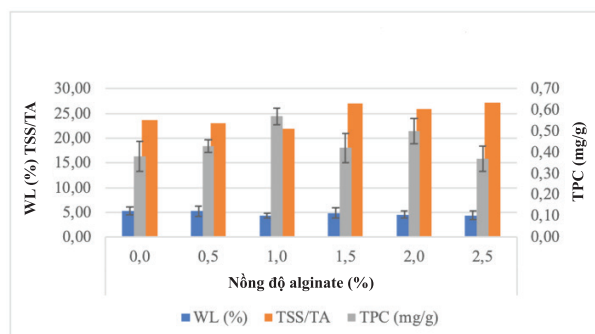
được hoạt động như một lớp màng bao bọc bên ngoài các lỗ khí trên bề mặt miếng táo, đóng vai trò như một rào cản giúp bảo vệ các tế bào, giảm hô hấp, giảm tốc độ phản ứng hóa nâu trên bề mặt miếng táo, giảm thoát hơi nước, giảm mất độ ẩm và trao đổi khí, do đó có thể cải thiện được chất lượng miếng táo cắt tươi [2]. Vì thế, việc lựa chọn nồng độ chất tạo màng và thành phần chức năng bổ sung làm tăng tính kháng oxy hóa của màng là cần thiết.

Kết quả hình 1 cho thấy, nồng độ alginate 1,0% có tỷ lệ WL thấp nhất, sự thay đổi TSS/TA nhỏ nhất và hàm lượng TPC giữ được cao nhất; điều này chứng tỏ ở nồng độ 1,0% xảy ra sự biến động trong miếng táo là nhỏ nhất nên tính chất dinh dưỡng giữ được nhiều nhất. Do đó, tỷ lệ này được chọn để khảo sát nồng độ cao chiết rong nâu bổ sung vào với mục đích làm giảm phản ứng hóa nâu điển hình trên bề mặt miếng táo sau khi cắt. Kết quả hình 2 cho thấy, hàm lượng TPC tăng tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết bổ sung và ở tỷ lệ cao chiết 2,0 và 2,5% thì hàm lượng TPC không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Vậy nên, dung dịch tạo màng có nồng độ alginate 1,0% và tỷ lệ cao chiết rong nâu *S. polycystum* bổ sung là 2,0%.

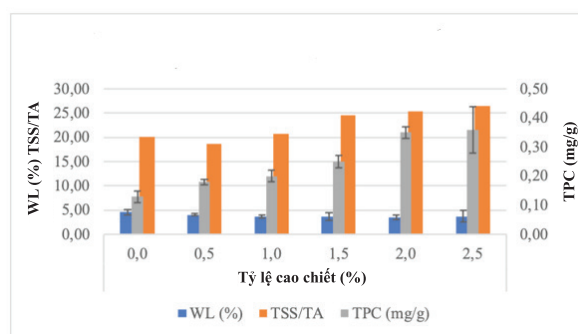
Sự thay đổi chất lượng táo cắt tươi theo thời gian bảo quản của các loại màng khác nhau:

Từ thông số tạo màng A-G và A-G-S có được ở trên, tiến hành khảo sát hiệu quả của chất kháng oxy hóa tự nhiên (cao chiết rong nâu *S. polycystum*) so với chất kháng oxy hóa hóa học (acid ascorbic) ở cùng nồng độ (màng A-G-As); đồng thời khảo sát thời gian khuyến nghị cho sản phẩm. Kết quả được thể hiện ở hình 3 và 4.

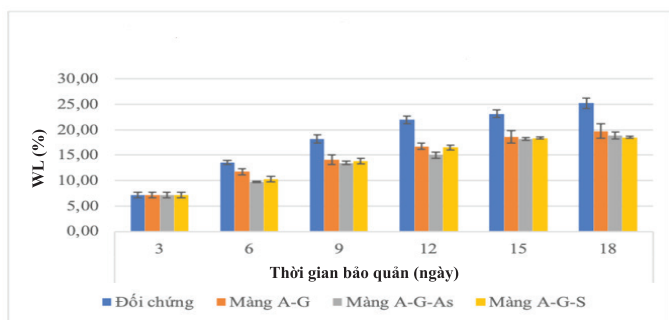
Kết quả hình 3 cho thấy, WL của tất cả các mẫu đều có xu hướng tăng theo thời gian lưu trữ. Tuy nhiên, có sự khác biệt rõ về sự tăng của mẫu đối chứng và mẫu phủ màng A-G (sau 18 ngày bảo quản giá trị WL tương ứng là $25,24 \pm 1,05\%$ và $19,72 \pm 1,46\%$). Bên cạnh đó, mẫu phủ màng A-G-As và màng A-G-S có WL tăng ít hơn và gần như không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 95% so với mẫu phủ màng A-G (giá trị WL sau 18 ngày bảo quản tương ứng là $18,87 \pm 0,64\%$ và $18,51 \pm 0,17\%$). Kết quả này cho thấy tác



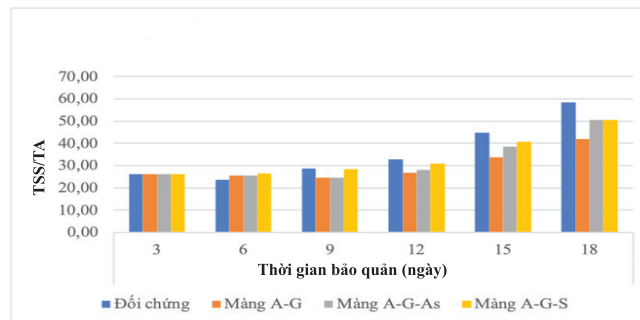
Hình 1. Nồng độ alginate (màng A-G) đến chất lượng táo cắt tươi.



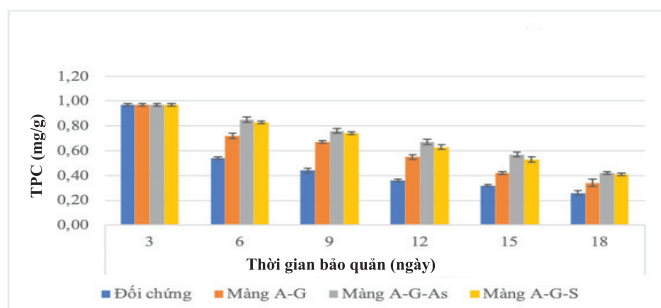
Hình 2. Tỷ lệ cao chiết bổ sung vào dịch tạo màng alginate (màng A-G-S) đến chất lượng táo cắt tươi.



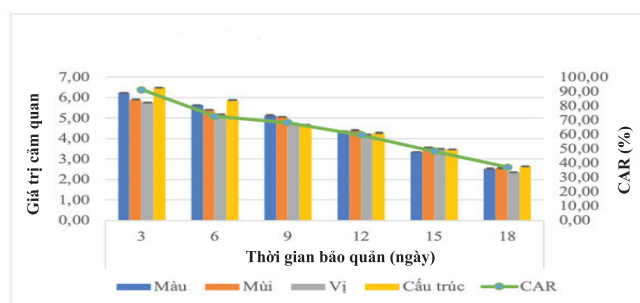
Hình 3. WL theo thời gian bảo quản táo cắt tươi của các loại màng khác nhau.



Hình 4. Tỷ lệ TSS/TA theo thời gian bảo quản táo cắt tươi của các loại màng khác nhau.



Hình 5. TPC theo thời gian bảo quản táo cắt tươi của các loại màng khác nhau.



Hình 6. Đánh giá cảm quan và CAR theo thời gian bảo quản táo cắt tươi phủ màng A-G-S.

dụng tích cực của màng alginate trong việc ngăn ngừa giảm WL. Kết quả tương tự cũng đã được báo cáo ở quả dưa cắt tươi [13], xoài [14] và xoài cắt tươi [15], việt quất... [6].

Hệ số độ chín TSS/TA của mẫu là các thành phần tạo hương vị chính và cũng là các thành phần dinh dưỡng trong táo. TSS là một nhóm các hợp chất hòa tan bao gồm đường, acid và vitamin. TSS chứa các tiểu phần chính của hô hấp và thường được sử dụng để chỉ chất lượng sau thu hoạch và độ chín của quả [16]. Kết quả hình 4 cho thấy, tỷ lệ TSS/TA của tất cả các mẫu đều tăng từ từ theo thời gian lưu trữ và có sự khác biệt giữa mẫu có bao màng và đối chứng. Quả được bọc màng tích lũy TSS thấp hơn so với đối chứng do lớp phủ làm giảm tốc độ hô hấp và hoạt động trao đổi chất bằng cách ngăn chặn trao đổi khí, từ đó trì hoãn quá trình chín và hạn chế mất độ ẩm [5]. Việc giảm độ acid là bình thường trong suốt quá trình lưu trữ sau thu hoạch, là do việc sử dụng chúng làm chất nền cho sự hô hấp và chuyển đổi thành đường. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả được báo cáo về việc sử dụng màng phủ alginate trên quả xoài [14], việt quất [6] sau thu hoạch.

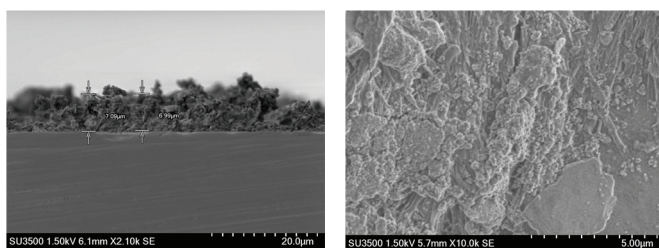
Kết quả hình 5 cho thấy, hàm lượng TPC giảm dần theo thời gian lưu trữ của tất cả các mẫu, trong đó tốc độ giảm của mẫu đối chứng là cao nhất, tiếp sau là mẫu có bao màng A-G. Đối với mẫu phủ màng A-G-As và A-G-S thì sự giảm không khác biệt ở mức có ý nghĩa 95% theo thời gian bảo quản, hàm lượng TPC tương ứng là $0,67 \pm 0,02$ và $0,63 \pm 0,02$ mg/g sau 12 ngày; $0,57 \pm 0,02$ và $0,53 \pm 0,02$ mg/g sau 15

ngày; $0,42 \pm 0,01$ và $0,41 \pm 0,01$ mg/g sau 18 ngày bảo quản. Kết quả này cho thấy được hiệu quả của việc phủ màng trong bảo quản táo cắt tươi. Khi gọt vỏ hoặc cắt miếng táo, các không bào trong tế bào quả bị phá vỡ, các hợp chất phenol được giải phóng. Các phenol này bị chuyển hóa bởi enzyme polyphenol oxidase để tạo thành ortho-quinone trong điều kiện có oxy. Các ortho-quinone kết hợp với nhau tạo thành sắc tố nâu melanin, làm giảm giá trị cảm quan của sản phẩm. Việc sử dụng cao chiết rong nâu *S. polycystum* [17] trong nghiên cứu này đóng vai trò như một chất kháng oxy hóa tự nhiên so với acid ascorbic ở cùng nồng độ thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Kết quả này có ý nghĩa trong việc định hướng sử dụng những hợp chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc tự nhiên bổ sung vào thực phẩm thay thế việc sử dụng phụ gia.

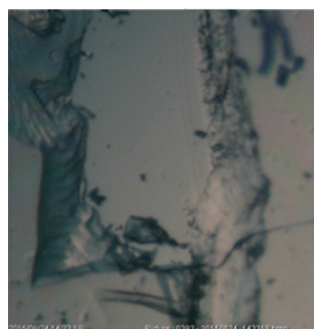
CAR là một chỉ số quan trọng để phản ánh giá trị kinh tế của trái cây tươi đạt chất lượng hoặc đạt được sự chấp nhận của người tiêu dùng [16]. Hình 6 cho thấy, giá trị cảm quan (màu, mùi, vị, cấu trúc) và CAR của miếng táo cắt tươi phủ màng A-G-S (đã được lựa chọn từ các khảo sát trên) giảm dần theo thời gian lưu trữ. CAR sau 12, 15 và 18 ngày bảo quản tương ứng là 59,57, 48,14 và 37,14%. Do đó, thời gian khuyến nghị cho sản phẩm táo cắt tươi phủ màng A-G-S là 12 ngày.

3.2. Tính chất cơ lý của màng A-G-S

Độ dày, cấu trúc bề mặt và đàn hồi của màng A-G-S được thể hiện ở hình 7 và 8.



Hình 7. Ảnh SEM cho kết quả độ dày và bề mặt màng A-G-S.



Hình 8. Ảnh chụp vết rạch màng A-G-S.

Từ hình 7 cho kết quả độ dày trung bình của màng A-G-S là $7,04 \mu\text{m}$; bề mặt gồ ghề do sự bay hơi nước nơi tiếp xúc không khí nhưng khá đồng nhất, không bị co rúm lại. Hình chụp vết rạch (hình 8) cho thấy màng không bị rách, chỉ giãn ra và bong lên khỏi bề mặt, điều này cho thấy được độ bám dính, đàn hồi, dai và dẻo của màng. WVTR của màng A-G-S là $5,31 \times 10^{-4} \text{ g/mm}^2$, chậm hơn so với đối chứng là $6,12 \times 10^{-4} \text{ g/mm}^2$ cho thấy tác dụng của màng làm cản sự mất nước của mẫu nghiên cứu.

4. Kết luận

Từ các số liệu phân tích cho thấy tác dụng của màng phủ A-G-S lên chất lượng, thời gian bảo quản và giá trị cảm quan cũng như giá trị thương mại của quả táo cắt tươi sau thu hoạch. Ở các nồng độ alginate, nồng độ cao chiết rong nâu *S. polycystum* khác nhau đều có ảnh hưởng đến WL, TSS/TA, TPC và CAR. Ở nồng độ alginate 1,0% và cao chiết rong nâu *S. polycystum* 2,0% được chọn để tạo màng A-G-S, qua khảo sát sự thay đổi các giá trị WL, TSS/TA, TPC và CAR theo thời gian bảo quản thì thời gian khuyến nghị cho sản phẩm là 12 ngày ở $5 \pm 2^\circ\text{C}$ với giá trị CAR là 59,57%; các giá trị WL, TSS/TA, TPC tương ứng là $16,51 \pm 0,52\%$, 30,80, $0,63 \pm 0,02 \text{ mg/g}$. Nghiên cứu này cũng cho thấy hiệu quả của cao chiết rong nâu *S. polycystum* (chất kháng oxy hóa tự nhiên) so với acid ascorbic (phụ gia) không khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Kết quả chụp SEM cho thấy, màng A-G-S có độ dày trung bình $7,04 \mu\text{m}$, bề mặt đồng nhất, có độ dai, dẻo nhất định và cản được sự mất nước của mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.S. Belloso, R.S. Fortuny (2011), *Advances in Fresh-cut Fruits and Vegetables Processing*, CRC Press, 402pp.
- [2] E.A. Baldwin, R. Hagenmaier, J. Bai (2012), *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, CRC Press, 460pp.
- [3] S.C. Riva, U.O. Opara, O.A. Fawole (2020), "Recent developments on postharvest application of edible coatings on stone fruit: A review", *Scientia Horticulturae*, **262**, DOI: 10.1016/j.scienta.2019.109074.
- [4] S.M. Nor, P. Ding (2020), "Trends and advances in edible biopolymer coating for tropical fruit: A review", *Food Research International*, **134**, DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109208.
- [5] B. Hassan, S.A.S. Chatha, A.I. Hussain, et al. (2018), "Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review", *International Journal of Biological Macromolecules*, **109**, pp.1095-1107, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097.
- [6] C.M. Jaramillo, C.Q. Pimiento, C.G. Hoyos, et al. (2020), "Alginate-edible coatings for application on wild andean blueberries (*Vaccinium meridionale swartz*): Effect of the addition of nanofibrils isolated from cocoa by-products", *Polymers*, **12**(4), DOI: 10.3390/polym12040824.
- [7] T.S. Parreidt, M. Lindner, I. Rothkopf, et al. (2019), "The development of a uniform alginate-based coating for cantaloupe and strawberries and the characterization of water barrier properties", *Foods*, **8**(6), DOI: 10.3390/foods8060203.
- [8] S. Lim, A.H. Choi, M. Kwon, et al. (2019), "Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components", *Food Chemistry*, **278**, pp.178-184, DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.058.
- [9] R. Alghazeer, N.K. Howell, M.B.E. Naili, et al. (2018), "Anticancer and antioxidant activities of some algae from western Libyan coast", *Natural Science*, **10**(7), pp.232-246, DOI: 10.4236/ns.2018.107025.
- [10] S. Sahraee, J.M. Milani, J.M. Regenstein, et al. (2019), "Protection of foods against oxidative deterioration using edible films and coatings: A review", *Food Bioscience*, **32**, DOI: 10.1016/j.fbio.2019.100451.
- [11] H. Doh, K.D. Dunno, W.S. Whiteside (2020), "Preparation of novel seaweed nanocomposite film from brown seaweeds *Laminaria japonica* and *Sargassum natans*", *Food Hydrocolloids*, **105**, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105744.
- [12] I. Albertos, A.B.M. Diana, M. Burón, et al. (2019), "Development of functional bio-based seaweed (*Himanthalia elongata* and *Palmaria palmata*) edible films for extending the shelflife of fresh fish burgers", *Food Packaging and Shelf Life*, **22**, DOI: 10.1016/j.fpsl.2019.100382.
- [13] N. Azaraksh, A. Osman, H.M. Ghazali, et al. (2014), "Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple", *Postharvest Biology and Technology*, **88**, pp.1-7, DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.09.004.
- [14] S. Rastegar, H.H. Khankahdani, M. Rahimzadeh (2019), "Effectiveness of alginate coating on antioxidant enzymes and biochemical changes during storage of mango fruit", *Journal Food Biochem.*, **43**(11), DOI: 10.1111/jfbc.12990.
- [15] R.M.R. Sánchez, M.A.R. Graü, I.O. Serrano, et al. (2013), "Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut Kent mangoes", *LWT - Food Science and Technology*, **50**(1), pp.240-246, DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.021.
- [16] Y. Lin, N. Li, H. Lin, et al. (2020), "Effects of chitosan treatment on the storability and quality properties of longan fruit during storage", *Food Chem.*, **306**, DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125627.
- [17] T.T.N. Mai (2020), "Comparison of extraction process from brown seaweed *Sargassum* by different methods and evaluation of antioxidant possibility by DPPH method", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **62**(6), pp.34-38 (in Vietnamese).

Ứng dụng chỉ thị phân tử microsatellite trong truy xuất phả hệ quần đàn cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) chọn giống

Trần Thị Phương Dung^{1,2*}, Nguyễn Hồng Lộc³, Nguyễn Hoàng Thông³,
Lê Hoàng Khôi Nguyên⁴, Nguyễn Văn Sáng³

¹Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh, 280 An Dương Vương, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, 116 Nguyễn Đình Chiểu, phường Đa Kao, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 30/7/2021; ngày chuyển phản biện 26/7/2021; ngày nhận phản biện 26/8/2021; ngày chấp nhận đăng 30/8/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu sử dụng bộ chỉ thị gồm 10 microsatellite để truy xuất phả hệ quần đàn cá tra chọn giống thế hệ đầu tiên. Kết quả cho thấy: (1) Khi phân tích 50 mẫu cá tra bố mẹ G0 và 50 mẫu cá con G1 thì hiệu suất PCR đạt 98-100% và số lượng alen (N_A) dao động 5-14 mỗi locus. Hệ số đa dạng di truyền (PIC) trung bình của các microsatellite trên G0 và G1 lần lượt là 0,71 và 0,67, trung bình tỷ lệ dị hợp tử quan sát (H_O) và tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (H_E) trên tất cả các locus lần lượt là 0,73, 0,76, 0,73, 0,71. 10 microsatellite khảo sát đều ổn định và đa hình phù hợp với việc truy xuất phả hệ; (2) Sau khi sàng lọc các chỉ thị và truy xuất phả hệ trên 50 gia đình cá chọn giống cho thấy bộ chỉ thị với 9 microsatellite (loại trừ Pahy-02) truy xuất phả hệ cao, đạt được truy xuất bố mẹ chính xác 93,4%, trong đó truy xuất các gia đình con bố không có half-sib đạt 93,0% và các gia đình con bố có half-sib đạt 94,0%. Qua các kết quả cho thấy, bộ chỉ thị với 9 microsatellite có thể ứng dụng để truy xuất phả hệ trong các chương trình chọn giống trên cá tra.

Từ khóa: microsatellite, multiplex PCR, *Pangasianodon hypophthalmus*, truy xuất phả hệ.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Nuôi trồng thủy sản hiện là ngành sản xuất phát triển nhanh nhất nhằm cung cấp thực phẩm cho con người trên toàn thế giới [1]. Trong lĩnh vực quan trọng này, chọn giống là phương pháp ưu tiên hàng đầu được mong đợi vận dụng [2]. Một trong những nguyên nhân liên quan đến sự phát triển của các chương trình chọn giống là thông tin phả hệ còn hạn chế và chi phí cao [2, 3]. Bằng cách khai thác các công nghệ mới trong di truyền phân tử, nghiên cứu truy xuất phả hệ trên thủy sản đã phát triển để phục vụ các chương trình chọn giống [4]. Nghiên cứu chỉ thị phân tử dùng để xác định phả hệ cho chọn giống, cụ thể là truy các cá thể con theo bố mẹ đã được thực hiện trên các đối tượng thủy sản như trên cá thân dẹt (*Scophthalmus maximus*), cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*), cá hồi (*Salmo salar*), hàu Thái Bình Dương (*Crassostrea gigas*) và cá trắm (*Ctenopharyngodon idella*) [3, 5-7]. Việt Nam là nước sản xuất thủy sản lớn trên thế giới, trong đó, cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là đối tượng nuôi quan trọng và xuất khẩu chủ lực ở Việt Nam. Năm 2019, diện tích nuôi cá tra tăng 4% so với 2018 (6.675 ha năm 2019 so với 6.418 ha năm 2018) nhưng sản lượng tăng đến 10% (1,58 triệu tấn năm 2019 so với 1,42 triệu tấn năm 2018). Nếu tính từ năm 2015, diện tích nuôi cá

tra tăng trung bình 3%/năm trong khi sản lượng thu hoạch tăng trung bình 6%/năm [8]. Từ năm 2001, chọn giống trên cá tra với các tính trạng tăng trưởng, tỷ lệ phôi, khả năng kháng bệnh... đã được tiến hành nghiên cứu [9, 10]. Trong các chương trình chọn giống cá tra theo phương pháp chọn lọc gia đình, chủ yếu áp dụng phương pháp đánh dấu vật lý, cụ thể là đánh dấu từ PIT (Passive integrated transponder) nhằm phân biệt các cá thể trên cá giống 15-20 g và ương trong 3-4 tháng. Chính phải chờ ương đến kích cỡ cá giống cho đánh dấu nên ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ ở các gia đình phải được tính toán và phần nào ảnh hưởng đến độ chính xác của chọn lọc. Các nghiên cứu về bộ chỉ thị phân tử microsatellite nhằm truy xuất phả hệ trên cá tra chọn giống đã được phát triển cho *P. hypophthalmus* với khả năng truy xuất đạt đến 90,7% [11-13]. Năm 2018, thông tin hệ gen của cá tra đã được công bố với công nghệ giải trình tự thế hệ mới [14]. Dựa trên các thông tin này, bộ chỉ thị phân tử đặc hiệu multiplex PCR phục vụ cho chọn giống cá tra đã được xây dựng [15]. Mục tiêu của nghiên cứu này là dùng bộ chỉ thị phân tử đã sàng lọc thử nghiệm truy xuất phả hệ với kết quả cao hơn các nghiên cứu trước nhằm tiến đến thay thế đánh dấu vật lý, giúp ước tính các thông số di truyền chính xác hơn phục vụ chọn lọc.

*Tác giả liên hệ: Email: dungtpp@hcmue.edu.vn

The application of microsatellite markers for parentage analysis in selective population of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Thi Phuong Dung Tran^{1,2*}, Hong Loc Nguyen³,
Hoang Thong Nguyen³, Hoang Khoi Nguyen Le⁴,
Van Sang Nguyen³

¹Nong Lam University of Ho Chi Minh City, Quarter 6,
Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh University of Education, 280 An Duong Vuong Street,
Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Research Institute for Aquaculture No.2,
116 Nguyen Dinh Chieu Street, Da Kao Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴International University, Vietnam National University, Ho Chi Minh City,
Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City - Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 30 July 2021; revised 26 August 2021; accepted 30 August 2021

Abstract:

The research used ten newly developed microsatellite markers set which were assigned offsprings to their parents on the first generation of selection on striped catfish. The result shows: (1) When analysing 50 samples of parents (G0) and 50 samples of offsprings (G1), the PCR ratio was from 98-100%, the allele number (NA) ranged from 5-14 per locus. The average Polymorphic Information Content (PIC) of microsatellites on G0 and G1 were 0.71 and 0.67, respectively. The average observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) all over loci were 0.73, 0.76, and 0.73, 0.71, respectively. Ten microsatellites are stable and polymorphic that are suitable for parentage analysis. (2) After makers screening, parentage analysis on 50 selective families, the initial set of nine microsatellites (excluded Pahy-02) for parentage analysis was effective with 93.4% of offspring allocated unambiguously to their parental pairs, of which families with the father not having half-sib, 93.0% of offspring was allocated unambiguously to their parental pairs and families with the father having half-sib, 94.0% of offspring allocated unambiguously to their parental pairs. The results show that the maker set with nine microsatellites can be used in parentage analysis for the breeding program on striped catfish.

Keywords: microsatellite, multiplex PCR, *Pangasianodon hypophthalmus*, parentage analysis.

Classification number: 4.5

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Mẫu cá tra

Cá tra bố mẹ thuộc quần thể chọn giống kháng bệnh gan thận mủ ban đầu (G0) được thành lập trong đề tài nghiên cứu chọn giống kháng bệnh gan thận mủ giai đoạn 2012-2015 tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II (Viện II) tại 116 Nguyễn Đình Chiểu, Đa Kao, Quận 1, TP Hồ Chí Minh và quần thể G1 là cá con của quần thể G0. Các nhóm cá bố mẹ G0 (3,5-8 kg) và cá con G1 (20-25 g) được thu mẫu vây ngực tại Trung tâm Quốc gia giống Thủy sản nước ngọt Nam Bộ (xã An Thái Trung, Cái Bè, Tiền Giang) thuộc Viện II. Sau đó, mẫu vây của các nhóm mẫu được đựng trong eppendorf có dán nhãn riêng biệt mã hóa theo từng gia đình.

2.2. Phương pháp tiến hành

Tách chiết DNA tổng số: các mẫu vây ngực được thu thập và ngâm trong ethanol 80% và bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Phương pháp kết tủa muối được sử dụng để ly trích ADN [16].

Kỹ thuật multiplex PCR: các cặp mồi microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu này được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu.

Chỉ thị	NST	Motif	Trình tự mồi (5'-3')	Loại huỳnh quang	Vùng kích thước alen dự kiến (bp)	Nồng độ mồi tối ưu (μM)
Pahy-01	Số 1	(TCA)11	F: GCACGTTTCACCTCCATCCA R: GTTGACGAAAAACACACGG	6FAM	104-119	0,2
Pahy-02	Số 4	(TG)24	F: AGCGTTTCTATCCCGCCTC R: CAGACAGTTTCCCTGGTGGT	PET	286-317	0,4
Pahy-03	Số 5	(TG)23	F: AGGTGAAATCCCGAGCAG R: TCCCGATGCCAGAACCTA	VIC	204-232	0,2
Pahy-04	Số 6	(GT)15	F: TCAGTGCACGTCTTACCCAC R: CGTTGTGTGCCCTCAAAGTG	6FAM	271-291	0,2
Pahy-06	Số 8	(AC)20	F: TGAAGCGTGGAGAGAAGCTG R: GTAACCGTTTCTGGGGCTCA	NED	304-324	0,2
Pahy-10	Số 16	(TC)20	F: TCTTGAACACGTGGAGGAGC R: TATGGCTATGGCTGCTGAGC	NED	216-226	0,2
Pahy-13	Số 19	(AC)17	F: CACGCTGAGTGTGAAATGCC R: TGCTTTCCCATGATGCACCT	6FAM	194-206	0,2
Pahy-15	Số 21	(AC)20	F: ACCCTCTGTGGTGTCTTCA R: GGGACTCTGTGGAGCGTAAC	VIC	308-338	0,4
Pahy-17	Số 23	(AC)17	F: GCGCTGATGTGCTTTTATACTGA R: GATGCTGCCAGACACTGAGT	PET	205-223	0,2
Pahy-18	Số 25	(GT)20	F: CTTCGACTTCCAAGGCACCT R: TGTGAGCTCATCTCCCTCA	VIC	114-136	0,2

Nguồn: [15].

Phản ứng multiplex PCR có thể tích 10 µl được tối ưu với các thành phần gồm 1,0 µl DNA khuôn, 5 µl multiplex PCR Master Mix (Qiagen) và 0,2 µl hỗn hợp primer, nước khử ion 3,8 µl. Chu trình nhiệt như sau: 95°C trong 15 phút, 30 chu kỳ bao gồm 95°C trong 30 giây, 55°C trong 90 giây, 72°C trong 60 giây và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 60°C trong 30 phút.

Điện di và đọc kết quả PCR: sản phẩm PCR được phân tích kích thước đoạn DNA trên hệ thống điện di mao quản 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại Công ty Nam Khoa, 793/58 Trần Xuân Soạn, Quận 7, TP Hồ Chí Minh. Xác định các alen được thực hiện thông qua phần mềm GeneMapper 5 (Applied Biosystems).

Phương pháp sàng lọc các microsatellite phục vụ cho truy xuất phả hệ

Khảo sát tính ổn định và đa hình của bộ chỉ thị trên nguồn mẫu nghiên cứu: khảo sát tính ổn định và đa hình của bộ chỉ thị trên 50 cá thể bố mẹ G0 và 50 cá thể cá con G1 qua hiệu suất PCR [12]. Mức độ sai lệch khỏi cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) của các microsatellite được kiểm định Bonferroni và các thông số di truyền trên quần đàn G0 và G1 như số lượng alen (N_A), hệ số đa dạng di truyền (PIC), tỷ lệ dị hợp tử quan sát (H_o), tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (H_e) và tần số null-alen được tính toán bằng phần mềm Cervus 3.0.7 [17]. Microsatellite có hiệu suất PCR trên 90%, tuân theo quy luật Hardy-Weinberg và có số lượng alen trên 5 alen phù hợp để truy xuất phả hệ [12, 13].

Truy xuất thử nghiệm phả hệ bằng bộ chỉ thị microsatellite trên 50 gia đình cá giống và đánh giá năng lực truy xuất của bộ chỉ thị:

- Phân tích thứ nhất: truy xuất thử nghiệm phả hệ bằng bộ chỉ thị gồm 10 microsatellite trên 50 gia đình (40 con bố và 50 con mẹ tham gia sinh sản tạo ra 50 gia đình gồm 20 gia đình con bố có half-sib và 30 gia đình con bố không có half-sib) có 500 cá thể cá con G1 (10 cá con/gia đình). Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm COLONY 2.0.6.6 với thuật toán Maximum Likelihood kết hợp với Pair Likelihood. Các tỷ lệ để đánh giá năng lực truy xuất được tính toán theo J. Fu và cs (2013) [7] và M.T. Nguyen và cs (2019) [13] cho chung tất cả 50 gia đình (hay tính riêng trên hai nhóm gia đình: bố có half-sib (a), bố không có half-sib (b)).

- Phân tích thứ hai: sau khi truy xuất phả hệ với 10 microsatellite, tần số null-alen cao có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ lỗi kiểu gen, tỷ lệ mismatch cao khi truy xuất phả hệ với 2 mismatch được tính bằng phần mềm CERVUS 3.0.7, MICROCHECKER, COLONY 2.0.6.6, VITAGGIGN 8.5.

Do chỉ thị Pahy-02 có tần số null-alen cao có ý nghĩa thống kê (0,063), sai số ghi nhận và tỷ lệ mismatch cao nhất trong 10 chỉ thị (lần lượt là 0,007 và 0,134) (kết quả không trình bày cụ thể trong nghiên cứu này) nên Pahy-02 được loại bỏ khi tiến hành truy xuất phả hệ, bộ chỉ thị truy xuất còn lại với 9 microsatellite.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả đánh giá tính ổn định và đa hình của bộ microsatellite trên quần đàn nghiên cứu

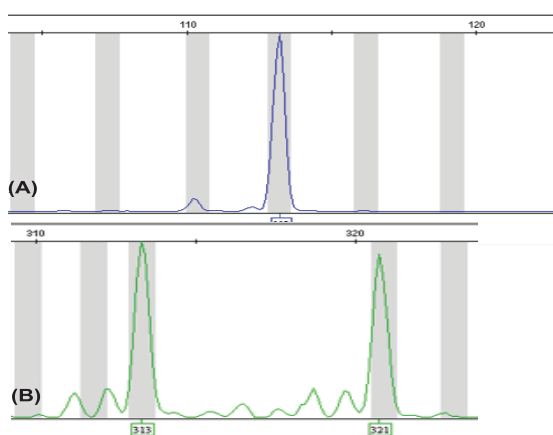
Tỷ lệ khuếch đại và thông tin đa dạng di truyền các microsatellite khảo sát trên 50 mẫu bố mẹ G0 và 50 mẫu đàn con G1 được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Thông tin đa dạng di truyền chung của 10 microsatellite trên quần đàn bố mẹ G0 và đàn con G1 trong nghiên cứu.

Quần đàn	Locus										Trung bình
	Pahy-01	Pahy-02	Pahy-03	Pahy-04	Pahy-06	Pahy-10	Pahy-13	Pahy-15	Pahy-17	Pahy-18	
Nhóm mẫu bố mẹ G0 (n=50)											
Hiệu suất PCR (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Số lượng alen (N _k)	6	14	11	14	7	7	8	13	8	9	9,70
Dị hợp tử quan sát (H _o)	0,68	0,68	0,74	0,72	0,70	0,66	0,74	0,70	0,92	0,72	0,73
Dị hợp tử mong đợi (H _e)	0,74	0,83	0,81	0,83	0,72	0,62	0,73	0,69	0,83	0,75	0,76
Thông tin đa hình (PIC)	0,69	0,80	0,78	0,80	0,67	0,57	0,68	0,64	0,79	0,70	0,71
Cân bằng di truyền Hardy-Weinberg (HWE)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ND	NS	ND
Tần số Null-alen	0,04	0,09	0,04	0,06	0,02	-0,03	-0,03	-0,02	-0,06	0,02	0,01
Nhóm mẫu cá con G1 (n=50)											
Hiệu suất PCR (%)	100	100	98,00	100	100	100	100	100	100	98,00	99,60
Số lượng alen (N _k)	6	10	8	10	5	5	7	7	8	5	7,10
Dị hợp tử quan sát (H _o)	0,68	0,78	0,57	0,70	0,80	0,70	0,80	0,66	0,90	0,74	0,73
Dị hợp tử mong đợi (H _e)	0,69	0,75	0,76	0,83	0,65	0,62	0,70	0,60	0,83	0,71	0,71
Thông tin đa hình (PIC)	0,63	0,72	0,72	0,80	0,58	0,55	0,66	0,55	0,79	0,65	0,67
Cân bằng di truyền Hardy-Weinberg (HWE)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ND	NS	ND
Tần số Null-alen	0,00	-0,03	0,15	0,08	-0,13	-0,06	-0,08	-0,08	-0,05	-0,02	-0,02

NS: cân bằng di truyền Hardy-Weinberg với mức ý nghĩa ($p < 0,01$) sau khi hiệu chuẩn với kiểm định Bonferroni; ND: không tính được cân bằng Hardy-Weinberg.

Các microsatellite có sản phẩm được khuếch đại cao từ 98-100% với sản phẩm đặc hiệu (hình 1) phù hợp cho truy xuất phả hệ [18]. Ngoài ra, truy xuất phả hệ yêu cầu các chỉ thị phân tử phải có độ đa hình cao [19]. Tổng số alen của từng chỉ thị trên nhóm mẫu cá tra từ 5-14 alen, trong đó thấp nhất là chỉ thị Pahy-06, Pahy-10, Pahy-18 khuếch đại 5 alen trên quần đàn G1, cao nhất là chỉ thị Pahy-02, Pahy-04 khuếch đại 14 alen trên quần đàn G0, tương đồng các công bố trên cá da trơn *Pangasius* là 7-10 alen [11] và trên cá tra là 1-9 alen [12], 4-7 alen [13]. Các microsatellite khảo sát trên quần đàn G0 và G1 đều tuân theo quy luật Hardy-Weinberg ngoại trừ Pahy-17. Trong nghiên cứu này, hệ số đa dạng di truyền (PIC) trung bình của các microsatellite trên G0 và G1 lần lượt là 0,71 và 0,67, tỷ lệ dị hợp tử quan sát trung bình (H_o) và tỷ lệ dị hợp tử mong đợi trung bình (H_e) trên tất cả các locus lần lượt là 0,73, 0,76 và 0,73, 0,71 (bảng 1). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về mức độ đa hình của chỉ thị microsatellite trên cá tra và các loài cá thuộc họ *Pangasius* [12, 13, 20]. Như vậy, 10 chỉ thị microsatellite trong nghiên cứu này đều đa hình, đáp ứng được các yêu cầu để được sử dụng trong truy xuất phả hệ. Ngoài ra, khi đánh giá đa dạng di truyền trên hai quần đàn cũng cho thấy, các chỉ thị có tồn tại null-alen với tần số từ -0,13 đến 0,15. Vì vậy, việc sử dụng chỉ thị trong truy xuất phả hệ cần kiểm tra tỷ lệ lỗi ghi nhận alen, null-alen và tỷ lệ mismatch trong truy xuất, tránh làm ảnh hưởng đến kết quả truy xuất.



Hình 1. Một số alen đặc hiệu được khuếch đại trong phản ứng Multiplex PCR. (A) Alen 113 của Pahy-01 và (B) Alen 313, 321 của Pahy-15.

3.2. Kết quả thử nghiệm truy xuất phả hệ

Kết quả truy xuất phả hệ trên 50 gia đình với 10 microsatellite và 9 microsatellite được trình bày ở bảng 3. Các phân tích chi tiết về truy xuất phả hệ theo nhóm các gia đình (gia đình con bố có half-sib và con bố không có half-sib) với 10 microsatellite và 9 microsatellite được trình bày ở bảng 4.

Bảng 3. Kết quả xác định phả hệ 50 gia đình cá tra chọn giống.

Các chỉ tiêu phân tích	Phân tích 1 (10 microsatellite)	Phân tích 2 (9 microsatellite)
Số cá con được truy xuất bố mẹ (con)	500	500
Tỷ lệ cá con truy xuất được bố mẹ (%)	91,0	94,8
Tỷ lệ cá con truy xuất bố đúng (P_f) (%)	94,8	96,0
Tỷ lệ cá con truy xuất mẹ đúng (P_m) (%)	85,0	94,2
Tỷ lệ cá con được truy xuất cả bố và mẹ đúng (P_{fm}) (%)	83,0	93,4

Bảng 4. Kết quả xác định phả hệ 20 gia đình bố có half-sib và 30 gia đình bố không có half-sib.

Các chỉ tiêu phân tích	Phân tích 1 (10 microsatellite)		Phân tích 2 (9 microsatellite)	
	Gia đình con bố có half-sib	Gia đình con bố không có half-sib	Gia đình con bố có half-sib	Gia đình con bố không có half-sib
Tỷ lệ cá con truy xuất bố đúng (P_f) (%)	91,5	95,5	95,5	96,3
Tỷ lệ cá con truy xuất mẹ đúng (P_m) (%)	73,5	89,0	94,5	94,0
Tỷ lệ cá con được truy xuất cả bố và mẹ đúng (P_{fm}) (%)	69,5	88,0	94,0	93,0

Trong phân tích thứ nhất với 10 microsatellite thì tỷ lệ cá con truy xuất được bố mẹ, bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng lần lượt là 91,0, 94,8, 85,0 và 83,0%. Kết quả tỷ lệ truy xuất gia đình con bố có half-sib (a) bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng lần lượt là 91,5, 73,5 và 69,5%, thấp hơn các gia đình con bố không có half-sib (b) bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng lần lượt là 95,5, 89,0 và 88,0%. Trong phân tích thứ hai, kết quả truy xuất cho thấy tỷ lệ cá con truy xuất được bố mẹ, bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng tăng lên so với truy xuất bằng 10 microsatellite lần lượt là 94,8, 96,0, 94,2 và 93,4%. Tỷ lệ truy xuất bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng của các gia đình (a) là 95,5, 94,5 và 94,0%, không chênh lệch nhiều so với trong gia đình (b) là 96,3, 94,0 và 93,0%.

3.3. Bàn luận

Ở phân tích thứ nhất, khả năng truy xuất cả bố và mẹ đúng trong các gia đình chọn giống với 10 microsatellite chưa cao (83,0%) có thể do sự tồn tại của lỗi kiểu gen và đột biến dẫn đến sự không tương thích giữa alen bố mẹ và con cái [19]. Khi truy xuất 50 gia đình, các chỉ thị có sự tồn tại null-alen trên quần đàn G0 và G1 với tần số -0,029 đến 0,064, có thể ảnh hưởng đến kết quả truy xuất theo khuyến cáo của E.E. Dakin và cs (2004) [21]. Đồng thời, lỗi kiểu gen của các chỉ thị cũng tồn tại với tần số thấp từ 0,000 đến 0,009 (các kết quả tần số null-alen, lỗi kiểu gen các chỉ thị không trình bày cụ thể trong nghiên cứu này). Mặc dù lỗi kiểu gen có thể cho phép nhỏ hơn 0,01 vẫn ảnh hưởng đến kết quả truy xuất [22]. Vì vậy, khi truy xuất phả hệ cần xử lý

các vấn đề này để có kết quả truy xuất chính xác nhất [17]. Một trong những phương án có thể là loại bỏ các chỉ thị có tần số null-alen và sai số ghi nhận alen cao là giải pháp để nâng cao hiệu suất truy xuất phả hệ [13]. Do đó, nghiên cứu này loại trừ microsatellite Pchy-02 trong truy xuất. Kết quả truy xuất với 9 microsatellite thì cho kết quả chính xác hơn (93,4%) so với khi truy xuất với 10 microsatellite (83,0%).

Ở phân tích thứ hai, kết quả truy xuất với 9 microsatellite tương đương so với một số nghiên cứu đã được báo cáo trên cá hồi vân (93,0-95,0%), cao hơn cá tra hiện nay (81,3-94,0%) [12, 13, 23-25]. Ngoài ra, khả năng truy xuất phả hệ cũng phụ thuộc vào cấu trúc các gia đình khi truy xuất [19]. Trong các chương trình chọn giống hiện nay, phương pháp phối thứ bậc tạo ra các gia đình có con bố half-sib được áp dụng chủ yếu [26]. Vì vậy, việc truy xuất được cá thể của các gia đình con bố có half-sib (a) đóng vai trò quan trọng hơn gia đình con bố không half-sib (b). Các cá con thuộc các gia đình (a) có thể có các alen giống nhau từ bố dẫn đến khó truy xuất bố mẹ đúng hơn các gia đình (b). Cho nên, bộ chỉ thị có khả năng truy xuất tốt các gia đình (a) so với gia đình (b) có ý nghĩa áp dụng thực tế trong chương trình chọn giống. Với kết quả truy xuất cả bố và mẹ đúng các gia đình (a) và các gia đình (b) cao (94,0 và 93,0%) thì bộ chỉ thị phân tử với 9 microsatellite phù hợp áp dụng vào thực tiễn cho việc truy xuất phả hệ trên quần đàn chọn giống tiếp theo.

Trong phân tích truy xuất phả hệ với 10 chỉ thị microsatellite, khả năng truy xuất được bố đúng (94,8%) cao hơn truy xuất mẹ đúng (85,0%), chủ yếu không truy xuất được mẹ từ gia đình con bố có half-sib (73,5%). Kết quả này cho thấy đây là hạn chế trong việc truy xuất phả hệ với bộ chỉ thị phân tử này trong chọn giống. Trong khi đó, truy xuất phả hệ với 9 microsatellite tăng khả năng truy xuất được bố và mẹ đúng đạt 96,0 và 94,2%. Tỷ lệ truy xuất bố, mẹ, cả bố và mẹ đúng với bộ chỉ thị 9 microsatellite của gia đình con bố không có half-sib (b) lần lượt là 96,3, 94,0, 93,0%, không chênh lệch nhiều so với truy xuất gia đình con bố có half-sib (a) là 95,5, 94,5 và 94,0% đã cải thiện được việc truy xuất bố hay mẹ đúng. Vì vậy, bộ chỉ thị bao gồm 9 microsatellite này phù hợp cho truy xuất phả hệ trên cá tra. Khả năng truy xuất cao này có tiềm năng thay thế đánh dấu từ PIT phục vụ chọn giống, nhằm làm giảm ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ các gia đình đến kích cỡ đánh dấu, từ đó tăng độ chính xác của chọn lọc. Các nghiên cứu cho thấy khi tăng số lượng các chỉ thị thì làm tăng khả năng truy xuất như trên cá trắm cỏ *Ctenopharyngodon idella* (khả năng truy xuất có thể đạt 99,6%), tôm Kuruma (khả năng truy xuất có thể đạt 92,0%). Vì vậy, cần phát triển thêm các bộ chỉ thị đa hình cao từ bộ gen cá tra kết hợp với các microsatellite trong nghiên cứu này nhằm tiếp tục nâng cao hiệu quả truy xuất phả hệ.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã sàng lọc một bộ chỉ thị gồm 9 microsatellite và thử nghiệm truy xuất phả hệ đàn cá tra chọn giống với tỷ lệ truy xuất cả bố và mẹ đúng trong tất cả các gia đình cao, đặc biệt trên gia đình có half-sib theo bố. Các chỉ thị phân tử trong nghiên cứu ổn định và có tính đa hình cao phù hợp với nghiên cứu truy xuất phả hệ trên cá tra. Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng truy xuất phả hệ bằng chỉ thị microsatellite nhằm thay thế phương pháp đánh dấu từ PIT truyền thống trong chọn giống là khả thi, đặc biệt nếu chúng ta tiếp tục sàng lọc và phát triển bổ sung thêm một số chỉ thị mới vào bộ chỉ thị hiện có thì khả năng truy xuất sẽ cao hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Chương trình VLIR-UOS South Initiatives, Vương quốc Bỉ (mã số SI-2019-01-26). Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Phòng Thí nghiệm Đa dạng Di truyền và Tiến hóa (Laboratory of Biodiversity and Evolutionary Genomics), Khoa Sinh học, Đại học KU Leuven (Vương quốc Bỉ) và Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II với những hỗ trợ về công nghệ và kỹ thuật cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] FAO (2014), *The State of The World Fisheries and Aquaculture*, <https://www.fao.org/policy-support/tools-and-publications/resources-details/en/c/416712/>, accessed 22 March 2021.
- [2] M. Vandeputte, P. Haffray (2014), "Parentage assignment with genomic markers: A major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals", *Frontier in Genetic*, 5, DOI: 10.3389/fgene.2014.00432.
- [3] A.T. Norris, D.G. Bradley, E.P. Cunningham (2000), "Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers", *Aquaculture*, 182(1-2), pp.73-83, DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00247-1.
- [4] M. Vandeputte, M.N. Rossignol, C. Pincent (2011), "From theory to practice: Empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding", *Aquaculture*, 314(1-4), pp.80-86, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.01.043.
- [5] A. Estoup, K. Gharbi, M. SanCristobal, et al. (1998), "Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(3), pp.715-725, DOI: 10.1139/f97-268.
- [6] N. Kong, Q. Li, H. Yu, et al. (2015), "Heritability estimates for growth-related traits in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a molecular pedigree", *Aquaculture Research*, 46(2), pp.499-508, DOI: 10.1111/are.12205.
- [7] J. Fu, Y. Shen, X. Xu, et al. (2013), "Multiplex microsatellite PCR sets for parentage assignment of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)", *Aquaculture International*, 21(6), pp.1195-1207, DOI: 10.1007/s10499-013-9623-z.

- [8] Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers (2019), *5-year Seafood Industry Report (2015-2019)*, 78pp (in Vietnamese).
- [9] N.V. Sang, G. Klemetsdal, J. Ødegård, et al. (2012), “Genetic parameters of economically important traits recorded at a given age in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)”, *Aquaculture*, **344-349**, pp.82-89, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.03.013.
- [10] D.K. Pham, J. Ødegård, V.S. Nguyen, et al. (2021), “Genetic analysis of resistance in Mekong striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to bacillary necrosis caused by *Edwardsiella ictaluri*”, *Journal of Fish Diseases*, **44(2)**, pp.201-210, DOI: 10.1111/jfd.13279.
- [11] F.A.M. Volckaert, B. Hellemans, L. Pouyaud (1999), “Nine polymorphic microsatellite markers in the SE Asian catfishes *Pangasius hypophthalmus* and *Clarias falcatus*”, *Animal Genetics*, **30(5)**, pp.383-384, DOI: 10.1046/j.1365-2052.1999.00526-2.x.
- [12] B.T.L. Ha, L.N.T. Trang, N.V. Sang (2017), “Testing to determine pedigree using microsatellite molecular markers on pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) breeding population”, *Agriculture & Rural Development*, **1**, pp.88-97 (in Vietnamese).
- [13] M.T. Nguyen, N.T.P. Le, T.L. Nguyen, et al. (2019), “Parentage assignment in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) based on microsatellite markers”, *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgar*, **71**, DOI: 10.46989/001c.20985.
- [14] O.T.P. Kim, P.T. Nguyen, E. Shoguchi, et al. (2018), “A draft genome of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, for comparative analysis of genes relevant to development and a resource for aquaculture improvement”, *BMC Genomics*, **19(1)**, DOI: 10.1186/s12864-018-5079-x.
- [15] N.V. Sang, N.M. Thanh, N.H. Loc, et al. (2020), “Primary development and characterization of novel microsatellites from genome of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) using data mining”, *Mekong River Fisheries Magazine*, **18**, pp.14-22 (in Vietnamese).
- [16] J. Gaaib, A.A. Assie (2011), “Simple salting - out method for genomic DNA extraction from whole blood”, *Tikrit Journal of Pure Science*, **16(2)**, pp.9-11.
- [17] T.C. Marshall, J. Slate, L.E.B. Kruuk, et al. (1998), “Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations”, *Molecular Ecology*, **7(5)**, pp.639-655, DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
- [18] G.H. Yue, J.H. Xia (2014), “Practical considerations of molecular parentage analysis in fish”, *Journal of The World Aquaculture Society*, **45(2)**, pp.89-103, DOI: 10.1111/jwas.12107.
- [19] A.G. Jones, C.M. Small, K.A. Paczolt, et al. (2010), “A practical guide to methods of parentage analysis”, *Molecular Ecology Resources*, **10(1)**, pp.6-30, DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x.
- [20] Z.S. Hogan, B.P. May (2002), “Twenty-seven new microsatellites for the migratory Asian catfish family *Pangasiidae*”, *Molecular Ecology Notes*, **2(1)**, pp.38-41, DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00139.x.
- [21] E.E. Dakin, J.C. Avise (2004), “Microsatellite null alleles in parentage analysis”, *Heredity*, **93**, pp.504-509, DOI: 10.1038/sj.hdy.6800545.
- [22] Q.T. Trinh, N.V. Bers, R. Crooijmans, et al. (2013), “A comparison of microsatellites and SNPs in parental assignment in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The power of exclusion”, *Aquaculture*, **388-391**, pp.14-23, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.004.
- [23] A.G. Fishback (1999), *Genetic and Environmental Influences on The Spawning Time and Progeny Growth of Hatchery Rainbow Trout*, University of Guelph, 118pp.
- [24] N.H. Ninh, L.T.H. Giang (2012), *Research to Determine The Genetics and Lineage of Pangasius (Pangasius hypophthalmus) using Microsatellite Markers*, Research Institute for Aquaculture No. 1, 10pp (in Vietnamese).
- [25] M. Vandeputte, S. Mauger, M.D. Nivet (2006), “An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion”, *Molecular Ecology Notes*, **6(1)**, pp.265-267, DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01167.x.
- [26] T. Gjerdem (2005), *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*, Springer, DOI: 10.1007/1-4020-3342-7.

Ngưỡng mật độ *Streptococcus agalactiae* gây bệnh Streptococcosis ở cá rô phi (*Oreochromis* sp.) nuôi ao nước ngọt

Trương Thị Mỹ Hạnh^{1*}, Nguyễn Thị Hạnh¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹,
Phạm Thị Yến¹, Lê Thị Mỹ¹, Võ Văn Nha², Đặng Thị Lựa¹

¹Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, phường Đình Bảng, TP Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III, 2 Đặng Tất, phường Vĩnh Hải, TP Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/10/2021; ngày chuyển phản biện 5/10/2021; ngày nhận phản biện 1/11/2021; ngày chấp nhận đăng 5/11/2021

Tóm tắt:

Cá rô phi (*Oreochromis* sp.) là một trong những loài thủy sản nuôi chủ lực ở Việt Nam. Trong môi trường nước ngọt, bệnh cá rô phi chịu ảnh hưởng lớn nhất là do *Streptococcus agalactiae*, song thông tin về ngưỡng mật độ *S. agalactiae* gây ra ở loài cá này còn nhiều hạn chế. Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định ngưỡng mật độ *S. agalactiae* trong nước gây bệnh Streptococcosis (bệnh xuất huyết) ở cá rô phi nuôi và một số yếu tố môi trường có liên quan như nhiệt độ, DO, pH, NH₃, NO₂-N. Kết quả cho thấy, cá rô phi bệnh do *S. agalactiae* có biểu hiện bệnh lý điển hình khi ngưỡng mật độ *S. agalactiae* trong gan cá và nước ao nuôi dao động lần lượt trong khoảng 1,1x10⁷-2,9x10⁸ cfu/g và 1,0x10³-1,2x10⁴ cfu/ml. Cá nhiễm *S. agalactiae* nhưng không có biểu hiện bệnh lý khi ngưỡng mật độ *S. agalactiae* trong gan cá và nước dao động trong khoảng 1,3x10³-9,6x10⁵ cfu/g và 2,3x10¹-8,3x10¹ cfu/ml. Mật độ *S. agalactiae* trong nước, nhiệt độ, NH₃ và pH ảnh hưởng đến mật độ *S. agalactiae* trong cá. Xác suất bệnh xảy ra lớn nhất là 98,3% khi mật độ *S. agalactiae* trong nước ≥10³ cfu/ml, tiếp đến 71,4% khi nhiệt độ ≥31°C, 25,9% khi NH₃>0,1 mg/l, 14,01% khi NO₂-N>0,05 mg/l và thấp nhất là 0,07% khi DO<4 mg/l.

Từ khóa: bệnh Streptococcosis, cá rô phi, mật độ *S. agalactiae*.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Mở đầu

Cá rô phi là loài cá có giá trị kinh tế, thương mại và dinh dưỡng quan trọng [1]. Sản lượng cá rô phi tăng tỷ lệ thuận theo thời gian trong khoảng 30 năm qua kể từ năm 1992. Năm 2019, sản lượng đạt 6,5 triệu tấn, tăng 4% so với năm 2018 và dự kiến tăng lên 7,3 triệu tấn vào năm 2030 [2, 3]. Cá rô phi là đối tượng nuôi thủy sản có nhiều ưu điểm như sinh trưởng nhanh, dễ nhân giống, có thể sinh trưởng và phát triển ở biên độ giao động môi trường lớn (nhiệt độ, độ mặn), dễ chuyển đổi thức ăn bổ sung [1], song còn hạn chế như dịch bệnh vẫn diễn ra trong quá trình nuôi, đặc biệt là bệnh Streptococcosis. Bệnh Streptococcosis xuất hiện phổ biến trong vụ nuôi với tỷ lệ tử vong cao, gây thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế, ảnh hưởng đến sản lượng cá rô phi trên toàn thế giới [4-6]. *S. agalactiae* là loài vi khuẩn phổ biến nhất gây bệnh Streptococcosis với tỷ lệ lưu hành chiếm 40-70% ở cá cá giai đoạn giống và thương phẩm [1], với tỷ lệ gây chết lên đến 90-100% [7, 8]. Biểu hiện chính bắt gặp cá nhiễm *S. agalactiae* là cá giảm ăn, bơi không định hướng, bơi vòng tròn, đục mắt, lồi mắt, giải phẫu nội tạng ghi nhận gan, lách sưng, bụng tích nhiều dịch lỏng [9, 10].

Bệnh xuất hiện ở cá khi có sự tương tác giữa động vật thủy sản, mầm bệnh (tác nhân) và môi trường sống (nước),

đồng thời mất cân bằng giữa 3 yếu tố này như cá yếu, giảm sức đề kháng, mật độ mầm bệnh gia tăng hay điều kiện môi trường bất lợi [11]. Một số yếu tố môi trường bất lợi có vai trò ý nghĩa gây bùng phát bệnh Streptococcosis ở cá như nhiệt độ, DO, NH₃, NO₂-N, H₂S, mật độ *Streptococcus* sp. [12, 13], độ kiềm, độ mặn [14]... Cá rô phi nhiễm bệnh do *S. agalactiae* gây ra thì điều kiện bắt buộc là sự hiện diện của *S. agalactiae* trong môi trường nước và sự xâm nhiễm của vi khuẩn này vào cơ thể cá. *S. agalactiae* khi có mặt trong môi trường nước sẽ nhanh chóng nhiễm lên vật chủ (cá) sống trong cùng môi trường và nhân tế bào lên ở da, đặc biệt ở cơ quan nội tạng với tỷ lệ cao (71,2%) [15]. *Streptococcus* sp có thể tồn tại trong thời gian dài trong nước, bùn ao, thậm chí ở cả các thiết bị/dụng cụ được sử dụng trong các hoạt động nuôi/sản xuất [7]. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định ngưỡng mật độ *S. agalactiae* trong nước gây cá rô phi nhiễm bệnh Streptococcosis và một số yếu tố môi trường có liên quan như nhiệt độ, DO, pH, NH₃, NO₂-N. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học có ý nghĩa giúp xác định thời điểm áp dụng giải pháp kỹ thuật để giảm thiểu mật độ *S. agalactiae* cũng như cải thiện chất lượng môi trường nhằm hạn chế bùng phát bệnh.

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

The density threshold of *Streptococcus agalactiae* causing Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in freshwater ponds

Thi My Hanh Truong^{1*}, Thi Hanh Nguyen¹,
Thi Minh Nguyet Nguyen¹, Thi Yen Pham¹,
Thi May Le¹, Van Nha Vo², Thi Lua Dang¹

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

²Research Institute for Aquaculture No III,
2 Dang Tat Street, Vinh Hai Ward, Nha Trang City, Khanh Hoa Province, Vietnam

Received 12 October 2021; revised 1 November 2021; accepted 5 November 2021

Abstract:

Tilapia (*Oreochromis* sp.) is one of the key aquaculture species in Vietnam. In freshwater environments, tilapia is most affected by *S. agalactiae*, but information on *S. agalactiae* density threshold causes disease in tilapia has been limited. The purpose of this study was to determine the *S. agalactiae* density threshold causing disease Streptococcosis on tilapia and some related environmental factors such as DO, temperature, pH, NH₃, NO₂-N. The results showed that *S. agalactiae* causes tilapia had typical pathological manifestations when the density of *S. agalactiae* in fish liver and pond water fluctuated in the range of 1.1x10⁷-2.9x10⁸ cfu/g and 1.0x10³-1.2x10⁴ cfu/ml, respectively. Fish infected with *S. agalactiae* showed no pathological symptoms when the *S. agalactiae* density in fish liver and water ranged from 1.3x10³-9.6x10⁵ cfu/g and 2.3x10¹-8.3x10¹ cfu/ml, respectively. The density of *S. agalactiae* in water, temperature, NH₃, and pH affected the density of *S. agalactiae* in fish. The highest probability of disease occurrence was 98.3% when the density of *S. agalactiae* in water was ≥10³ cfu/ml, followed by 71.4% when the temperature was ≥31°C, 25.9% when NH₃>0.1 mg/l, 14.01% in case NO₂-N>0.05 mg/l, and the lowest was 0.07% when DO<4 mg/l.

Keywords: Streptococcosis, *Streptococcus agalactiae* density, tilapia.

Classification number: 4.5

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 4/2021 đến tháng 9/2021 trên 108 mẫu cá thương phẩm và 108 mẫu nước ao nuôi cá rô phi nước ngọt (54 mẫu tại các ao cá không có biểu hiện bệnh lý và 54 mẫu tại các ao cá có biểu hiện bệnh lý) ở tỉnh Hải Dương. Mẫu được phân tích tại Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản miền Bắc, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I.

2.1. Phương pháp thu và bảo quản mẫu

Đối với mẫu nước: mẫu nước phân tích các chỉ tiêu NO₂-N, NH₃, mật độ *S. agalactiae* được thu trong khoảng thời gian 7-9 giờ sáng, chứa trong chai nhựa. Nước được thu tại 3 vị trí theo đường chéo của ao. Tất cả các mẫu đều được ghi chú cẩn thận và giữ lạnh (4-8°C) trong suốt quá trình vận chuyển đến khi phân tích. Yếu tố pH, DO, nhiệt độ được đo tại hiện trường bằng máy YSI Pro 1020.

Đối với mẫu cá: cá rô phi thu mẫu (gồm cá rô phi vằn, cá rô phi dòng Gift và cá rô phi Đường nghiệp) có biểu hiện bệnh điển hình được thu 3-5 mẫu trên mỗi ao và cá không có biểu hiện bệnh thu 1 mẫu trên mỗi ao, tất cả các mẫu cá được thu khi cá còn sống/yếu. Cá được bảo quản lạnh (4-8°C) trong suốt quá trình vận chuyển đến khi phân tích. Tổng số mẫu thu phân tích là 108 mẫu cá và 108 mẫu nước thu tại 58 hộ nuôi (mỗi hộ nuôi thu 1-3 ao tùy thuộc vào số lượng ao nuôi và số lượng ao có cá biểu hiện bệnh).

2.2. Phương pháp phân tích mẫu

Tại phòng thí nghiệm các thông số nêu trên được phân tích theo phương pháp chuẩn. Hàm lượng NH₃ phân tích theo SMEWW 4500-NH₃ F:2011. Phân tích NO₂-N theo phương pháp SMEWW 4500-NO₂ B 2011. Xác định cá rô phi nuôi nhiễm bệnh do *S. agalactiae* bằng nuôi cấy giám định loài bằng test API 20Strep. Định lượng mật độ *S. agalactiae* trong nước và gan cá rô phi theo phương pháp Buller (2004) với môi trường chọn lọc Chromogenic Strepto B.

2.3. Phương pháp phân tích số liệu

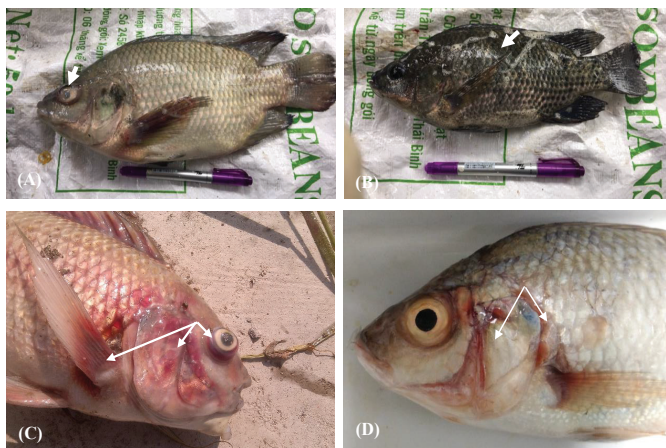
Sử dụng phần mềm SPSS 23 phân tích thống kê, tương quan (Pearson), hồi quy tuyến tính bội (Regression) và xác suất xảy ra cá bệnh với biến phụ thuộc là mật độ *S. agalactiae* trong nước, nhiệt độ, NO₂-N, NH₃, pH và DO, biến phụ thuộc là cá bệnh do *S. agalactiae*/mật độ *S. agalactiae* trong cá.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ngưỡng *S. agalactiae* gây bệnh Streptococcosis ở cá rô phi nuôi

Kết quả phân tích 54 mẫu cá rô phi nuôi ao nước ngọt có dấu hiệu bệnh cho thấy có 35 mẫu dương tính với *S.*

agalactiae, chiếm 64,8%. Mẫu cá có biểu hiện bệnh được ghi nhận bao gồm các dấu hiệu như giảm ăn, bỏ ăn, xuất huyết nắp mang, gốc vây, lồi mắt, đục mắt, thân cá màu sẫm/tối màu (hình 1), bơi không định hướng, gan thận sưng, ruột không có thức ăn. Ghi nhận biến đổi bệnh lý của bệnh trong nghiên cứu này trùng hợp với kết quả nghiên cứu bệnh lý *S. agalactiae* gây ra ở cá rô phi trong điều kiện nuôi thực địa [13, 16, 17]. Bên cạnh đó, có 19 mẫu có biểu hiện bệnh lý giảm ăn, bỏ ăn, lồi mắt, đục mắt song kết quả âm tính với *S. agalactiae*, đây cũng là dấu hiệu điển hình đối với cá rô phi nhiễm bệnh do TiLV gây ra [18, 19]. Tác nhân gây bệnh *S. agalactiae* và TiLV đều gây tổn thương điển hình liên quan đến mắt (đục mắt, lồi mắt), vì vậy chẩn đoán bệnh bằng mô tả dấu hiệu bệnh lý là chưa đủ cơ sở, cần tiến hành chẩn đoán bằng nuôi cấy, phân lập vi khuẩn. Điều này được minh chứng rõ ở kết quả nghiên cứu này khi phân tích 54 mẫu có biểu hiện bệnh lý song có đến 19 mẫu không do *S. agalactiae* gây ra. Ở mẫu cá dương tính với *S. agalactiae* bằng kỹ thuật nuôi cấy, nhuộm gram và thử sinh hóa API 20Strep (hình 2B và 2C), kết quả xác định mật độ *S. agalactiae* trong gan cá và nước ao nuôi cá dao động lần lượt trong khoảng $1,1 \times 10^7 - 2,9 \times 10^8$ cfu/g và $1,0 \times 10^3 - 1,2 \times 10^4$ cfu/ml (bảng 1, hình 2A). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Z.G.H. Pech và cs (2016) [1], H.A. Ahmed và cs (2005) [20] khi chỉ ra mật độ *Streptococcus* sp. trong một số cơ quan của cá rô phi bệnh như ở mang cá ($8,7 \pm 1,9 \times 10^5 - 2,1 \pm 0,9 \times 10^6$ cfu/g), đường ruột ($2,8 \pm 2,4 \times 10^7 - 1,0 \pm 1,6 \times 10^8$ cfu/g) và trong nước ($1,4 \pm 1,5 \times 10^3 - 8,6 \pm 2,7 \times 10^3$ cfu/ml). Mật độ *Streptococcus* sp. sẽ thay đổi tùy thuộc vào hoạt động trao đổi chất của cá và liên quan đến nhiệt độ môi trường nước [3, 20]. Đây cũng là cơ sở phù hợp với các nghiên cứu gây nhiễm *S. agalactiae* lên cá rô phi đã ghi nhận với nồng độ là $1,1 \times 10^7 - 1,5 \times 10^8$ cfu/cá, cá gây nhiễm có biểu hiện bệnh lý và chết sau 24-168 giờ, tỷ lệ chết tích lũy 67-90% sau 7 ngày [21, 22], trong khi đó, tỷ lệ cá chết không được ghi nhận khi tiêm ở nồng độ $10^4 - 10^5$ cfu/cá [22].



Hình 1. Biểu hiện bệnh lý cá bệnh (mũi tên). (A) Mắt cá đục; (B) Thân cá sẫm màu; (C) Lồi mắt, xuất huyết gốc vây, xuất huyết nắp mang; (D) Xuất huyết nắp mang.

Bảng 1. Mật độ *S. agalactiae* trong mẫu cá và nước nuôi.

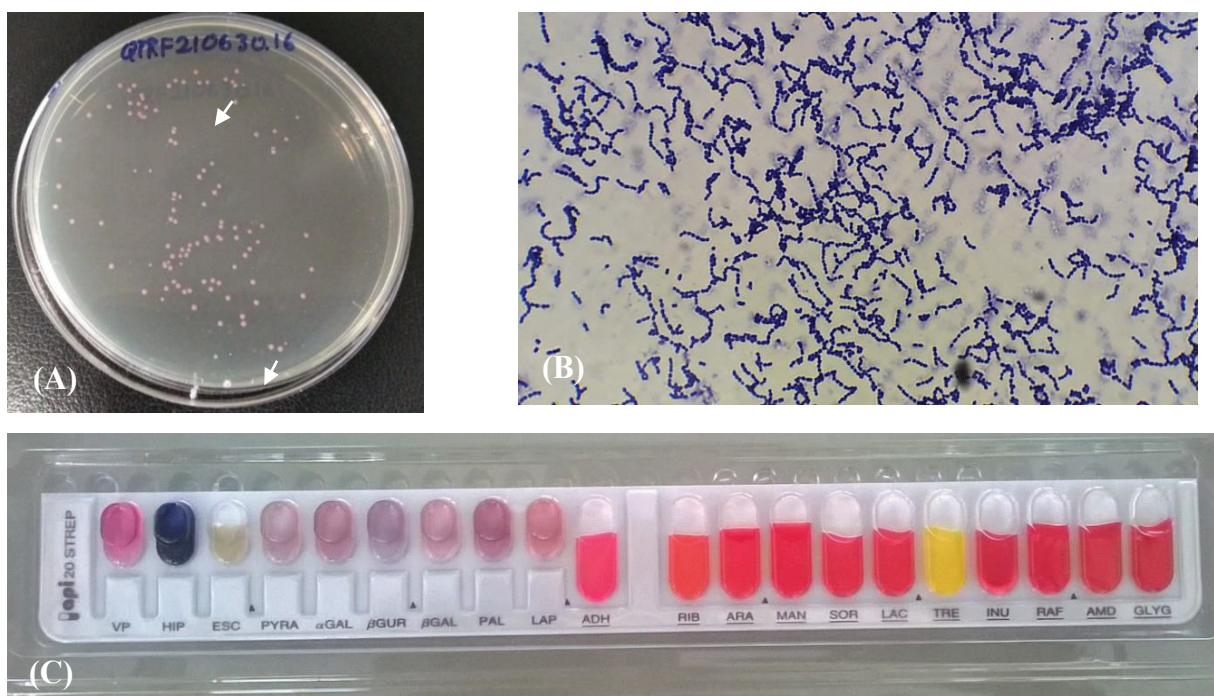
Loại mẫu	Số mẫu phân tích	<i>S. agalactiae</i> (mẫu nhiễm/ mẫu phân tích)	Mật độ <i>S. agalactiae</i> ^(*)					
			Trong gan cá (cfu/g)			Trong nước (cfu/ml)		
			Nhỏ nhất	Lớn nhất	Trung bình ⁽¹⁾	Nhỏ nhất	Lớn nhất	Trung bình ⁽¹⁾
Cá bệnh, nước nuôi cá ⁽²⁾	54 (cá) 54 (nước)	35/54 54/54	$1,1 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$	$10,3 \pm 1,8 \times 10^{(7a)}$	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4 \pm 433,3^{(a)}$
Cá không bệnh, nước nuôi cá ⁽³⁾	54 (cá) 54 (nước)	9/54 10/54	$1,3 \times 10^3$	$9,6 \times 10^5$	$15,8 \pm 9,2 \times 10^{(3b)}$	$2,3 \times 10^1$	$8,3 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1 \pm 7,3^{(b)}$

Ghi chú: ^(*): giá trị của mẫu có kết quả dương tính *S. agalactiae*; cfu (colony forming unit): đơn vị khuẩn lạc; ⁽¹⁾: giá trị trung bình $\pm$ Std (sai số chuẩn); ^{a, b}: trên cùng 1 cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê $p < 0,05$; ⁽²⁾: cá giảm ăn, bỏ ăn đồng thời kèm theo một trong số các dấu hiệu như xuất huyết nắp mang, gốc vây, lồi mắt, đục mắt, bơi không định hướng, thân cá sẫm màu. Giải phẫu: gan thận sưng, ruột không có thức ăn. Nước thu chính ao có cá biểu hiện bệnh; ⁽³⁾: cá không có dấu hiệu bất thường ngoài cơ thể cũng như giải phẫu nội tạng. Nước thu ở ao thu cá không có biểu hiện bệnh.

Kết quả định lượng vi khuẩn *S. agalactiae* đối với 54 mẫu cá và 54 mẫu nước thu tại các ao cá có biểu hiện bình thường bằng quan sát cảm quan cho thấy, có 9/54 mẫu cá và 10/54 mẫu nước nhiễm *S. agalactiae*, theo đó, mật độ *S. agalactiae* trong gan cá giao động từ $1,3 \times 10^3$ đến $9,6 \times 10^5$ cfu/g và mật độ *S. agalactiae* trong nước tương ứng ở ao nuôi cá có kết quả nhiễm *S. agalactiae* là $2,3 \times 10^1$ đến $8,3 \times 10^1$ cfu/ml. Mật độ *S. agalactiae* trong gan cá và trong nước ở lô cá không có biểu hiện bệnh có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) đối với mật độ *S. agalactiae* trong gan cá và nước ở lô cá có biểu hiện bệnh lý (bảng 1). Như vậy, cá nhiễm *S. agalactiae* và có mật độ *S. agalactiae* trong gan cá đạt đến $9,6 \times 10^5$ cfu/g chưa đủ gây ra các biểu hiện bệnh lý điển hình (giảm ăn, bỏ ăn, xuất huyết, lồi mắt...), tuy nhiên đây là điều kiện thuận lợi để gây ra hiện tượng mất cân bằng (mật độ mầm bệnh gia tăng hay sức đề kháng của cá suy giảm) trong thời gian ngắn tiếp theo. Kết quả này có ý nghĩa quan trọng, chỉ ra thời điểm cần có can thiệp về kỹ thuật nhằm giảm mật độ *S. agalactiae* trong nước, đồng thời nâng cao sức đề kháng của cá nuôi, hạn chế tối đa trường hợp cá bệnh và chết do bệnh.

3.2. Một số yếu tố môi trường tác động tới ngưỡng mật độ *S. agalactiae* trong cá rô phi nuôi

Cá biểu hiện bệnh do *S. agalactiae* gây ra phụ thuộc vào mật độ *S. agalactiae* trong gan cá, với mật độ $10^7 - 10^8$ cfu/g cá có biểu hiện bệnh và cá không có biểu hiện bệnh khi mật độ *S. agalactiae* trong gan cá $\leq 9,6 \times 10^5$ cfu/g (bảng 1). Vì vậy, nghiên cứu đưa ra giả thiết mô hình gồm có 7 biến (mật độ *S. agalactiae* trong gan cá, mật độ *S. agalactiae* trong nước, nhiệt độ nước, pH, $\text{NO}_2\text{-N}$, NH_3 và DO), trong đó, mật độ *S. agalactiae* trong gan cá là yếu tố phụ thuộc và 6 yếu tố còn lại là các yếu tố/ biến độc lập. Kết quả phân tích khảo



Hình 2. Vi khuẩn *S. agalactiae*. (A) Khuẩn lạc *S. agalactiae* trên môi trường chọn lọc (màu hồng cánh sen); (B) *S. agalactiae* bắt màu xanh tím khi nhuộm gram; (C) Các phản ứng sinh hóa sau 24 giờ (API 20Strep).

sát cho thấy, 6 biến độc lập có mức ảnh hưởng 60,3% đến mật độ *S. agalactiae* trong cá, còn lại 39,7% là do các biến ngoài mô hình. Điều đó có nghĩa, 6 yếu tố môi trường nuôi nêu trên trong mô hình có vai trò quan trọng ảnh hưởng đến *S. agalactiae* nhiễm và tăng sinh lên trong cá, gây cá bệnh. Điều này đúng với nguyên lý chung của bệnh ở động vật thủy sản, cụ thể vật nuôi bị bệnh khi có đồng thời 3 yếu tố xuất hiện, bao gồm tác nhân gây bệnh (*S. agalactiae*), tác động bất lợi của một hay một số yếu tố môi trường (mật độ *S. agalactiae* trong nước, nhiệt độ, pH, $\text{NO}_2\text{-N}$, NH_3 hay DO) và sự xuất hiện của vật nuôi/vật chủ (cá rô phi) trong môi trường nuôi [11, 19]. Hơn nữa, kết quả phân tích cho thấy, chỉ số $\text{DW}=1,482$ cho biết có sự tương quan thuận giữa các biến nêu trên trong mô hình (bảng 2). Bên cạnh đó, ở kết quả khảo sát cho thấy, giá trị $p=0,000<0,05$ (bảng 2), rõ ràng mô hình từ giả thiết hoàn toàn đảm bảo trong phân tích và đọc kết quả hồi quy đa biến. Kết quả phân tích hồi quy đa biến cho phép nghiên cứu xác định mức độ ảnh hưởng nhiều hay ít của từng yếu tố độc lập trong mô hình đến mật độ *S. agalactiae* trong cá.

Bảng 2. Khảo sát chung mối tương quan giữa mật độ *S. agalactiae* trong cá rô phi và một số yếu tố môi trường.

Mô hình	R^2	Durbin-Watson (DW)	F	P
1 ^(*)	0,603	1,482	21,705	0,000

(^{*}): mật độ *S. agalactiae* trong cá là biến phụ thuộc, nhiệt độ, pH, DO, NH_3 , $\text{NO}_2\text{-N}$, mật độ *S. agalactiae* trong nước là biến độc lập.

Phân tích tương quan giữa các yếu tố cụ thể trong mô hình cho thấy, mật độ *S. agalactiae* trong cá có mối tương quan chặt chẽ với mật độ *S. agalactiae* trong nước và nhiệt độ ($p=0,000<0,05$), tương quan với NH_3 và tương quan yếu với pH thông qua chỉ số p lần lượt đạt 0,012 và $0,047<0,05$ (bảng 3). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của N.A.A. Mohammad và cs (2015) [12] khi chỉ ra nhiệt độ nước, pH, NH_3 có mối tương quan đáng kể với sự hiện diện của *S. agalactiae* trong cá nuôi. Minh chứng rõ thêm cho tương quan giữa *S. agalactiae* trong cá với nhiệt độ được thể hiện trong các nghiên cứu khi nêu bệnh Streptococcosis ở cá rô phi còn được gọi là bệnh nước ấm, do bệnh xuất hiện phổ biến khi nhiệt độ nước trên 27°C [15]. Ở Việt Nam, các đợt dịch bệnh Streptococcosis ở cá rô phi đều có liên quan đến nhiệt độ nước nuôi $>30^\circ\text{C}$, với tỷ lệ chết $>80\%$ [12, 23].

Bên cạnh đó, xét về mối tương quan giữa các biến độc lập trong mô hình nhận thấy, mật độ *S. agalactiae* trong nước có tương quan với nhiệt độ, NH_3 và pH, mức độ tương quan với 3 yếu tố này tương tự như *S. agalactiae* trong cá (bảng 3). Nhiệt độ có mối tương quan mạnh với NH_3 và pH với $p=0,000<0,05$, NH_3 có tương quan với pH ($p=0,009$). Trong khi đó, DO và $\text{NO}_2\text{-N}$ không có mối tương quan với các yếu tố trong mô hình, bao gồm pH, $\text{NO}_2\text{-N}$, NH_3 , mật độ *S. agalactiae* trong cá và trong nước (bảng 3).

Bảng 3. Mối tương quan giữa các biến trong mô hình.

	Hệ số	Mật độ <i>S. agalactiae</i> trong nước	Nhiệt độ	NH ₃	pH	NO ₂ -N	DO
Mật độ <i>S. agalactiae</i> trong cá	r	0,427	0,624	0,240	0,192	0,122	0,026
	p	0,000	0,000	0,012	0,047	0,209	0,787
Mật độ <i>S. agalactiae</i> trong nước	r		0,524	0,256	0,170	0,069	0,067
	p		0,000	0,007	0,049	0,481	0,488
Nhiệt độ	r			0,334	0,477	0,147	0,114
	p			0,000	0,000	0,129	0,242
NH ₃	r				0,251	0,058	0,038
	p				0,009	0,554	0,693
pH	r					0,132	0,018
	p					0,172	0,854
NO ₂ -N	r						0,000
	p						0,996

Phân tích hồi quy tuyến tính của mô hình cho thấy chất lượng môi trường của 6 biến độc lập (mật độ *S. agalactiae* trong nước, NH₃, NO₂-N, nhiệt độ, pH và DO) đối với biến phụ thuộc (mật độ *S. agalactiae* trong cá). Cụ thể, mật độ *S. agalactiae* trong nước có ảnh hưởng nhiều nhất đến sự thay đổi của biến phụ thuộc (*S. agalactiae* trong cá) với chỉ số Beta đạt 0,386, tiếp đến là yếu tố nhiệt độ, NH₃ và pH với chỉ số Beta lần lượt tương ứng 0,299, 0,195 và 0,146, trong khi đó NO₂-N và DO không ảnh hưởng đến mật độ *S. agalactiae* trong cá với giá trị Beta=0,021-0,105 và p>0,05 (bảng 4). Hơn nữa, giá trị VIF<2 cho thấy không có hiện tượng đa cộng tuyến trong mô hình.

Bảng 4. Kết quả phân tích hồi quy tuyến tính bội giữa nhiệt độ, pH, NO₂-N, NH₃, mật độ *S. agalactiae* trong nước và mật độ *S. agalactiae* trong cá.

Thông số	Beta chuẩn hóa	p	Thống kê cộng tuyến	
			Dung sai	VIF
Mật độ <i>S. agalactiae</i> trong nước	0,386	0,000	0,671	1,491
Nhiệt độ	0,299	0,001	0,508	1,969
NH ₃	0,195	0,006	0,848	1,179
pH	0,146	0,048	0,703	1,423
NO ₂ -N	0,105	0,111	0,958	1,044
DO	0,021	0,749	0,980	1,020

Từ mô hình hồi quy tuyến tính, tiếp tục phân tích dự đoán xác suất bệnh ở cá rô phi do *S. agalactiae* xảy ra trong một

số điều kiện bất lợi (bảng 5). Kết quả chỉ rõ, xác suất bệnh xảy ra lớn nhất là 98,3% khi mật độ *S. agalactiae* trong nước $\geq 10^3$ cfu/ml, tiếp đến 71,4% khi nhiệt độ $\geq 31^\circ\text{C}$, 25,9% khi NH₃>0,1 mg/l, 14,01% đối với trường hợp NO₂-N>0,05 mg/l và thấp nhất là 0,07% khi DO<4 mg/l. Kết quả nghiên cứu này trùng hợp với nghiên cứu của T.M.H. Truong và cs (2021) [13] khi nêu mật độ *Streptococcus* sp. ($\geq 10^3$ cfu/ml), NH₃(>0,1 mg/l), nhiệt độ (>30°C), pH (>8,5) và NO₂-N (>0,25 mg/l) là yếu tố nguy cơ gây cá bệnh Streptococcosis.

Bảng 5. Xác suất cá bệnh Streptococcosis với trường hợp môi trường khác nhau.

TT	Thông số	Đơn vị	Giá trị (khoảng giá trị)	Xác suất xảy ra cá bệnh Streptococcosis (%)
1	DO	mg/l	<4	0,07
2	NO ₂ -N	mg/l	>0,05 (0,095-2,7)	9,43
3	pH		>8,5	14,01
4	NH ₃	mg/l	>0,1 (0,15-0,4)	25,9
5	Nhiệt độ	°C	≥ 31 (31-33,8)	71,4
6	<i>S. agalactiae</i> trong nước	cfu/ml	$\geq 10^3$	98,3

4. Kết luận

Cá rô phi bệnh do *S. agalactiae* có biểu hiện bệnh lý điển hình khi ngưỡng mật độ *S. agalactiae* trong gan cá và trong nước ao nuôi giao động lần lượt trong khoảng $1,1 \times 10^7$ - $2,9 \times 10^8$ cfu/g và $1,0 \times 10^3$ - $1,2 \times 10^4$ cfu/ml. Cá nhiễm *S. agalactiae* nhưng không có biểu hiện bệnh lý khi ngưỡng mật độ *S. agalactiae* trong gan cá và trong nước giao động lần lượt từ $1,3 \times 10^3$ - $9,6 \times 10^5$ cfu/g và $2,3 \times 10^1$ - $8,3 \times 10^1$ cfu/ml.

Mật độ *S. agalactiae* trong nước, nhiệt độ, NH₃ và pH ảnh hưởng đến mật độ *S. agalactiae* trong cá. Xác suất bệnh xảy ra lớn nhất là 98,3% khi mật độ *S. agalactiae* trong nước $\geq 10^3$ cfu/ml, tiếp đến 71,4% khi nhiệt độ $\geq 31^\circ\text{C}$, 25,9% khi NH₃>0,1 mg/l, 14,01% đối với trường hợp NO₂-N>0,05 mg/l và thấp nhất là 0,07% khi DO<4 mg/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Z.G.H. Pech, C.L. Sánchez, M.R.C. Chávez, et al. (2016), "Current state of Bacteria pathogenicity and their relationship with host and environment in *Tilapia Oreochromis niloticus*", *Aquac. Res. Development.*, **7(5)**, DOI: 10.4172/2155-9546.1000428.
- [2] Global Seafood Alliance (2019), "GOAL 2019: Global finfish production review and forecast", <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/goal-2019-global-fish-production-review-and-forecast/>, accessed 12 April 2021.
- [3] World Bank (2013), *Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture*, <https://openknowledge.worldbank.org/entities/publication/4bc2ac6a-28ba-5c32-9622-1844081580c1>, accessed 12 April 2021.

- [4] W. Yang, A. Li (2009), "Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*", *Aquaculture*, **294**(1), pp.14-17, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.05.018.
- [5] C.A. Shoemaker, P.H. Klesius (1997), "Streptococcal disease problem and control: A review", *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*.
- [6] J.J. Evans, P.H. Klesius, C.A. Shoemaker (2006), "An overview of Streptococcus in warmwater fish", *Aquatic Health International Journal*, **7**, pp.10-14.
- [7] G.F. Mian, D.T. Godoy, C.A.G. Leal, et al. (2009), "Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia", *Vet. Microbiol.*, **136**(1-2), pp.180-183, DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.10.016.
- [8] M.G.B. Reantaso, R.P. Subasinghe, J.R. Arthur, et al. (2005), "Disease and health management in Asian aquaculture", *Vet. Parasitol.*, **132**(3-4), pp.249-272, DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.07.005.
- [9] L.G.P. Giordano, E.E. Müller, J.C.D. Freitas, et al. (2010), "Evaluation of the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**(1), pp.87-92, DOI: 10.1590/S1516-89132010000100011.
- [10] A.F. Abuseliana, H.H.M. Daud, S.A. Aziz, et al. (2011), "Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish in Selangor to Juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.)", *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **10**(7), pp.914-919, DOI: 10.3923/javaa.2011.914.919.
- [11] S.F. Snieszko (1975), "History and present status of fish diseases", *J. Wildl. Dis.*, **11**(4), pp.446-459, DOI: 10.7589/0090-3558-11.4.446.
- [12] N.A.A. Mohammad, M.Z. Saad, A.S. Zahrah, et al. (2015), "Water quality influences the presence of *Streptococcus agalactiae* in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis mossambicus*", *Aquaculture Research*, **46**(2), pp.313-323, DOI: 10.1111/are.12180.
- [13] T.M.H. Truong, T.V. Phan, T.M. Le, et al. (2021), "Risk factors related to *Streptococcus* disease of tilapia in freshwater aquaculture", *The Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **63**(7), pp.42-47, DOI: 10.31276/VJST.63(7).42-47 (in Vietnamese).
- [14] M.A.A. Amal, M.Z. Saad (2011), "*Streptococcus* in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review", *Trop. Agric. Sci.*, **32**(2), pp.195-206.
- [15] E. Hernandez, J. Figueroa, C. Iregui (2009), "Streptococcosis on a red tilapia (*Oreochromis* sp.) farm: A case study", *J. Fish Dis.*, **32**(3), pp.247-252, DOI: 10.1111/j.1365-2761.2008.00981.x.
- [16] Amrullah, I. Baga, A.A. Jaya, et al. (2018), "*Streptococcus agalactiae* whole cell bacteria toxin protein in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*", *AACL Bioflux*, **11**(2), pp.460-468.
- [17] H. Anshary, R.A. Kurniawan, S. Sriwulan, et al. (2014), "Isolation and molecular identification of the etiological agents of Streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in lake Sentani, Papua, Indonesia", *Springerplus*, **3**, DOI: 10.1186/2193-1801-3-627.
- [18] M. Eyngor, R. Zamostiano, J.E.K. Tsosack, et al. (2014), "Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia", *Journal of Clinical Microbiology*, **52**(12), pp.4137-4146, DOI: 10.1128/JCM.00827-14.
- [19] World Organisation for Animal Health (2018), "Tilapia lake virus (tlv) - A novel orthomyxo-like virus", https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/A_TiLV_disease_card.pdf, 3pp.
- [20] H.A. Ahmed, N. Uddin (2005), "Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture in brackish water in Saudi Arabia", *Aquaculture*, **250**(3-4), pp.566-572, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.01.026.
- [21] J.J. Evans, P.H. Klesius, P.M. Gilbert, et al. (2002), "Characterization of b-hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri*, in Kuwait", *Journal of Fish Diseases*, **25**(9), pp.505-513, DOI: 10.1046/j.1365-2761.2002.00392.x.
- [22] T.T.M. Hanh, N.T. Hanh, N.H. Nghia, et al. (2019), "Some main characteristics of *Streptococcus agalactiae* cause disease on tilapia (*Oreochromis* sp.) in brackish water environment", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **12**, pp.73-79 (in Vietnamese).

Sàng lọc và tuyển chọn một số dòng lúa chỉnh sửa gen *GS3* bằng CRISPR/Cas9

Nguyễn Tiến Dũng^{1*}, Trương Thanh Tùng¹, Đào Minh Lệ¹, Nguyễn Đức Huy¹, Lê Văn Hiền¹, Bùi Tri Thức¹, Nguyễn Xuân Vũ¹, Ngô Xuân Bình^{1,2}, Cao Lệ Quyên³

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

²Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Di truyền Nông nghiệp, Phạm Văn Đồng, phường Cổ Nhuế 1, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 23/8/2021; ngày chuyển phản biện 26/8/2021; ngày nhận phản biện 17/9/2021; ngày chấp nhận đăng 23/9/2021

Tóm tắt:

Kết quả sàng lọc 41 dòng lúa T₀ chỉnh sửa gen *GS3* ở giống Bắc Thơm 7 bằng PCR thu được 38 dòng mang đoạn gen mã hóa protein Cas9. Phân tích đột biến, xác định được dòng D1 và D25 mất 2 nucleotides T, C ở vị trí 127 và 128 so với trình tự ban đầu. Các dòng đột biến có kích thước hạt dao động đáng kể (dài 0,68-0,97 cm, rộng 0,21-0,27 cm), trong đó 15 dòng có kích thước hạt lớn hơn (0,86-0,97 cm) và 4 dòng có kích thước nhỏ hơn so với đối chứng. Khối lượng 1.000 hạt của các dòng dao động từ 13,6 đến 22,6 g. Trong đó, 10 dòng có khối lượng 1.000 hạt cao hơn (19,22-22,6 g) so với đối chứng (17,9 g). Kết quả này bước đầu cho thấy, đột biến gen *GS3* đã làm tăng kích thước hạt ở giống lúa Bắc Thơm 7. Tuy nhiên, cần có thêm các phân tích chức năng đột biến ở các dòng khác nhau cũng như đánh giá các đặc điểm nông sinh học khác của các dòng lúa có triển vọng trên.

Từ khóa: Bắc Thơm 7, chỉnh sửa gen, CRISPR/Cas9, đột biến, gen *GS3*.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Lúa là cây trồng chủ lực cung cấp nguồn lương thực chính cho nhu cầu trong nước và xuất khẩu. Vì vậy, công tác chọn tạo giống lúa luôn được các nhà khoa học quan tâm và đã đạt được những thành tựu đáng kể, giúp đưa Việt Nam trở thành một trong những nước xuất khẩu gạo hàng đầu thế giới. Tuy nhiên, nhiều nhà khoa học cho rằng, sản xuất lúa gạo ở nước ta chưa thực sự tương xứng với tiềm năng và thường gặp phải những khó khăn như: thiếu giống tốt có năng suất, chất lượng cao, ổn định và có khả năng chống chịu với điều kiện ngoại cảnh...

Chọn tạo giống lúa theo định hướng ở nước ta đã được chú trọng hơn trong thời gian gần đây. Tuy nhiên, các phương pháp chủ yếu vẫn thông qua lai tạo truyền thống, xử lý đột biến, chọn lọc và tuyển chọn các dòng nhập nội, đồng thời mất nhiều thời gian và chi phí để tạo ra giống mới. Đến nay, một số kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã được ứng dụng trong chọn tạo giống lúa như chỉ thị phân tử DNA, MAS... [1, 2]. Mặc dù, các phương pháp này đã phần nào giúp nâng cao hiệu quả chọn tạo giống lúa nhưng vẫn còn những hạn chế nhất định.

Những năm gần đây, công nghệ chỉnh sửa hệ gen CRISPR với sự tham gia của enzyme Cas9 đã cho thấy hiệu quả tốt trong chọn tạo giống cây trồng. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh hệ thống CRISPR có thể tạo ra các đột biến đích di truyền qua các thế hệ. Ưu điểm nổi bật của công

nghệ này là tạo ra các đột biến gen đích một cách chính xác mà không cần sự có mặt của gen ngoài, vì thế có tính an toàn sinh học cao hơn các cây trồng chuyển gen [3]. Kỹ thuật này được đánh giá là hệ thống chỉnh sửa hệ gen đơn giản, chính xác và hiệu quả nhất tính tới thời điểm hiện tại, là bước tiến mới trong chọn tạo giống lúa ở nhiều nước trên thế giới [4].

Ở lúa, năng suất là tính trạng do nhiều gen chi phối và được xác định bởi các yếu tố như số bông/cây, số hạt/bông, tỷ lệ hạt chắc/bông và khối lượng 1.000 hạt [5]. Cải thiện tính trạng năng suất bằng cách can thiệp trực tiếp vào các gen liên quan là cách tiếp cận mang lại hiệu quả cao. *GS3* là gen trội nằm trên nhiễm sắc thể số 3, mã hóa cho protein xuyên màng gồm 4 vùng: kiểm soát kích thước (OSR), xuyên màng, thụ thể hoại tử khối u giàu cysteine (TNFR/NGFR) và VWFC kết thúc [6]. Gen *GS3* có vai trò kiểm soát kích thước hạt, khi gen này bị đột biến mất chức năng sẽ làm cho hạt gạo dài hơn ở giống lúa Minghui63 [7]. M. Li và cs (2016) [8] gây đột biến độc lập 4 gen kiểm soát số lượng hạt/bông (*Gn1a*), cấu trúc bông (*DEP1*), kích thước hạt (*GS3*) và cấu trúc cây (*IPA1*) bằng kỹ thuật CRISPR/Cas9 đã thu được các dòng đột biến có số hạt, chiều dài bông tăng và kích thước hạt lớn hơn so với đối chứng. Tương tự, R. Xu và cs (2016) [9] gây đột biến đồng thời cả 3 gen liên quan đến khối lượng hạt (*GW2*, *GW5*, *TGW6*) đã làm tăng trọng lượng hạt lên 29,3%. Các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, gây đột biến gen *GS3* có khả năng làm tăng năng suất hiệu quả ở lúa [10, 11].

*Tác giả liên hệ Email: nguyentientung@tuaf.edu.vn

Screening and detecting *GS3* mutant-rice lines generated by CRISPR/Cas9 technology

Tien Dung Nguyen^{1*}, Thanh Tung Truong¹,
Minh Le Dao¹, Duc Huy Nguyen¹,
Van Hien La¹, Tri Thuc Bui¹, Xuan Vu Nguyen¹,
Xuan Binh Ngo^{1,2}, Le Quyen Cao³

¹Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry,
Quyết Thắng Commune, Thái Nguyên City, Thái Nguyên Province, Vietnam

²Ministry of Science and Technology (MOST),
113 Trần Duy Hưng Street, Trung Hòa Ward, Cầu Giấy District, Hanoi, Vietnam

³Agricultural Genetics Institute, Phạm Văn Đồng Street,
Cố Nhuệ 1 Ward, Bắc Từ Liêm District, Hanoi, Vietnam

Received 23 August 2021; revised 17 September 2021; accepted 23 September 2021

Abstract:

Screening 41 *GS3* putative-edited T₀ rice lines of Bac Thom 7 cultivar by PCR, obtained 38 lines carrying the gene encoding Cas9 protein. Sequencing analysis identified two lines D1 and D25, having two nucleotides T, C deleted at positions 127 and 128 as compared to the original sequence. The target mutant lines expressed a significant variation in grain size, from 0.68 to 0.97 cm in length and 0.21 to 0.27 cm in width, of which 15 lines exhibited their larger grain size (from 0.86 to 0.97 cm), and 4 lines were smaller than the control. The 1,000-grain weight ranged from 13.6 to 22.6 g. In which, ten lines showed a higher 1,000-grain weight of 19.22-22.6 g than the control of 17.9 g. This indicated that *GS3* gene mutation has increased grain size in Bac Thom 7 cultivar. However, there is still a need to further analyse the function of mutant lines as well as evaluate other agro-biological characteristics of these promising rice lines.

Keywords: Bac Thom 7, CRISPR/Cas9, gene editing, *GS3* gene, mutation.

Classification number: 4.6

Ở Việt Nam, một số nhà khoa học đã tiếp cận và ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 ở một số đối tượng cây trồng như lúa, đậu tương [12, 13]. Trong khuôn khổ hợp tác nghiên cứu với Đại học Quốc gia Kyungpook Hàn Quốc, chúng tôi đã ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 để gây đột biến gen *GS3* liên quan đến kích thước hạt và đã tạo ra được các dòng lúa chỉnh sửa gen [13]. Bài báo trình bày kết quả sàng lọc và tuyển chọn các dòng đột biến gen *GS3* có triển vọng nhằm làm vật liệu cho công tác tạo giống lúa năng suất cao phục vụ sản xuất.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

41 dòng lúa thế hệ T₀ chỉnh sửa gen *GS3* từ giống Bắc Thom 7. Các dòng lúa được trồng riêng rẽ thành từng chậu có kích thước 40x32 cm. Sử dụng đất phù sa phối trộn với 1 kg phân chuồng + 100 g NPK (5:10:3) cho từng chậu trước khi trồng. Cây được trồng trong điều kiện nhà lưới với các chế độ chăm sóc như nhau.

Các hóa chất: CTAB, chlorophyll, isoamyl, isopropanol của Hãng Merck (www.sigmaaldrich.com). Hóa chất PCR được cung cấp bởi Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (www.phusabiochem.com).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số: ADN tổng số được tách từ lá cây lúa chuyển gen theo phương pháp CTAB của Xu và cs (2005) [14] với một số thay đổi. 100 mg mẫu lá non được nghiền thành bột mịn trong nitor lỏng. Bổ sung 700 µl đệm CTAB mỗi ống, lắc đều trong 15 giây rồi ủ ở 65°C trong 30 phút. Ống được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút và thu 600 µl dịch pha trên. Bổ sung 600 µl dung dịch chloroform:isoamylalcohol (tỷ lệ 24:1) vào mỗi ống, lắc đều và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Thu 500 µl dịch, bổ sung isopropanol vào ống theo tỷ lệ 1:1. Tiến hành ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút để thu tủa DNA. Tủa DNA được rửa trong 500 µl ethanol 70% và được làm khô ở nhiệt độ phòng. DNA tinh sạch được hòa tan bằng 50 µl TE để sử dụng cho nghiên cứu.

PCR kiểm tra sự có mặt cấu trúc biểu hiện gen chuyển: để kiểm tra sự tồn tại của cấu trúc biểu hiện gen chuyển trong các dòng lúa, tiến hành PCR nhân bản đoạn gen mã hóa protein Cas9 bằng cặp mồi pUbiCas9-For/pUbiCas9-Rev (bảng 1). Phản ứng PCR được thực hiện trong 20 µl với chu trình nhiệt biến tính 1 ở 95°C, 2 phút; biến tính 2 ở 94°C, 30 giây; gắn mồi 55°C, 30 giây; kéo dài 72°C, 30 giây; kéo dài 72°C, 5 phút; kết thúc 10°C. Sản phẩm được khuếch đại trong 30 chu kỳ. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Bảng 1. Môi sử dụng cho PCR kiểm tra dòng lúa chỉnh sửa gen.

Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Kích thước sản phẩm
pUbi-Cas9-Rev	GACCATGTCTAACTGTTTC	355 bp
pUbi-Cas9-For	CTTTTCTCTTAGGTTTAC	

Đánh giá đặc điểm hình thái hạt:

Kích thước hạt: chiều dài và chiều rộng của hạt được đo bằng phần mềm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Đo ngẫu nhiên 50 hạt/dòng. Đo 3 mẫu để tổng hợp số liệu trung bình.

Khối lượng 1.000 hạt: cân khối lượng của 1.000 hạt chắc bằng cân điện tử (lẻ đến 4 số). Cân 3 lần lặp lại và lấy số liệu trung bình.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Excel và SAS 4.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Sàng lọc cây chuyển gen bằng PCR

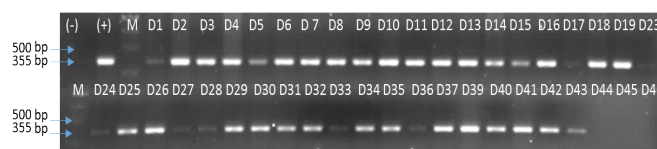
Các dòng lúa chuyển gen T_0 được sàng lọc bằng PCR dựa trên sự có mặt của gen mã hóa protein Cas9. Theo thiết kế cặp môi pUbiCas9-For/pUbiCas9-Rev sẽ khuếch đại đoạn gen Cas9 có kích thước 355 bp.

Kết quả điện di sản phẩm PCR của 41 dòng lúa thu được 38 dòng cho 1 băng đặc hiệu với kích thước khoảng 355 bp, đúng với dự đoán theo lý thuyết. 3 dòng không xuất hiện băng tương ứng với kích thước gen Cas9 gồm D44, D45 và D46 (bảng 2, hình 1). Điều đó chứng tỏ rằng các dòng này không phải dòng chuyển gen. Các dòng dương tính với gen Cas9 được tiếp tục theo dõi và đánh giá.

Bảng 2. Kết quả phân tích các dòng lúa chỉnh sửa gen bằng PCR gen Cas9.

Dòng	Cas9	Dòng	Cas9	Dòng	Cas9	Dòng	Cas9	Dòng	Cas9
D1	+	D10	+	D18	+	D30	+	D39	+
D2	+	D11	+	D19	+	D31	+	D40	+
D3	+	D12	+	D23	+	D32	+	D41	+
D4	+	D13	+	D24	+	D33	+	D42	+
D5	+	D14	+	D25	+	D34	+	D43	+
D6	+	D15	+	D26	+	D35	+	D44	-
D7	+	D16	+	D27	+	D36	+	D45	-
D8	+	D17	+	D28	+	D37	+	D46	-
D9	+								

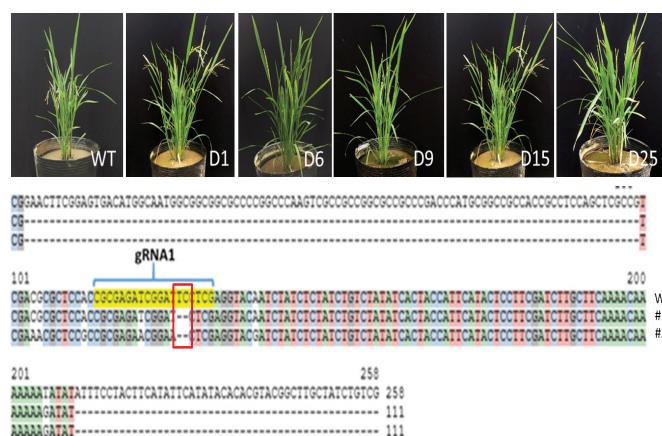
Ghi chú: Cas9: gen mã hóa protein Cas9; +: dương tính; -: âm tính.



Hình 1. Kết quả sàng lọc các dòng lúa chỉnh sửa gen bằng PCR. Marker: 1 kb (M); (-): đối chứng âm; (+): đối chứng dương; D1-D45: các dòng lúa chuyển gen.

3.2. Xác định trình tự đột biến

Để xác định trình tự đột biến gen *GS3* bởi cấu trúc vector cas9, chúng tôi tiến hành giải trình tự vùng gen mục tiêu đối với 5 dòng lúa có kết quả dương tính với gen mã hóa Cas9, gồm D1, D6, D9, D15 và D25. Kết quả xác định được 2 dòng D1 và D25 bị đột biến mất 2 nucleotides T, C ở vị trí 127 và 128 trên nhiễm sắc thể số 3 so với trình tự gốc ban đầu (WT, hình 2). Kết quả này cho thấy, cấu trúc vector Cas9 đã gây đột biến vùng gen mục tiêu *GS3* như thiết kế.



Hình 2. Cây chỉnh sửa gen và trình tự GS3 chỉnh sửa dòng D1 và D25. Trình tự gen mục tiêu (màu vàng) đã bị mất 2 nucleotides T, C ở vị trí 127 và 128 ở dòng D1 và D25 so với trình tự ban đầu (WT).

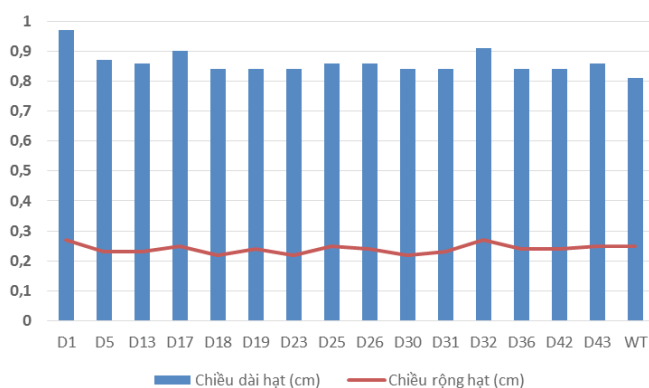
3.3. Kích thước hạt của các dòng lúa đột biến

Kết quả đo đếm ở các dòng chỉnh sửa gen cho thấy, chiều dài hạt dao động từ 0,68 đến 0,97 cm (trung bình 0,81 cm), chiều rộng từ 0,21 đến 0,27 cm (trung bình 0,24 cm), tỷ lệ dài/rộng đạt 3,43 (bảng 3, hình 3). Nhìn chung, các dòng chỉnh sửa gen chủ yếu biến động về chiều dài hạt. Trong số 38 dòng, chúng tôi thu được 15 dòng có chiều dài lớn hơn so với đối chứng, dao động từ 0,86 đến 0,97 cm, 4 dòng có hạt ngắn hơn gồm D9-11 và D41, dao động từ 0,68 đến 0,75 cm (bảng 3, hình 3). Khối lượng 1.000 hạt cũng có sự biến động, trong đó 10 dòng có khối lượng 1.000 hạt từ 19,22-22,6 g cao hơn so với đối chứng 17,9 g, các dòng còn lại có khối lượng 1.000 hạt tương đương hoặc thấp hơn so với đối chứng (bảng 3, hình 4A).

Bảng 3. Kích thước hạt của các dòng lúa chỉnh sửa gen.

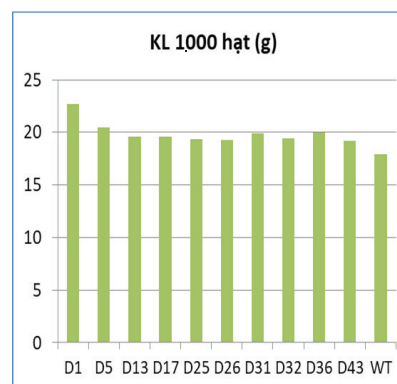
Dòng	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)	Dài/ rộng	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Dòng	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)	Dài/ rộng	Khối lượng 1.000 hạt (g)
D1	0,97*	0,27 ^{ns}	3,59	22,66*	D27	0,79 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,43	15,06*
D2	0,81 ^{ns}	0,25 ^{ns}	3,24	17,24 ^{ns}	D28	0,79 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,43	15,39*
D3	0,79 ^{ns}	0,22*	3,59	16,4*	D30	0,84*	0,22*	3,77	15,46*
D4	0,77 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,35	16,4*	D31	0,84*	0,23 ^{ns}	3,65	19,91*
D5	0,87*	0,23*	3,61	20,5*	D32	0,90*	0,27 ^{ns}	3,37	19,42*
D6	0,77 ^{ns}	0,22*	3,5	16,41*	D33	0,77 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,35	14,46*
D7	0,78 ^{ns}	0,22*	3,55	16,18*	D34	0,81 ^{ns}	0,24 ^{ns}	3,38	14,68*
D8	0,79 ^{ns}	0,22*	3,59	14,55*	D35	0,81 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,39	14,58*
D9	0,75*	0,23*	3,26	16,18*	D36	0,84*	0,24 ^{ns}	3,5	19,99*
D10	0,68*	0,23 ^{ns}	2,96	15,22*	D37	0,81 ^{ns}	0,25 ^{ns}	3,24	18,78 ^{ns}
D11	0,73*	0,25 ^{ns}	2,92	14,0*	D39	0,80 ^{ns}	0,24 ^{ns}	3,33	15,07*
D13	0,86*	0,23 ^{ns}	3,74	19,62*	D40	0,81 ^{ns}	0,26 ^{ns}	3,12	15,04*
D14	0,79 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,43	17,8 ^{ns}	D41	0,75*	0,26 ^{ns}	2,88	17,68 ^{ns}
D15	0,79 ^{ns}	0,22*	3,59	15,97*	D42	0,84*	0,24 ^{ns}	3,46	17,19 ^{ns}
D16	0,80 ^{ns}	0,21*	3,81	14,82*	D43	0,86*	0,25 ^{ns}	3,32	19,22*
D17	0,90*	0,25 ^{ns}	3,60	19,62*	D44	0,80 ^{ns}	0,23 ^{ns}	3,48	14,72*
D18	0,84*	0,22*	3,73	15,78*	Mean	0,81	0,24	3,43	16,03
D19	0,84*	0,24 ^{ns}	3,42	15,07*	Max	0,97	0,27	3,81	22,66
D23	0,84*	0,22*	3,77	13,80*	Min	0,68	0,21	2,88	13,6
D24	0,74*	0,25 ^{ns}	2,96	13,60*	WT	0,81	0,25	3,24	17,9
D25	0,86*	0,25 ^{ns}	3,44	19,36*	CV (%)	2,52	2,89		5,72
D26	0,86*	0,24 ^{ns}	3,58	19,30*	LSD ₀₁	0,036	0,023		1,13

Ghi chú: *: sự sai khác có ý nghĩa; ^{ns}: sai khác không có ý nghĩa.

**Hình 3. Kích thước hạt của một số dòng lúa chỉnh sửa gen GS3.**

Năng suất lúa phụ thuộc vào nhiều yếu tố như chế độ dinh dưỡng, điều kiện sinh thái và bản chất di truyền (giống). *GS3* là một trong những gen kiểm soát chất kích thước hạt được C. Fan và cs báo cáo năm 2006 [6]. Khi gen bị mất chức năng sẽ làm cho kích thước của hạt thay đổi, hạt dài ra hoặc ngắn hơn tùy theo vị trí bị đột biến vùng chức năng kiểm soát kích thước cơ quan (OSR) hay vùng kết thúc

(A)



(B)

**Hình 4. Hình thái hạt của một số dòng lúa chỉnh sửa gen GS3. Khối lượng 1.000 hạt (A) và hình thái hạt (B) của một số dòng lúa chỉnh sửa gen GS3 so với đối chứng (WT).**

(C-terminal region) tương ứng [7]. M. Li và cs (2016) [8] gây đột biến gen *GS3* ở giống Zhonghua 11 thu được các cây đột biến có kích thước hạt lớn hơn (8 mm) so với đối chứng (6,4 mm) khi gen *GS3* bị mất 4 đến 5 nucleotides. Khối lượng hạt cũng tăng lên 31 mg so với cây đối chứng 25,7 mg. Tương tự, giống lúa Nipponbare khi bị đột biến đồng thời 2 gen *GS3* và *GL3.1* có hạt dài hơn và hàm lượng chalkiness cao hơn so với cây đối chứng [10]. Giống TP309 có chiều dài và khối lượng 1.000 hạt tăng 31,39 và 27,15% so với đối chứng khi bị đột biến gen *GS3* [11].

Bắc Thơm 7 là giống lúa có hạt thon dài, chất lượng ngon, được chỉnh sửa gen *GS3* nhằm tăng kích thước hạt [13]. Kết quả sàng lọc 41 dòng T_0 cho thấy, có 38 dòng mang trình tự gen mã hóa protein Cas9 để chỉnh sửa trình tự gen mục tiêu. Giải trình tự 5 dòng T_0 thu được 2 dòng lúa D1 và D25 bị đột biến mất 2 nucleotides T và C ở vị trí 127 và 128 làm tăng chiều dài hạt từ 0,86 đến 0,97 cm so với đối chứng (0,81 cm). Trong số 38 dòng kiểm tra, có 26 dòng không có sự khác biệt, 15 dòng có kích thước hạt lớn hơn và 4 dòng có kích thước hạt nhỏ hơn so với đối chứng. Kết quả này cho thấy, vị trí gây đột biến có thể khác nhau làm cho chức năng của gen *GS3* biểu hiện khác nhau ở các nhóm tính trạng thu được. Kết quả này cũng được lý giải trong các báo cáo trước đó [8, 10]. Do vậy, cần có thêm các phân tích sâu hơn để đánh giá vai trò của các dạng đột biến cũng như biểu hiện gen ở các dòng đột biến nêu trên.

4. Kết luận

Kết quả sàng lọc 41 dòng lúa T_0 chỉnh sửa gen *GS3* bằng PCR thu được 38 dòng có mang đoạn gen mã hóa protein Cas9. Phân tích đột biến 5 dòng cho thấy, D1 và D25 mất 2 nucleotides T, C ở vị trí 127 và 128. Kích thước hạt của các dòng đột biến có sự dao động đáng kể: 26/38 dòng không có sự khác biệt, 15/26 dòng có kích thước hạt lớn hơn (từ 0,86 đến 0,97 cm), trong đó 10 dòng có khối lượng 1.000

hạt cao hơn (19,22-22,6 g) so với đối chứng (17,9 g). Tuy nhiên, cần có thêm các phân tích chức năng đột biến ở các dòng khác nhau cũng như đánh giá các đặc điểm nông sinh học khác của các dòng lúa có triển vọng nêu trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] X.T. Duong, T.T. Pham, T.D. Tang, et al. (2018), "Application of molecular markers in the breeding of aromatic rice varieties with resistance to bacterial leaf blight", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **60**(2), pp.59-64 (in Vietnamese).
- [2] N.T. Phuoc, N.T. Lang, B.C. Buu (2021), "Application marker assisted selection in breeding improvement for salinity tolerance on rice *Oryza sativa* L.", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **5**, pp.3-9 (in Vietnamese).
- [3] A. Riccio, P. Clairand, W. Harwood (2017), "Use of CRISPR Systems in plant genome editing: Toward new opportunities in agriculture", *Emerg. Top Life Sci.*, **1**(2), pp.169-182, DOI: 10.1042/ETLS20170085.
- [4] H. Zhang, J. Zhang, Z. Lang, et al. (2017), "Genome editing - principles and applications for functional genomics research and crop improvement", *Critical Reviews in Plant Sciences*, **36**(4), pp.291-309, DOI: 10.1080/07352689.2017.1402989.
- [5] N. Li, R. Xu, P. Duan, et al. (2018), "Control of grain size in rice", *Plant Reprod.*, **31**(3), pp.237-251, DOI: 10.1007/s00497-018-0333-6.
- [6] C. Fan, Y. Xing, H. Mao, et al. (2006), "GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein", *Theor. Appl. Genet.*, **112**(6), pp.1164-1171, DOI: 10.1007/s00122-006-0218-1.
- [7] H. Mao, S. Sun, J. Yao, et al. (2010), "Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**(45), pp.19579-19584, DOI: 10.1073/pnas.1014419107.
- [8] M. Li, X. Li, Z. Zhou, et al. (2016), "Reassessment of the four yield-related genes *Gnla*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system", *Front. Plant Sci.*, **7**, DOI: 10.3389/fpls.2016.00377.
- [9] R. Xu, Y. Yang, R. Qin, et al. (2016), "Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice", *Genet. Genomics*, **43**(8), pp.529-532, DOI: 10.1016/j.jgg.2016.07.003.
- [10] C. Yuyu, Z. Aike, X. Pao, et al. (2020), "Effects of *GS3* and *GL3.1* for grain size editing by CRISPR/Cas9 in rice", *Rice Science*, **27**(5), pp.405-413, DOI: 10.1016/j.rsci.2019.12.010.
- [11] B. Usman, N. Zhao, G. Nawaz, et al. (2021), "CRISPR/Cas9 guided mutagenesis of grain size 3 confers increased rice (*Oryza sativa* L.) grain length by regulating cysteine proteinase inhibitor and ubiquitin-related proteins", *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(6), DOI: 10.3390/ijms22063225.
- [12] H. Le, N.H. Nguyen, D.T. Ta, et al. (2020), "CRISPR/Cas9-mediated knockout of galactinol synthase-encoding genes reduces raffinose family oligosaccharide levels in soybean seeds", *Front. Plant Sci.*, **11**, DOI: 10.3389/fpls.2020.612942.
- [13] N.T. Dung, L.V. Hien, N.X. Vu, et al. (2021), "Initial results of creating rice lines with increased grain size using CRISPR/Cas9 genome editing technology", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **8**, p.35-42 (in Vietnamese).
- [14] X. Xu, S. Kawasaki, T. Fujimura, et al. (2005), "A protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves", *Plant Mol. Biol. Rep.*, **23**, pp.291-295, DOI: 10.1007/BF02772759.

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

Đặc điểm kiểu gen của đa hình *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G và *MTRR* A66G ở phụ nữ sảy thai liên tiếp.

Trần Ngọc Thảo My, Triệu Tiên Sang, Nguyễn Ngọc Nhất, Trần Văn Tuấn, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Minh Phương, Trịnh Thế Sơn

Tỷ lệ đột biến vùng promoter gen *TERT* trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan.

Lê Văn Thu, Hồ Cẩm Tú, Nguyễn Quý Linh, Lê Thị Phương, Trần Văn Khánh, Nguyễn Xuân Hậu, Tạ Thành Văn, Nguyễn Thu Thúy

Nhận xét kết quả hóa trị bổ trợ phác đồ 4AC-4T kết hợp Anastrozole cho bệnh nhân ung thư vú ER dương tính/Her2 âm tính giai đoạn II-III.

Trịnh Lê Huy, Thân Văn Thịnh

Thực trạng sàng lọc bệnh thalassemia và một số yếu tố liên quan ở phụ nữ mang thai đến khám tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương.

Nguyễn Thị Huyền Trang, Trần Danh Cường, Trần Thơ Nhi, Ngô Toàn Anh, Vũ Thị Huyền, Lê Thị Minh Phương, Nguyễn Thị Trang

Khảo sát khả năng hạ glucose huyết của lá Xuân hoa răng (*Pseuderanthemum crenulatum*) trên mô hình chuột đái tháo đường bằng alloxan.

Dương Thị Bích, Dư Thế Anh, Trì Kim Ngọc, Nguyễn Hữu Phúc, Nguyễn Xuân Linh, Bành Thanh Hùng, Huỳnh Ngọc Trung Dung

Hai phương pháp định lượng Amlodipine besilate và Atorvastatin calcium trong chế phẩm bằng phép đo quang phổ bước sóng kép.

Nguyễn Đức Thiện, Nguyễn Thị Mỹ Linh, Lê Thị Phương Anh, Điều Diễm Quỳnh

Các yếu tố ảnh hưởng đến sự hài lòng của người bệnh với chất lượng khám chữa bệnh tại các bệnh viện công TP Hồ Chí Minh.

Nguyễn Thị Ngọc Phương, Nguyễn Thị Cẩm Hồng, Nguyễn Thị Hồng Thúy, Nguyễn Thanh Phong

Tỷ lệ nảy mầm, khả năng sinh trưởng và sự tích lũy hoạt chất của 5 giống artichoke nhập nội (*Cynara scolymus* L.) trồng tại tỉnh Lâm Đồng.

Hoàng Đắc Khải, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Quang Vinh, Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Bá Nam, Lê Văn Thức, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Thị Như Mai, Dương Tấn Nhựt

Nghiên cứu bảo quản táo cắt tươi bằng màng bao ăn được alginate có bổ sung cao chiết rong nâu *Sargassum polycystum*.

Trần Thị Ngọc Mai, Huỳnh Phương Quyên, Nguyễn Công Danh, Lê Thị Giang, Lê Hoàng Tinh, Nguyễn Thái Ngọc Uyên

Ứng dụng chỉ thị phân tử Microsatellite trong truy xuất phả hệ quần đàn cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) chọn giống.

Trần Thị Phương Dung, Nguyễn Hồng Lộc, Nguyễn Hoàng Thông, Lê Hoàng Khôi Nguyên, Nguyễn Văn Sáng

Ngưỡng mật độ *Streptococcus agalactiae* gây bệnh Streptococcosis ở cá rô phi (*Oreochromis* sp.) nuôi ao nước ngọt.

Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Hạnh, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Phạm Thị Yến, Lê Thị Mây, Võ Văn Nha, Đặng Thị Lua

Sàng lọc và tuyển chọn một số dòng lúa chỉnh sửa gen *GS3* bằng CRISPR/Cas9.

Nguyễn Tiến Dũng, Trương Thanh Tùng, Đào Minh Lê, Nguyễn Đức Huy, Lê Văn Hiền, Bùi Tri Thức, Nguyễn Xuân Vũ, Ngô Xuân Bình, Cao Lệ Quyên

1 Genotype characteristic of *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G polymorphisms in recurrent pregnancy loss.

Ngoc Thao My Tran, Tien Sang Trieu, Ngoc Nhat Nguyen, Van Tuan Tran, Thanh Tung Nguyen, Minh Phuong Nguyen, The Son Trinh

5 Frequency of *TERT* promoter mutations in hepatocellular carcinoma.

Van Thu Le, Cam Tu Ho, Quy Linh Nguyen, Thi Phuong Le, Van Khanh Tran, Xuan Hau Nguyen, Thanh Van Ta, Thu Thuy Nguyen

10 Efficacy results of 4AC-4T and Anastrozole adjuvant therapy in stage II-III hormone receptor-positive breast cancer.

Le Huy Trinh, Van Thinh Than

14 Status of screening for thalassemia and some related factors among pregnant women visiting the National Hospital of Obstetrics and Gynecology.

Thi Huyen Trang Nguyen, Danh Cuong Tran, Tho Nhi Tran, Toan Anh Ngo, Thi Huyen Vu, Thi Minh Phuong Le, Thi Trang Nguyen

21 Hypoglycemic effect of leaf extract of *Pseuderanthemum crenulatum* leaves in an alloxan-induced diabetic mice.

Thi Bich Duong, The Anh Du, Kim Ngoc Tri, Huu Phuc Nguyen, Xuan Linh Nguyen, Thanh Hung Banh, Ngoc Trung Dung Huynh

25 Two methods for determination of a binary mixture of Amlodipine besilate and Atorvastatin calcium using dual-wavelength spectrophotometry.

Duc Thien Nguyen, Thi My Linh Nguyen, Thi Phuong Anh Le, Diem Quynh Dieu

30 Factors affecting patient satisfaction with the quality of medical examination and treatment of public hospitals in Ho Chi Minh city.

Thi Ngoc Phuong Nguyen, Thi Cam Hong Nguyen, Thi Hong Thuy Nguyen, Thanh Phong Nguyen

37 Germination, growth, and secondary compounds accumulation of 5 introduced artichoke cultivars (*Cynara scolymus* L.) cultivated in Lam Dong province.

Dac Khai Hoang, Manh Cuong Do, Thanh Tung Hoang, Quang Vinh Nguyen, Manh Dung Doan, Ba Nam Nguyen, Van Thuc Le, Quoc Luan Vu, Thi Nhu Mai Nguyen, Tan Nhut Duong

43 Effects of alginate-based edible coatings enriched with extract *Sargassum polycystum* on quality attributes of fresh-cut apples.

Thi Ngoc Mai Tran, Phuong Quyen Huynh, Cong Danh Nguyen, Thi Giang Le, Hoang Tinh Le, Thai Ngoc Uyen Nguyen

48 The application of microsatellite markers for parentage analysis in selective population of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*).

Thi Phuong Dung Tran, Hong Loc Nguyen, Hoang Thong Nguyen, Hoang Khoi Nguyen Le, Van Sang Nguyen

54 The density threshold of *Streptococcus agalactiae* causing Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in freshwater ponds.

Thi My Hanh Truong, Thi Hanh Nguyen, Thi Minh Nguyet Nguyen, Thi Yen Pham, Thi May Le, Van Nha Vo, Thi Lua Dang

60 Screening and detecting *GS3* mutant-rice lines generated by CRISPR/Cas9 technology.

Tien Dung Nguyen, Thanh Tung Truong, Minh Le Dao, Duc Huy Nguyen, Van Hien La, Tri Thuc Bui, Xuan Vu Nguyen, Xuan Binh Ngo, Le Quyen Cao