



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

B

Tập 64 - Số 5 - Tháng 5 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 Nghiêm - 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

So sánh kết quả xét nghiệm điện giải đồ trên hệ thống máy phân tích khí máu và hóa sinh tự động

Nguyễn Thị Ngọc Lan^{1, 2*}, Vũ Văn Quý^{1, 2}, Lê Hữu Lộc^{1, 2}

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

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

Ngày nhận bài 12/1/2022; ngày chuyển phản biện 14/1/2022; ngày nhận phản biện 8/2/2022; ngày chấp nhận đăng 11/2/2022

Tóm tắt:

Xét nghiệm điện giải đồ thường được chỉ định trên lâm sàng, kết quả của xét nghiệm này đặc biệt quan trọng ở những bệnh nhân tại các đơn vị điều trị tích cực (ICU). Bên cạnh yêu cầu về tính chính xác của kết quả xét nghiệm, thời gian trả kết quả xét nghiệm cũng cần rút ngắn nhất để đảm bảo công tác chăm sóc và điều trị. Hiện nay, tại phòng thí nghiệm có thể thực hiện xét nghiệm điện giải đồ trên 2 hệ thống là máy phân tích khí máu (ABG) và hóa sinh thường quy. Vậy sự tương quan về kết quả xét nghiệm điện giải đồ thực hiện trên 2 hệ thống này là như thế nào? Nghiên cứu được tiến hành trên 910 bệnh nhân có chỉ định đồng thời cả xét nghiệm khí máu động mạch và điện giải đồ tại Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các mẫu bệnh phẩm khí máu được thực hiện phân tích thêm các chỉ số điện giải đồ trên hệ thống ABG. Kết quả điện giải đồ trên ABG và hóa sinh tự động có mối tương quan chặt chẽ (r : 0,751-0,874), tuy nhiên sự khác biệt vượt quá mức cho phép và phụ thuộc vào nồng độ của các chất điện giải trong máu. Trung bình khác biệt của các nồng độ Na^+ , K^+ và Cl^- trong máu lần lượt là 1,4254 [-4,233-7,084], -0,4874 [-1,337-0,363] và -0,8388 [-7,346-5,668]. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê và dẫn tới khác biệt trong chẩn đoán lâm sàng, chính vì vậy, các bác sĩ lâm sàng cần cân nhắc khi sử dụng các kết quả xét nghiệm này.

Từ khóa: điện giải đồ, máy hóa sinh tự động, máy khí máu.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Điện giải là những khoáng chất mang điện tích cần thiết cho hoạt động của tế bào cơ thể. Hầu hết các quá trình chuyển hóa trong cơ thể đều phụ thuộc vào/hoặc điều hòa trung gian bởi các chất điện giải. Nếu nồng độ các chất điện giải thay đổi có thể gây ra rối loạn trong cơ thể. Các rối loạn nước điện giải cần được phát hiện sớm và xử trí nhanh chóng nếu không có thể gây ra nhiều rủi ro cho bệnh nhân [1]. Xét nghiệm điện giải đồ đặc biệt quan trọng ở những bệnh nhân trong đơn vị ICU, hầu hết các bệnh nhân nặng đều được chỉ định xét nghiệm điện giải đồ. Ở những bệnh nhân này, không những yêu cầu có kết quả xét nghiệm chính xác mà còn cần càng nhanh càng tốt để nhanh chóng phát hiện các rối loạn nước - điện giải và có thể can thiệp điều chỉnh rối loạn sớm nhất cho bệnh nhân.

Phương pháp xét nghiệm điện giải sử dụng điện cực chọn lọc ion (ISE - Ion selective electrode) dựa trên sự chênh lệch về thế điện cực với điện cực tham chiếu hiện đang được sử dụng ở hầu hết các bệnh viện. ISE có 2 loại là trực tiếp và gián tiếp [1]. Với phương pháp ISE gián tiếp, mẫu được đưa vào buồng đo sau khi trộn với một lượng lớn chất pha loãng.

Đây là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất trên các hệ thống máy hóa sinh tự động hiện nay. Các phương pháp gián tiếp được phát triển sớm trong lịch sử của công nghệ ISE khi cần pha loãng một lượng mẫu nhỏ trong một thể tích đủ lớn để bao phủ một cách đầy đủ điện cực và giảm thiểu nồng độ protein ở bề mặt điện cực. Với phương pháp ISE trực tiếp, mẫu được đưa vào các điện cực mà không cần pha loãng. Cách tiếp cận này đã trở nên khả thi với việc thu nhỏ các điện cực. ISE trực tiếp được sử dụng trong ABG và các thiết bị xét nghiệm nhanh tại chỗ (POCT) hay trên các máy phân tích hóa sinh khô hiện nay, tại đó mẫu toàn phần/huyết tương được đưa trực tiếp vào các điện cực [1]. Nồng độ các ion natri và kali được đo trong máu toàn phần và huyết tương đã được chứng minh về cơ bản giống hệt nhau khi phân tích thể điện cực [2].

Các xét nghiệm ở phòng thí nghiệm trung tâm có thể dẫn tới thời gian trả kết quả lâu hơn, gây ra sự chậm trễ trong việc xử trí bệnh nhân, đặc biệt với các trường hợp bệnh nhân nặng và có thể ảnh hưởng đến kết quả điều trị [3, 4]. Nếu xét nghiệm được thực hiện ngay tại nơi chăm sóc và điều trị bệnh nhân, thời gian trả kết quả xét nghiệm sẽ được rút ngắn, từ đó cải thiện công tác quản lý bệnh nhân. Tuy nhiên,

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

Comparison of electrolyte test results on blood gas analyzer and automatic biochemistry analyzer

Thi Ngoc Lan Nguyen^{1,2*}, Van Quy Vu^{1,2}, Huu Loc Le^{1,2}

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

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

Received 12 January 2022; revised 8 February 2022; accepted 11 February 2022

Abstract:

Electrolyte testing is often ordered clinically, especially important in patients treated in the intensive care unit (ICU). In addition to the requirement for the accuracy of results, the turnaround time testing also needs to be shortened to ensure care and treatment. Currently, laboratories can perform electrolyte tests on two systems, a blood gas analyzer and a routine biochemistry analyzer. This study aims to find the correlation between the results of electrolyte tests performed on blood gas analyzer and automatic biochemistry analyzer. The study was conducted on 910 patients who were assigned both arterial blood gas and electrolyte tests at the Laboratory Department - Hanoi Medical University Hospital. The results showed that a high correlation between electrolyte results performed on a blood gas machine and an automatic biochemistry analyzer ($r: 0.751-0.874$). The difference exceeded the allowable cut-off and depended on the concentration of these electrolytes in the blood. The mean differences of the concentrations of Na^+ , K^+ , and Cl^- in the blood were $1.4254 [-4.233-7.084]$, $-0.4874 [-1.337-0.363]$, and $-0.8388 [-7.346-5.668]$, respectively. The difference in electrolyte results on the two systems is clinically significant, clinicians therefore should pay attention to the use of these test results.

Keywords: biochemistry analyzer, blood gas analyzer, electrolyte test.

Classification number: 3.1

những ưu điểm như vậy chỉ có thể đạt được nếu kết quả POCT tương đồng với xét nghiệm được thực hiện tại các phòng thí nghiệm trung tâm và đáp ứng các tiêu chí mong muốn của lâm sàng.

Hiện nay, nhu cầu sử dụng các ABG tại các khoa điều trị tích cực, khoa cấp cứu ngày càng tăng, các xét nghiệm phân tích khí máu thể hệ mới đều tích hợp khả năng đo đặc chất điện giải với thời gian trả kết quả 2-3 phút sau khi nạp

mẫu. Chính vì vậy, việc khảo sát đánh giá sự tương quan kết quả xét nghiệm điện giải đồ trên 2 hệ thống là cần thiết để có thể đưa ra các khuyến cáo trên lâm sàng về việc thực hành cũng như sử dụng kết quả này sao cho được chính xác và hiệu quả nhất.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu: Đối tượng được lựa chọn trong nhóm nghiên cứu bao gồm tất cả bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội (tháng 8-10/2018) được chỉ định xét nghiệm điện giải đồ (mẫu máu tĩnh mạch) và khí máu động mạch (mẫu máu toàn phần động mạch) tại cùng một thời điểm. Toàn bộ dữ liệu của các bệnh nhân được thu thập: thông tin lâm sàng, kết quả điện giải đồ trên hệ thống xét nghiệm tự động và hệ thống ABG... Trong đó, xét nghiệm điện giải đồ được thực hiện trên máy Cobas C8000 (Roche, Đức), xét nghiệm khí máu được thực hiện trên máy Cobas B221 (Roche, Đức).

2.2. Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

2.3. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.4. Cơ mẫu nghiên cứu: Tất cả các mẫu bệnh phẩm đáp ứng yêu cầu lựa chọn trong khoảng thời gian từ tháng 8/2018 đến tháng 10/2018 được lựa chọn nghiên cứu. Tổng số mẫu của nghiên cứu là 910 bệnh nhân.

2.5. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm: 2 thiết bị xét nghiệm khí máu và điện giải đồ được bảo dưỡng, vận hành, hiệu chuẩn theo đúng khuyến cáo của nhà sản xuất. Các xét nghiệm điện giải đồ thực hiện trên 2 hệ thống đều được tham gia đánh giá nội kiểm hàng ngày và ngoại kiểm theo chương trình của Trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng Xét nghiệm, Trường Đại học Y Hà Nội. Kết quả đánh giá tại thời điểm nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn.

2.6. Xử lý số liệu: Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0. Kiểm định phân phối chuẩn của số liệu bằng thử nghiệm độ lệch và độ nhọn. Khác biệt về kết quả điện giải đồ giữa 2 phương pháp trên 2 hệ thống Cobas C8000 và Cobas B221 được khảo sát dựa vào: phân tích tương quan giữa 2 phương pháp bằng hệ số Pearson và Spearman; kiểm định sự khác biệt của 2 phương pháp với giá trị 0 bằng t-test; vẽ biểu đồ Bland-Altman và diễn giải kết quả dựa vào các ngưỡng quyết định lâm sàng.

2.7. Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu tuân thủ các quy định về đạo đức nghiên cứu. Nghiên cứu không tiến hành bất kỳ một can thiệp nào trên bệnh nhân, nhóm nghiên cứu chỉ tiến hành phân tích thêm dữ liệu xét nghiệm trong một lần phân tích mẫu bệnh phẩm. Tất cả thông tin của bệnh nhân đều được mã hóa và bảo mật.

3. Kết quả

Trong nghiên cứu này, phương pháp định lượng điện giải đồ gián tiếp trên hệ thống Cobas C8000 được ký hiệu là A. Phương pháp định lượng trực tiếp trên máy Cobas B221 được ký hiệu là B. Khác biệt kết quả định lượng điện giải đồ giữa 2 phương pháp là B-A.

Bảng 1. Sự khác biệt về kết quả điện giải đồ của 2 phương pháp xét nghiệm.

Thông số	Trung bình khác biệt	Khoảng tin cậy (95% CI)	p (t-test) (so sánh trung bình khác biệt với giá trị 0)
Na ⁺	1,4254	1,2221÷1,6294	0,001
K ⁺	-0,4874	-0,5170÷-0,4589	0,001
Cl ⁻	-0,8388	-1,1073÷-0,5637	0,001

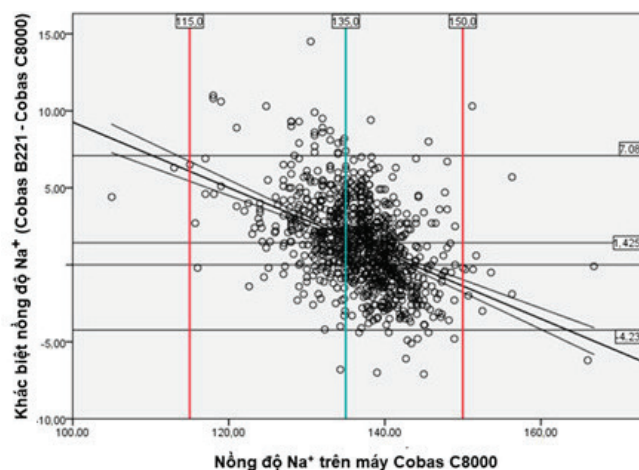
Bảng 2. Sự tương quan về kết quả điện giải đồ của 2 phương pháp xét nghiệm.

Thông số	± SD		r (95%CI)	p (t-test)
	Cobas B221	Cobas C8000		
Na ⁺	138,249±5,3439	136,824±5,9332	0,874 (0,850-0,894)	<0,0001
K ⁺	3,388±0,7339	3,875±0,6544	0,751 (0,717-0,781)	<0,0001
Cl ⁻	99,125±5,0744	99,964±6,3059	0,852 (0,820-0,876)	<0,0001

Kết quả bảng 1 và 2 cho thấy, nồng độ Na⁺ được định lượng trực tiếp trên máy Cobas B221 cho ra kết quả cao hơn khoảng 10% so với phương pháp gián tiếp trên hệ thống Cobas C8000. Trung bình khác biệt giữa 2 phương pháp là 1,4254 đơn vị (1,085%). Khác biệt này mặc dù thấp nhưng lại không bao gồm khả năng bằng 0 trên thực tế (khoảng tin cậy không chứa giá trị 0 cho B-A). Giới hạn trên của khác biệt = 1,4254 + 1,96 × 2,88716 = 7,084; giới hạn dưới của khác biệt = 1,4254 - 1,96 × 2,88716 = -4,233.

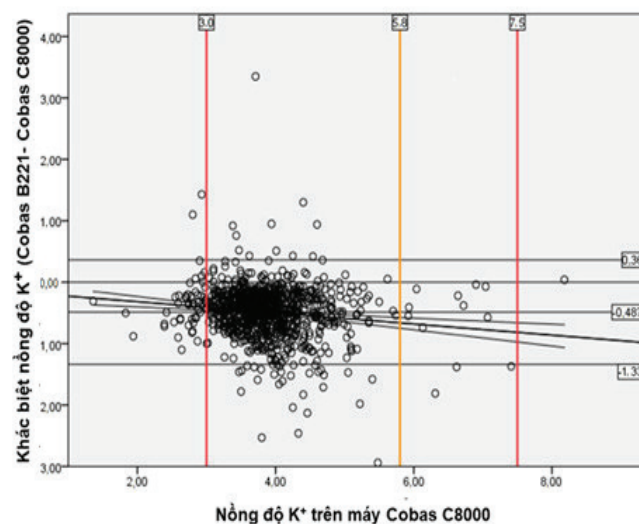
Định lượng K⁺ trực tiếp trên máy Cobas B221 cho ra kết quả thấp hơn khoảng 8,7% so với phương pháp gián tiếp trên hệ thống Cobas C8000. Trung bình khác biệt giữa 2 phương pháp là -0,4874 đơn vị (-12,6617%). Khác biệt này mặc dù thấp nhưng lại không bao gồm khả năng bằng 0 trên thực tế (khoảng tin cậy không chứa giá trị 0 cho B-A). Giới hạn trên của khác biệt = -0,4874 + 1,96 × 0,43368 = 0,363; giới hạn dưới của khác biệt = -0,4874 - 1,96 × 0,43368 = -1,337.

Định lượng Cl⁻ trực tiếp trên máy Cobas B221 cho ra kết quả thấp hơn khoảng 10% so với phương pháp gián tiếp trên hệ thống Cobas C8000. Trung bình khác biệt giữa 2 phương pháp là -0,8388 đơn vị (-0,7120%). Khác biệt này mặc dù thấp nhưng lại không bao gồm khả năng bằng 0 trên thực tế (khoảng tin cậy không chứa giá trị 0 cho B-A). Giới hạn trên của khác biệt = -0,8388 + 1,96 × 3,31998 = 5,668; giới hạn dưới của khác biệt = -0,8388 - 1,96 × 3,31998 = -7,346.



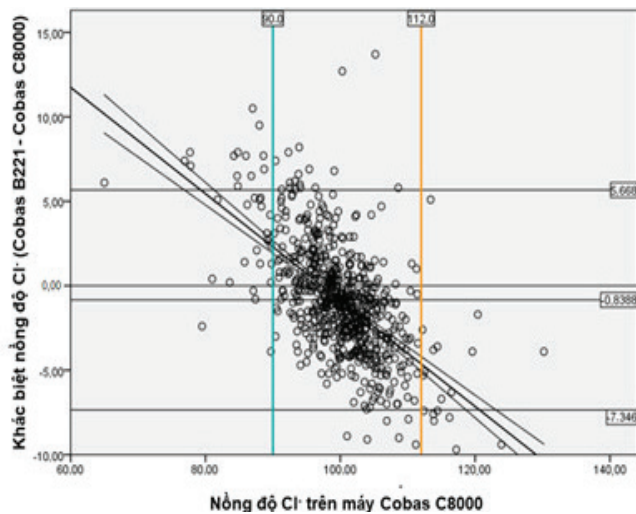
Hình 1. Biểu đồ Bland-Altman với Na⁺.

Hình 1 là biểu đồ Bland-Altman với trục tung biểu thị cho khác biệt Na⁺ giữa 2 phương pháp còn trục hoành biểu thị cho giá trị Na⁺ từ phân tích trên hệ thống Cobas C8000. Đường thẳng Y=1,4254 biểu thị giá trị trung bình của khác biệt. Đường thẳng Y=7,084 và -4,233 lần lượt là giới hạn trên và dưới của khác biệt. Các đường thẳng X=115, 135 và 150 lần lượt là vị trí của ngưỡng quyết định lâm sàng của hội chứng hạ Na⁺ mức độ nặng, hạ Na⁺ và tăng Na⁺ trên lâm sàng.



Hình 2. Biểu đồ Bland-Altman với K⁺.

Hình 2 là biểu đồ Bland-Altman với trục tung biểu thị cho khác biệt K⁺ giữa 2 phương pháp còn trục hoành biểu thị cho giá trị K⁺ từ phân tích trên hệ thống Cobas C8000. Đường thẳng Y=-0,4874 biểu thị giá trị trung bình của khác biệt. Đường thẳng Y=0,363 và -1,337 lần lượt là giới hạn trên và dưới của khác biệt. Các đường thẳng X=3,0, 5,8 và 7,5 lần lượt là vị trí của ngưỡng quyết định lâm sàng của hội chứng hạ K⁺ máu, tăng K⁺ và tăng K⁺ cấp cứu trên lâm sàng.



Hình 3. Biểu đồ Bland-Altman với Cl⁻.

Hình 3 là biểu đồ Bland-Altman với trục tung biểu thị cho khác biệt Cl⁻ giữa 2 phương pháp còn trục hoành biểu thị cho giá trị Cl⁻ từ phân tích trên hệ thống Cobas C8000. Đường thẳng $Y = -0,8388$ biểu thị giá trị trung bình của khác biệt. Đường thẳng $Y = 5,668$ và $-7,346$ lần lượt là giới hạn trên và dưới của khác biệt. Các đường thẳng $X = 90$ và 110 lần lượt là vị trí của ngưỡng quyết định lâm sàng với hội chứng hạ Cl⁻ máu và tăng Cl⁻ máu trên lâm sàng.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu sự khác biệt về kết quả điện giải đồ trên hệ thống ABG và máy hóa sinh tự động, từ đó có thể xem xét việc sử dụng các giá trị xét nghiệm này trong thực hành lâm sàng.

Từ kết quả của bảng 1 cho thấy, sự khác biệt về nồng độ trung bình của các chất điện giải giữa 2 phương pháp trên máy điện giải đồ Cobas B221 và Cobas C8000 là không có quá nhiều sự khác biệt. Tuy nhiên, khi phân tích sâu hơn kết quả thu được từ mô hình hồi quy tuyến tính về kết quả điện giải đồ giữa 2 thiết bị ($Y = B - A$) với kết quả của máy Cobas C8000 ($X = A$) cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$, nghĩa là khác biệt về nồng độ Na⁺, K⁺ và Cl⁻ giữa 2 phương pháp phụ thuộc vào nồng độ của chúng trong máu. Khi kiểm định t-test cho mẫu độc lập, so sánh trung bình khác biệt với giá trị 0 cho thấy khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,001$). Điều này cho thấy, luôn có sự khác biệt trong mọi trường hợp giữa 2 phương pháp.

Tuy nhiên, các biến thiên sinh học về nồng độ điện giải là khá nhỏ, vì vậy những sai sót nhỏ có thể dẫn tới chẩn đoán nhầm [5]. Tiêu chuẩn US CLIA 1990 chấp nhận sự khác biệt về nồng độ Na⁺ là 4 mmol/l và K⁺ là 0,25 mmol/l [6].

Đối với kết quả nồng độ Na⁺, đa số các khác biệt là dương, tức là kết quả định lượng trên hệ thống Cobas B221

cao hơn so với kết quả định lượng trên Cobas C8000, đặc biệt là những trường hợp hạ Na⁺ máu nặng. Trong khi phần lớn các trường hợp khác biệt âm lại xảy ra ở những bệnh nhân có tăng Na⁺, chứng tỏ rằng kết quả định lượng Na⁺ máu trên máy Cobas B221 dễ bỏ sót chẩn đoán các rối loạn Na⁺ máu. Với các trường hợp nồng độ Na⁺ máu trong khoảng tham chiếu, hầu hết các khác biệt đều nằm trong khoảng -4,233 đến 7,084. Tuy nhiên, theo Tiêu chuẩn US CLIA 1990 chỉ cho phép khác biệt là 4,0 mmol/l [6]. Vì vậy, kết quả Na⁺ trên máy Cobas B221 và trên mẫu máu tĩnh mạch khác biệt nhau và có thể dẫn tới khác biệt trong chẩn đoán lâm sàng. Kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác cũng cho thấy giá trị Na⁺ của 2 phương pháp là khác biệt có ý nghĩa thống kê và có thể ảnh hưởng đến việc lựa chọn điều trị [6-9]. Tác giả E. Chow và cs (2008) [10] cũng nhận thấy, nồng độ Na⁺ và K⁺ được đo trực tiếp thấp hơn trong phương pháp đo gián tiếp. Nguyên nhân của sự khác biệt này được cho là liên quan đến đặc điểm nồng độ protein trong máu bệnh nhân thấp, đặc biệt là ở những bệnh nhân nặng. Theo nghiên cứu của Chow và cs, ở những bệnh nhân có nồng độ protein máu thấp, giá trị điện giải đồ đo trực tiếp chính xác và hằng định hơn so với giá trị đo gián tiếp. Trong khi đó, một số nghiên cứu khác lại không thấy có sự khác biệt về nồng độ Na⁺ của 2 phương pháp [4, 11]. Điều này có thể do sự khác biệt về các hệ thống ABG và máy hóa sinh tự động được sử dụng trong các nghiên cứu.

Đối với kết quả nồng độ K⁺, đa số các khác biệt là âm, tức là kết quả định lượng trên hệ thống ABG Cobas B221 thấp hơn so với kết quả định lượng trên Cobas C8000. Trong khi tất cả các trường hợp khác biệt âm cũng xảy ra ở những bệnh nhân có tăng K⁺ máu, chứng tỏ rằng kết quả định lượng K⁺ máu trên máy Cobas B221 dễ bỏ sót chẩn đoán tăng K⁺ máu cũng như việc đưa ra xử trí với những bệnh nhân tăng K⁺ máu nặng. Với các trường hợp nồng độ K⁺ máu trong khoảng tham chiếu, hầu hết các khác biệt đều nằm trong khoảng -1,337 đến 0,363. Mặc dù có thể không ảnh hưởng đến chẩn đoán nhưng theo Tiêu chuẩn US CLIA 1990 chỉ cho phép khác biệt là 0,25 mmol/l [6]. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy sự khác biệt về kết quả K⁺ giữa 2 phương pháp là từ 0,1 đến 0,7 mmol/l [1]. Nguyên nhân của việc phân lớn nồng độ K⁺ đo trên ABG thấp hơn trên máy hóa sinh tự động đó là do K⁺ được giải phóng khỏi tiểu cầu trong mẫu máu huyết thanh/huyết tương. A. Jain và cs (2009) [7] còn khuyến cáo nên sử dụng nồng độ K⁺ huyết thanh nhưng được phân tích trên ABG để đưa ra các quyết định lâm sàng. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của Y. Budak và cs (2012) [3] cho thấy, trên khoảng 15% bệnh nhân có kết quả xét nghiệm vượt quá Tiêu chuẩn cho phép của Tiêu chuẩn US CLIA 1990 nên việc ứng dụng trên lâm sàng phải hết sức cân nhắc.

Đối với kết quả nồng độ Cl^- , hầu hết các khác biệt là dương. Trong khi gần như tất cả các trường hợp khác biệt âm lại xảy ra ở những bệnh nhân có tăng Cl^- , chứng tỏ kết quả định lượng Cl^- máu trên máy Cobas B221 dễ bỏ sót chẩn đoán các rối loạn Cl^- máu. Với các trường hợp nồng độ Cl^- máu trong khoảng tham chiếu, hầu hết các khác biệt đều nằm trong khoảng -7,346 đến 5,668. Mặc dù có thể không ảnh hưởng đến chẩn đoán nhưng theo S.S. Ehrmeyer và cs (1990) [6] chỉ cho phép khác biệt là 5%. Vì vậy, việc sử dụng kết quả K^+ và Cl^- có thể dẫn tới sự khác biệt trong chẩn đoán trên lâm sàng.

H. Morimatsu và cs (2003) [8] tiến hành tính toán khoảng trống anion và sự khác biệt ion ở những bệnh nhân nặng giữa kết quả xét nghiệm thu được trên 2 hệ thống ABG và hóa sinh tự động cho thấy, kết quả của 2 phương pháp cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê và việc phiên giải kết quả cũng như quyết định lâm sàng có thể bị ảnh hưởng lớn. Sự khác biệt về kết quả điện giải đồ trên 2 hệ thống phân tích có thể được giải thích do nhiều yếu tố kết hợp như vận chuyển mẫu, phương pháp phân tích trực tiếp hoặc gián tiếp dẫn tới mẫu pha loãng trước khi phân tích, sự khác biệt về đường chuẩn giữa các thiết bị và các tình trạng lâm sàng của bệnh nhân. Thiết bị phân tích điện giải đồ của các nhà sản xuất khác nhau thì kết quả Na^+ và K^+ cũng khác biệt từ 2 đến 5%. Ngoài ra, đối với xét nghiệm khí máu dùng xy lanh có tráng heparin cũng có thể gây sai số phân tích đối với nồng độ ion tích điện dương có thể lệch âm [12]. Vậy trên thực tế lâm sàng có thể sử dụng các hệ số điều chỉnh nhằm điều chỉnh sự khác biệt về kết quả giữa 2 phương pháp xét nghiệm này hay không? Từ kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy, kết quả của 2 phương pháp mặc dù có độ tương quan cao nhưng có những trường hợp rối loạn điện giải nặng thì sự tương quan lại bị đảo ngược, chính vì vậy, chúng tôi không khuyến cáo việc sử dụng hệ số điều chỉnh trong giá trị xét nghiệm điện giải đồ này.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tầm quan trọng của việc xác định sự khác biệt về kết quả xét nghiệm điện giải đồ trên ABG và hóa sinh tự động của mỗi bệnh viện. Trước khi ứng dụng các giá trị xét nghiệm trong chẩn đoán và điều trị, mỗi bệnh viện cần thực hiện các xác nhận giá trị sử dụng và đánh giá sự khác biệt giữa các phương pháp.

5. Kết luận

Kết quả điện giải đồ trên hệ thống ABG và hệ thống hóa sinh tự động có độ tương quan chặt chẽ (r : 0,751-0,874), tuy nhiên, sự khác biệt vượt quá ngưỡng cho phép và phụ thuộc vào nồng độ của các chất điện giải trong máu. Trung

binh khác biệt của các nồng độ Na^+ , K^+ và Cl^- trong máu lần lượt là 1,4254 [-4,233-7,084], -0,4874 [-1,337-0,363] và -0,8388 [-7,346-5,668]. Do đó, có thể ảnh hưởng tới quyết định trong chẩn đoán và điều trị bệnh nhân. Kết quả xét nghiệm điện giải đồ trên ABG và hóa sinh tự động không nên được sử dụng để thay thế cho nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Rifai, A.R. Horvath, C. Wittwer (2018), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Anne Arundel Community College.
- [2] J. Ladenson (1977), "Direct potentiometric measurement of sodium and potassium in whole blood", *Clin. Chem.*, **23**(10), pp.1912-1916.
- [3] Y. Budak, K. Huysal, M. Polat (2012), "Use of blood gas analyzer and a laboratory autoanalyzer in routine practice to measure electrolytes in intensive care unit patients", *BMC Anesthesiol*, **12**, DOI: 10.1186/1471-2253-12-17.
- [4] A. Dabas, S. Agrawal, V. Tyagi, et al. (2021), "Point of care testing of serum electrolytes and lactate in sick children", *EJIFCC*, **32**(2), pp.158-166.
- [5] C.G. Fraser, P.H. Petersen, C. Ricos, et al. (1992), "Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry", *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **30**(5), pp.311-317.
- [6] S.S. Ehrmeyer, R.H. Laessig, J.E. Leinweber, et al. (1990), "1990 medicare/CLIA final rules for proficiency testing: Minimum intralaboratory performance characteristics CV and bias needed to pass", *Clin. Chem.*, **36**(10), pp.1736-1740.
- [7] A. Jain, I. Subhan, M. Joshi (2009), "Comparison of the point-of-care blood gas analyzer versus the laboratory auto-analyzer for the measurement of electrolytes", *Int. J. Emerg. Med.*, **2**(2), pp.117-120.
- [8] H. Morimatsu, J. Rocktäschel, R. Bellomo, et al. (2003), "Comparison of point-of-care versus central laboratory measurement of electrolyte concentrations on calculations of the anion gap and the strong ion difference", *Anesthesiology*, **98**(5), pp.1077-1084, DOI: 10.1097/00005542-200305000-00009.
- [9] H. Yi, W.S. Shi, Y. Zhang, et al. (2020), "Comparison of electrolyte and glucose levels measured by a blood gas analyzer and an automated biochemistry analyzer among hospitalized patients", *J. Clin. Lab. Anal.*, **34**(7), DOI: 10.1002/jcla.23291.
- [10] E. Chow, N. Fox, R. Gama (2008), "Effect of low serum total protein on sodium and potassium measurement by ion-selective electrodes in critically ill patients", *Br. J. Biomed. Sci.*, **65**(3), pp.128-131.
- [11] K. Marija, K.F. Bernhard, L.K. Beatrice (2021), "Blood-gas vs central-laboratory analyzers: Interchangeability and reference intervals for sodium, potassium, glucose, lactate and hemoglobin", *Heliyon*, **7**(11), DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08302.
- [12] M.V. Berkel, V. Scharnhorst (2011), "Electrolyte-balanced heparin in blood gas syringes can introduce a significant bias in the measurement of positively charged electrolytes", *Clin. Chem. Lab. Med.*, **49**(2), pp.249-252.

Biểu hiện thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD20 (CD20-CAR) trên bề mặt tế bào Jurkat T và đánh giá hoạt tính sinh học của nó

Võ Nguyễn Thanh Thảo, Chu Đào Xuân Trúc, Huỳnh Đàm Kim Tuyền, Phùng Thị Việt Anh, Nguyễn Đăng Quân*

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, 2374 quốc lộ 1, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/11/2021; ngày chuyển phân biên 4/11/2021; ngày nhận phân biên 15/11/2021; ngày chấp nhận đăng 22/11/2021

Tóm tắt:

CD20 hiện đang là kháng nguyên mục tiêu được chú ý trong các hướng nghiên cứu điều trị ung thư máu liên quan tế bào B bằng liệu pháp miễn dịch. Nhiều kháng thể đơn dòng kháng CD20 như Rituximab, Ibritumomab, Tositumomab... đã được phát triển và ứng dụng trong điều trị. Những năm gần đây, liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào T biểu hiện thụ thể kháng nguyên dạng khảm (Chimeric antigen receptor - CAR) cho thấy nhiều tiềm năng trong điều trị và hiện đang được quan tâm nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, các tác giả tạo dòng và biểu hiện 2 phiên bản CAR đặc hiệu CD20 (CD20-CAR), bao gồm phiên bản tham khảo trình tự từ patent (SEQ01) và phiên bản nghiên cứu do nhóm tự thiết kế (SEQ02) trên bề mặt tế bào Jurkat T. Sau khi được chuyển nạp 24 giờ, các vector mang gen mã hoá CD20-CAR, tế bào Jurkat T có thể biểu hiện CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 ở mức độ mRNA và protein. Kết quả phân tích tế bào theo dòng chảy (FACS) cho thấy, CD20-CAR được biểu hiện trên bề mặt tế bào Jurkat T. Trong điều kiện đồng nuôi cấy với tế bào ung thư Raji B biểu hiện kháng nguyên CD20, tế bào Jurkat T biểu hiện CAR SEQ01 và SEQ02 được kích hoạt tăng tiết Interleukin 2 (IL-2). Kết quả cho thấy, nghiên cứu đã biểu hiện thành công đặc hiệu CD20-CAR trên tế bào Jurkat T và bước đầu ghi nhận có hoạt tính sinh học. Đây là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo tạo tế bào lympho T CD4⁺ và CD8⁺ biểu hiện CD20-CAR.

Từ khóa: CD20, liệu pháp miễn dịch, thụ thể kháng nguyên dạng khảm.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Ung thư là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn thế giới, tại Việt Nam số mắc mới ung thư tăng khoảng 200.000 trường hợp mỗi năm. Trong những năm gần đây, CAR-T-cell là liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư mới nhiều triển vọng với ưu điểm vượt trội là sử dụng chính hệ thống miễn dịch của người bệnh để tiêu diệt các tế bào ung thư, đem đến hiệu quả điều trị đặc hiệu, an toàn cho người bệnh. Ở liệu pháp này, các tế bào T của bệnh nhân được thu nhận và can thiệp bằng công nghệ gen nhằm biểu hiện CAR đặc hiệu kháng nguyên ung thư trên bề mặt tế bào (CAR-T). Tế bào CAR-T được truyền trở lại cơ thể bệnh nhân, chúng có thể nhận biết chính xác và tiêu diệt tế bào ung thư thông qua các kháng nguyên ung thư [1, 2].

CAR là thụ thể tái tổ hợp có khả năng nhận diện đặc hiệu các kháng nguyên mục tiêu dựa trên nguyên tắc tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên. Thông qua CAR, tế bào T nhận diện trực tiếp tế bào ung thư mà không cần thông qua hệ thống phức hợp hòa hợp mô chủ yếu - MHC giúp tăng hiệu quả nhận diện và tiêu diệt tế bào ung thư. Cấu trúc điển hình của thụ thể này bao gồm vùng nhận diện kháng nguyên ngoại bào liên kết với vùng xuyên màng thông qua một trình tự peptide ngắn gọi là spacer/hinge, vùng xuyên màng sẽ liên kết với vùng hoạt hóa nội bào bên trong giúp hoạt hóa tế bào T [3].

Protein CD20 là phân tử mục tiêu chính trong các nghiên

cứu tạo tế bào CAR-T hướng đến ứng dụng trong điều trị bệnh ung thư máu liên quan tế bào B như bệnh lympho không Hodgkin tế bào B. CD20 biểu hiện ở tế bào B trưởng thành và tế bào B ung thư nhưng lại không biểu hiện ở tiền tế bào B và tế bào plasma tiết kháng thể, vì vậy, các liệu pháp nhắm đích CD20 không tác động đến quần thể tế bào B bình thường [4]. Kết quả từ các thử nghiệm lâm sàng đối với liệu pháp điều trị ung thư máu ác tính bằng CD20-CAR-T cho thấy rất triển vọng khi một số công bố thử nghiệm cho tỷ lệ khỏi bệnh đạt hơn 80% [5].

Ở nước ta, việc nghiên cứu và ứng dụng các phương pháp mới trong điều trị ung thư, trong đó có ung thư máu, hiện đang rất được quan tâm. Kế thừa các kết quả đạt được trong nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng kháng CD20, chúng tôi thực hiện nghiên cứu tạo và bước đầu đánh giá hoạt tính của CD20-CAR trên tế bào Jurkat T nhằm tiếp cận hướng nghiên cứu mới trong điều trị ung thư bằng liệu pháp miễn dịch tế bào CAR-T [6].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Tế bào, chủng vi khuẩn và môi trường nuôi cấy

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α được nuôi trong môi trường LB có bổ sung kháng sinh ampicillin (100 µg/ml).

Tế bào Jurkat T và Raji B (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh cung cấp) được

*Tác giả liên hệ: Email: ndquan.snn@tphcm.gov.vn

Expression of CD20-specific chimeric antigen receptor (CD20-CAR) on Jurkat T cells and evaluation its biological activity

Nguyen Thanh Thao Vo, Dao Xuan Truc Chu,
Dam Kim Tuyen Huynh, Thi Viet Anh Phung,
Dang Quan Nguyen*

²Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, 2374 Highway 1, Quarter 2,
Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 1 November 2021; revised 15 November 2021; accepted 22 November 2021

Abstract:

CD20 is a potential target for immunotherapy treatments of haematological malignancies due to its specific expression and unique biological property. Over the years, many anti-CD20 monoclonal antibodies (mAbs) have been developed, such as Rituximab, Ibritumomab, Tositumomab, etc., and applied in B cells related to cancer treatments. Recently, a new immunological therapy, namely Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy, in which the patient's T cells are reprogrammed ex vivo with a transgene encoding a CAR in order to active them against the tumour, has emerged as a promising treatment for B-cell malignancies. In this study, the authors generated and expressed two variants of chimeric receptor antigen-specific to CD20 on Jurkat T cells, in which one variant referenced the sequence from the patent (SEQ01) and the other was our own designed sequence (SEQ02). The transient expression after electroporation 24 hours confirmed the presence of mRNA and protein of CD20-CAR in both sequences. Moreover, these chimeric receptors were also detected on the membrane of Jurkat cells using flow cytometer analysis, indicating that the author could successfully transduce and express CD20-CAR in Jurkat cells. Co-culture CD20-Jurkat-CAR-T cells with CD20-expressing Raji B cells show that the generated Jurkat could be activated via their chimeric receptors through increasing the secretion of Interleukin-2 in both sequences. Taken together, our preliminary data suggest that the authors have been able to express the CD20-activating functional transgenic receptor on Jurkat cells, which will be applied for generating CD20-CAR-expressing CD4⁺/CD8⁺ T cells.

Keywords: CD20, chimeric antigen receptor, immunotherapy.

Classification number: 3.2

nuôi trong môi trường RPMI 1640 (Gibco) bổ sung 10% Fetal bovine serum (FBS, Sigma), 100 units/ml penicillin/streptomycin (Sigma). Tế bào được nuôi trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂ và cấy truyền khi mật độ tế bào đạt hơn 90% không gian nuôi cấy.

2.2. Tạo dòng cassette CD20-CAR

Hai trình tự gen mã hóa cho CD20-CAR được thiết kế và đặt tổng hợp nhân tạo từ GENEWIZ: SEQ01 (1902 bp) và SEQ02 (1371 bp), trong đó, trình tự CD20-CAR SEQ01 được tham khảo từ patent số WO 2000023573A2 và trình tự CD20-CAR SEQ02 do nhóm tự thiết kế. Hai trình tự này được đồng hóa vào vector pcDNA3.3 bằng phương pháp TA, sản phẩm nối sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5α và sàng lọc trong môi trường có ampicillin (100 µg/ml). Chọn dòng *E. coli* DH5α mang plasmid mong muốn và tiến hành giải trình tự. Các plasmid có trình tự gen tương đồng 100% với trình tự lý thuyết sẽ được sử dụng cho các bước tiếp theo.

2.3. Chuyển nạp plasmid mã hóa CD20-CAR vào tế bào Jurkat T

Các vector pcDNA3.3 mang cassette CD20-CAR (SEQ01, SEQ02) được chuyển nạp vào tế bào Jurkat T bằng phương pháp điện biến nạp sử dụng thiết bị ECM 630 (BTX). Ủ 4x10⁶ tế bào với 20 µg plasmid DNA trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sốc điện với thông số 260 V, 1100 µF, 800 Ω và cuvette 4 mm. Tế bào sau khi điện biến nạp được nuôi trong môi trường RPMI 1640 bổ sung 10% FBS, penicillin/streptomycin, 37°C, 5% CO₂. Hiệu suất biến nạp được đánh giá thông qua mẫu biến nạp plasmid mang gen biểu hiện GFP bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy.

2.4. Kiểm tra biểu hiện mRNA mã hoá CD20-CAR

Tế bào Jurkat T sau khi được chuyển nạp plasmid CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 sẽ được tách RNA bằng bộ kit (RNA purification kit, Thermo) và kiểm tra bằng phương pháp PCR (PCR Master Mix, Thermo) với 2 cặp mồi được thiết kế trong phạm vi trình tự gen mã hóa cassette CD20-CAR, 5'-ACTGGTTCTTCGATGTCTGGG-3', 5'-GAGGGTGTCTTGGGTTTTG-3' cho SEQ01 và 5'-GCTTCCGCTAATCAGTGCTTC-3', 5'-GATCTTGCTTCTGCTGGAA-3' cho SEQ02.

2.5. Kiểm tra biểu hiện protein CD20-CAR ở tế bào Jurkat T

Mẫu protein được hòa trong dung dịch Laemmli 4X có bổ sung β-mercaptoethanol, đun nóng ở 95°C, 5 phút, sau đó được phân tách trên gel polyacrylamide 10%. Protein từ gel sẽ được chuyển thấm lên màng nitro cellulose (GE). Màng GE lần lượt được khoá trong dung dịch TBST 5% sữa gầy, ủ với kháng thể sơ cấp kháng vùng CD3ζ (Abcam), sau đó ủ với kháng thể kháng IgG thô có gắn HRP (Thermo). Màng sau đó được ủ với cơ chất quang hóa Pierce ECL (Thermo) và đọc tín hiệu với hệ thống ImageQuant LAS 500 (GE). Kháng thể β-actin được sử dụng như chứng nội.

2.6. Kiểm tra biểu hiện protein CD20-CAR trên bề mặt tế bào Jurkat T

Tế bào Jurkat T đã được chuyển cassette CD20-CAR sau 48 giờ được thu nhận, rửa 2 lần với dung dịch PBS, 100 µl dịch huyền phù tế bào (2×10^6 tế bào/ml) được ủ với kháng thể có gắn FITC kháng vùng Fab của CD20-CAR (Sigma) trong điều kiện tránh sáng 30 phút, tế bào sau đó được rửa 3 lần với PBS để loại bỏ kháng thể tự do. Các mẫu tế bào sau khi ủ được phân tích bằng máy FACS Aria III-BD.

2.7. Kiểm tra hoạt động của CD20-CAR biểu hiện trên tế bào Jurkat T

Hoạt động của CD20-CAR trên tế bào Jurkat T được kiểm tra thông qua sự tiết IL-2 của Jurkat T khi tiếp xúc với tế bào Raji B biểu hiện CD20. Sự hiện diện của IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào được xác định bằng phương pháp ELISA sử dụng bộ kit IL-2 Human Elisa Kit (Thermo). Một cách ngắn gọn, 5×10^5 tế bào Jurkat T được điện biến nạp với các trình tự CD20-CAR SEQ01, SEQ02 và được nuôi cấy 48 giờ trong các giếng của đĩa 96 giếng. Các giếng tế bào Jurkat T được bổ sung 5×10^5 tế bào Raji B CD20⁺ và đồng nuôi cấy trong 24 giờ tiếp theo. Dịch nuôi cấy tế bào được ly tâm thu dịch nổi và 50 µl dịch nổi được cho vào mỗi giếng, bổ sung 50 µl kháng thể kháng IL-2, lắc nhẹ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Giếng được rửa và bổ sung 100 µl Streptavidin-HRP, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Giếng được rửa và bổ sung 100 µl dung dịch TMB, ủ trong tối 30 phút, ngừng phản ứng bằng 100 µl dung dịch ngừng phản ứng, đọc tín hiệu ở bước sóng OD 450 và 550 nm.

2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel và xử lý thống kê bằng phương pháp t-test, độ tin cậy 95%. Kết quả được cho là có sự khác biệt về mặt thống kê khi p-value < 0,05.

3. Kết quả

3.1. Thiết kế CD20-CAR

Cấu trúc cơ bản của CD20-CAR bao gồm 4 vùng: (1) Vùng nhận diện kháng nguyên scFV là vùng biến động của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD20 được liên kết với nhau bởi trình tự nối 15 axit amin ((Glyx4 - Ser)x3): VL-linker-VH; (2) Vùng bản lề: (Hinge); (3) Vùng xuyên màng: (TM); (4) Vùng hoạt tính nội bào. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế trình tự CD20-CAR (SEQ02) trong đó có kết hợp thêm một yếu tố đồng kích thích là domain 4-1BB (CD137). Bên cạnh đó, chúng tôi tổng hợp CD20-CAR (SEQ01) dựa trên bản quyền số WO 2000023573A2 như là một trình tự tham khảo đối chiếu. Sự giống và khác nhau giữa 2 trình tự được mô tả ở bảng 1.

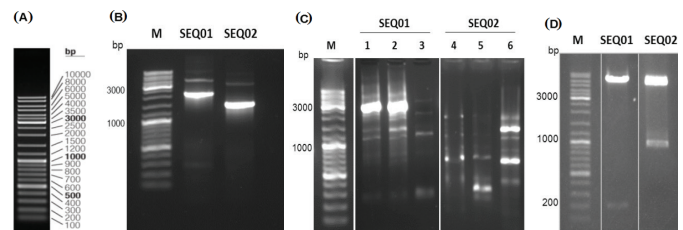
Bảng 1. Bảng so sánh các vùng trình tự của CD20-CAR SEQ01 và SEQ02.

Vùng domain	CD20-CAR-SEQ01 (phiên bản tham khảo đối chiếu)	CD20-CAR-SEQ02 (phiên bản nghiên cứu)
Trình tự tiết (Signal peptide)	Murine antibody CD20 kappa light chain	Kappa light chain of CD20 mAb [6]
Vùng nhận diện kháng nguyên (VLH)	Anti-CD20 Leu-16 hybridoma cell	CD20 mAb plasmid [6]
linker	Glycine-serine (18 aa)*	Glycine-serine (18 aa)*
Vùng bản lề (Hinge)	Human IgG1 Fc domain (Hinge-CH2-CH3)	Human IgG4 Fc domain (short Hinge 12 aa)
Vùng xuyên màng (TM)	CD4	CD28
Vùng hoạt tính nội bào 4-1BB		CD137
Vùng hoạt tính nội bào CD3 zeta chain	CD3 zeta chain (isoform 3)*	CD3 zeta chain (isoform 3)*

*: trình tự giống nhau.

3.2. Tạo dòng cassette CD20-CAR hoàn chỉnh vào vector pcDNA3.3

Sản phẩm PCR trình tự CD20-CAR SEQ01, SEQ02 được tạo dòng vào vector pcDNA3.3 bằng phương pháp TA (hình 1B). Kết quả kiểm tra PCR cho thấy, khuẩn lạc số 1 và 2 có sản phẩm PCR kích thước khoảng 1900 bp, tương ứng với kích thước của CD20-CAR SEQ01; khuẩn lạc số 6 có sản phẩm PCR kích thước khoảng 1400 bp, tương ứng với kích thước của CD20-CAR SEQ02 (hình 1C). Kết quả cắt plasmid thu nhận từ khuẩn lạc số 1 (SEQ01) với cặp enzyme BamHI-XbaI và khuẩn lạc số 6 (SEQ02) với cặp enzyme AgeI-BamHI cho thấy, cả 2 đoạn gen SEQ01 và SEQ02 đều được chèn vào đúng chiều khi cho sản phẩm cắt được 2 vạch có kích thước khoảng 200 và 1100 bp, tương ứng với sản phẩm cắt lý thuyết của cặp enzyme BamHI-XbaI và AgeI-BamHI (hình 1D). Kết quả giải trình tự cho thấy giống với trình tự lý thuyết 100%, như vậy, SEQ01 và SEQ02 (cassette CD20-CAR) đã được tạo dòng thành công vào vector pcDNA3.3.

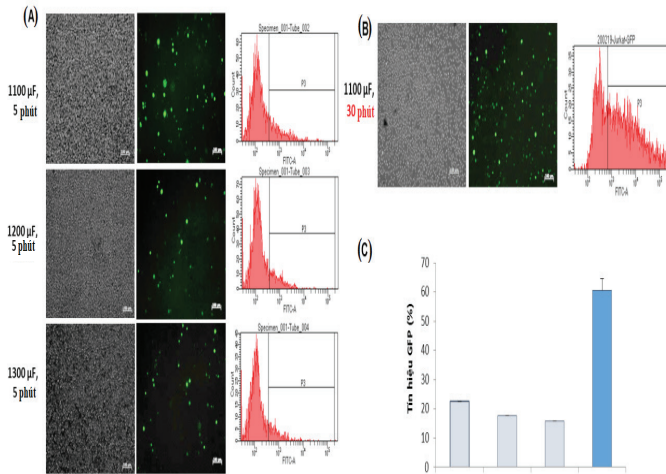


Hình 1. Tạo dòng SEQ01 và SEQ02 vào vector pcDNA3.3. (A) Kích thước thang DNA, #SM0331, Thermo; **(B)** PCR khuếch đại đoạn gen SEQ01, SEQ02; **(C)** PCR khuẩn lạc *E. coli* DH5α được biến nạp với plasmid mang cassette SEQ01, SEQ02; **(D)** Kiểm tra sản phẩm cắt bằng enzyme cắt giới hạn.

3.3. Kết quả điện biến nạp chuyển plasmid CD20-CAR vào tế bào Jurkat T

Phương pháp điện biến nạp được sử dụng trong nghiên cứu này để chuyển plasmid mã hoá CD20-CAR vào tế bào Jurkat T. Để xác định điều kiện biến nạp thích hợp, chúng tôi sử dụng plasmid mã hoá protein GFP. Tế bào Jurkat T được ủ với plasmid DNA mã hoá GFP trong 5 phút trước khi thực hiện điện biến nạp với thông số 260 V, 800 Ω và thay đổi thông số điện dung (F): 1100, 1200 và 1300 µF. Kết quả phân tích FACS cho thấy, hiệu suất chuyển nạp plasmid GFP vào tế bào Jurkat T cao nhất đạt 22,5% tại giá trị điện dung là 1100 µF (hình 2A). Đáng chú ý, khi chúng tôi tăng thời gian ủ từ 5 lên

30 phút thì hiệu suất chuyển nạp tăng lên rõ rệt (đạt 62%) (hình 2B, 2C). Chúng tôi cho rằng, đây là hiệu suất khả quan có thể sử dụng để chuyển nạp CD20-CAR vào tế bào Jurkat T. Theo đó, chúng tôi sử dụng quy trình điện biến nạp với các thông số 260 V, 800 Ω , 1100 μ F và thời gian ủ DNA là 30 phút để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

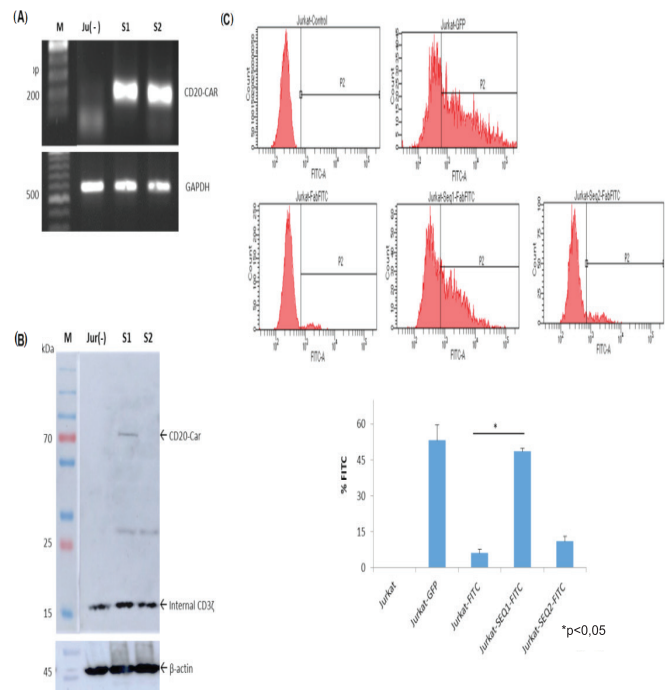


Hình 2. Quy trình điện biến nạp vào tế bào Jurkat T. (A) Quy trình điện biến nạp theo thông số 260 V, 800 Ω , thời gian ủ DNA 5 phút, thay đổi các thông số F tương ứng 1100, 1200 và 1300 μ F; (B) Quy trình điện biến nạp theo thông số 260 V, 800 Ω , 1100 μ F, thời gian ủ DNA 30 phút; (C) Đồ thị so sánh tỷ lệ tín hiệu huỳnh quang GFP của các quy trình.

3.4. Kiểm tra biểu hiện CD20-CAR trong tế bào Jurkat T

48 giờ sau khi biến nạp plasmid mang trình tự SEQ01 và SEQ02, sự biểu hiện của CD20-CAR mức độ mRNA và protein ở tế bào Jurkat T được kiểm tra bằng phương pháp PCR và western-blot. Kết quả phân tích RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu khuếch đại mRNA CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 cho thấy mRNA của 2 trình tự đều được biểu hiện ở tế bào Jurkat T (hình 3A). Tuy nhiên, phân tích western-blot dịch ly giải tế bào Jurkat T được biến nạp plasmid bằng kháng thể kháng vùng CD3 ζ chỉ phát hiện CD20-CAR SEQ01 có biểu hiện protein và không nhận thấy tín hiệu ở mẫu protein của SEQ02. Mặt khác, tín hiệu của CD3 ζ nội sinh và β -actin là như nhau ở 3 mẫu protein tế bào Jurkat T đối chứng và Jurkat T mang plasmid CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 (hình 3B). Như vậy, 2 plasmid CD20-CAR đã được biến nạp thành công vào tế bào Jurkat T và tế bào đã biểu hiện được protein CD20-CAR SEQ01.

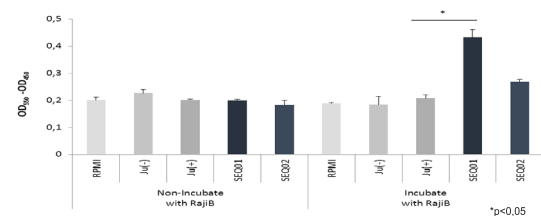
CAR chỉ có thể hoạt động một khi được biểu hiện đúng vị trí trên bề mặt tế bào T. Để xác định protein CD20-CAR có biểu hiện trên bề mặt tế bào Jurkat T hay không, chúng tôi tiến hành nhuộm tế bào đã được biến nạp plasmid mang SEQ01 và SEQ02 với kháng thể có gắn FITC kháng vùng Fab của CD20-CAR và phân tích FACS. Kết quả cho thấy, ở mẫu tế bào Jurkat T mang plasmid SEQ01, tỷ lệ tế bào có tín hiệu FITC cao hơn nhiều so với mẫu đối chứng Jurkat T không chuyển nạp plasmid (đạt khoảng 48%). Với mẫu tế bào Jurkat T mang plasmid SEQ02, tỷ lệ tế bào có tín hiệu FITC tăng nhẹ so với đối chứng (đạt khoảng 15%). Các kết quả này chứng tỏ, CD20-CAR đã được biểu hiện thành công trên bề mặt tế bào Jurkat T, mặc dù mức độ biểu hiện CD20-CAR của phiên bản nghiên cứu SEQ02 thấp hơn phiên bản đối chiếu SEQ01 khoảng 3,5 lần.



Hình 3. Kiểm tra biểu hiện CD20-CAR trong tế bào Jurkat. (A) Kiểm tra biểu hiện ở mức mRNA; (B) Kiểm tra biểu hiện ở mức protein; (C) Kiểm tra biểu hiện CD20-CAR trên bề mặt tế bào Jurkat T. Jurkat: mẫu tế bào đối chứng; Jurkat-GFP: mẫu tế bào đối chứng biến nạp GFP; Jurkat-FITC: mẫu tế bào đối chứng nhuộm bằng kháng thể đánh dấu FITC; Jurkat-SEQ1-FITC và Jurkat-SEQ2-FITC: mẫu tế bào biến nạp SEQ01 và SEQ02 nhuộm bằng kháng thể đánh dấu FITC.

3.5. Đánh giá hoạt tính sinh học của CD20-CAR

Sự liên kết giữa kháng nguyên CD20 và thụ thể đặc hiệu kháng nguyên CD20-CAR biểu hiện trên bề mặt tế bào sẽ kích hoạt các tế bào T này và một trong những dấu hiệu nhận biết đó là tế bào T tăng tiết IL-2. Kết quả đồng nuôi cấy tế bào Jurkat T biểu hiện CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 cùng với tế bào Raji B biểu hiện CD20 cho thấy, lượng IL-2 trong dịch đồng nuôi cấy tế bào Jurkat biểu hiện SEQ01 tăng rõ rệt so với trong dịch đồng nuôi cấy tế bào Jurkat đối chứng không biểu hiện thụ thể. Bên cạnh đó, dịch đồng nuôi cấy của tế bào Jurkat T biểu hiện SEQ02 cũng cho thấy có sự tăng biểu hiện nhẹ của IL-2 so với mẫu đối chứng, tuy lượng IL-2 biểu hiện vẫn thấp hơn so với CD20-CAR ở phiên bản đối chiếu SEQ01 khoảng 2 lần. Như vậy, CD20-CAR có khả năng kích hoạt tế bào Jurkat T thể hiện qua việc tăng tiết IL-2 (hình 4).



Hình 4. Sự tăng tiết IL-2 của tế bào Jurkat T biểu hiện thụ thể CD20-CAR khi được cảm ứng tiếp xúc với tế bào Raji B biểu hiện CD20. RPMI: mẫu môi trường không nuôi cấy tế bào; Ju(-): tế bào Jurkat; Ju(+): tế bào Jurkat T sốc điện; SEQ01 và SEQ02: tế bào Jurkat T biến nạp CD20-CAR SEQ01 và SEQ02.

4. Bàn luận

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu về tế bào T biểu hiện CAR đã đạt được những kết quả quan trọng trong nghiên cứu cơ bản và đặc biệt là trong thử nghiệm lâm sàng. Việc biến đổi hay “huấn luyện” tế bào T giúp chúng có khả năng nhận diện chuyên biệt kháng nguyên ung thư thông qua các CAR đặc hiệu với kháng nguyên ung thư đó, CARs đã cho thấy những kết quả bất ngờ trong hiệu quả điều trị thông qua việc nhận diện kháng nguyên mà không phụ thuộc vào HLA hay phụ thuộc vào phức hợp tương thích mô MHC.

Hiện nay, CAR đã được nghiên cứu đến thế hệ thứ tư, chủ yếu khác nhau về các vùng kích thích nội bào và khả năng tiết cytokines. Các liệu pháp điều trị CAR-T được FDA công nhận hiện tại là dạng CAR-T thế hệ thứ 1 và rất nhiều các liệu pháp CAR-T thế hệ thứ 2 đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng [7-9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế và tạo 2 phiên bản CD20-CAR, trong đó SEQ02 là phiên bản do nhóm tự thiết kế và SEQ01 là phiên bản đối chiếu tham khảo từ trình tự của patent. Ngoài các trình tự giống với CD20-CAR SEQ01 như vùng linker và domain hoạt tính CD3 ζ , CD20-CAR SEQ02 mang vùng scFV là variable từ trình tự của kháng thể kháng CD20 Rituximab đã được công bố [6]. Khác với SEQ01, vùng Hinge của SEQ02 là đoạn ngắn chỉ bao gồm 12 axit amin tham khảo theo công bố của M. Hudecek và cs (2013) [10] cho thấy, các CAR mang vùng Hinge này có hoạt tính cao hơn so với CAR được thiết kế với các vùng Hinge dài hơn. Một điểm khác biệt là ngoài vùng CD3 ζ thì SEQ02 còn mang thêm 1 vùng hoạt tính 4-1BB từ CD137, với mong muốn SEQ02 sẽ có hoạt tính cao hơn so với SEQ01. Hai trình tự này được tạo dòng và chuyển nạp thành công vào tế bào Jurkat T. Phương pháp dùng virus và điện biến nạp thường được sử dụng trong chuyển nạp CAR-T, trong đó, điện biến nạp an toàn và tiết kiệm thời gian hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng hệ thống điện biến nạp BTX ECM 630 và thiết lập được điều kiện điện biến nạp cho tế bào T. Hiệu quả chuyển plasmid mã hoá GFP vào tế bào Jurkat T đạt hơn 60% khi sốc điện với các thông số 260 V, 800 Ω , 1100 μ F và thời gian ủ tế bào với DNA là 30 phút. Với kết quả khả quan này, quy trình có thể ứng dụng cho điện biến nạp plasmid CD20-CAR vào tế bào T tách từ máu sau này. Kết quả biến nạp CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 cho thấy, cả 2 trình tự đều được chuyển thành công vào tế bào Jurkat T và có hoạt tính sinh học thông qua việc tăng lượng IL-2 tiết ra trong dịch nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện và hoạt tính kích thích tế bào Jurkat T của CD20-CAR SEQ02 thấp hơn so với CD20-CAR SEQ01, điều này có thể do trình tự của SEQ02 chưa thật sự tối ưu làm hiệu quả biểu hiện protein CD20-CAR thấp. Cần tiếp tục nghiên cứu để nâng cao hiệu quả biểu hiện của CD20-CAR SEQ02.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết kế và tạo dòng thành công 2 phiên bản CD20-CAR, trong đó SEQ01 có trình tự mã hóa cho CD20-CAR tham khảo từ patent và SEQ02 do nhóm tự thiết kế. Cả 2 phiên bản SEQ01 và SEQ02 được chuyển vào tế bào Jurkat T bằng phương pháp điện biến nạp, trong đó CD20-CAR SEQ01 được biểu hiện thành công trên bề mặt tế bào T và thụ thể dạng khảm này cho thấy có hoạt tính kích hoạt Jurkat T tăng tiết IL-2. Các kết quả trên tế bào Jurkat T là tiền đề cho nghiên cứu tiếp theo thực hiện trên tế bào lympho T thu nhận từ máu người, từng bước hướng đến xây dựng liệu pháp điều trị ung thư bằng tế bào CAR-T.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí sự nghiệp khoa học và công nghệ bởi Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn TP Hồ Chí Minh thông qua đề tài mã số YD01/18-20. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Fesnak, C.H. June, B.L. Levine (2016), “Engineered-T-cells-the-promise-and challenges of cancer immunotherapy”, *Nat. Rev. Cancer*, **16**, pp.566-581.
- [2] J. Hartmann, C.J. Buchholz, A. Bondanza, et al. (2017), “Clinical development of CAR T cells challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts”, *EMBO Mol. Med.*, **9**(9), pp.1183-1197, DOI: 10.1525/emmm.201607485.
- [3] G. Dotti, S. Gottschalk, B. Savoldo, et al. (2014), “Design and development of therapies using CAR-expressing T cells”, *Immunol. Rev.*, **257**(1), pp.107-126, DOI: 10.1111/imr.12131.
- [4] L. Wang, W. Qin, Y.J. Huo, et al. (2020), “Advances in targeted therapy for malignant lymphoma”, *Signal Transduct. Target.*, **5**, DOI: 10.1038/s41392-020-0113-2.
- [5] A. Martyniszyn, A.C. Krah, M.C. Andre, et al. (2017), “CD20-CD19 bispecific CAR T cells for the treatment of B-cell malignancies”, *Hum. Gene Ther.*, **28**(12), pp.1147-1158, DOI: 10.1089/hum.2017.126.
- [6] V.N.T. Thao, L.T.T. Le, C.D.X. Truc, et al. (2018), “Creating and evaluating the leukemia cell death activity of anti-CD20 monoclonal antibody”, *National Conference on Science and Biotechnology*, pp.689-695 (in Vietnamese).
- [7] B.G. Till, M.C. Jensen, J. Wang, et al. (2012), “CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results”, *Blood*, **119**(17), pp.3940-3950, DOI: 10.1182/blood-2011-10-387969.
- [8] H.M. Finney, A.N. Akbar, A.D.G. Lawson (2004), “Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: co-stimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR ζ chain”, *J. Immunol.*, **172**, pp.104-113.
- [9] C. Imai, K. Mihara, M. Andreansky, et al. (2004), “Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia”, *Leukemia*, **18**, pp.676-684, DOI: 10.1038/sj.leu.2403302.
- [10] M. Hudecek, M.T.L. Stanghellini, P.L. Kosasih, et al. (2013), “Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T-cells”, *Clin. Cancer Res.*, **19**(12), pp.3153-3164, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0330.

Điều trị bệnh Crohn ở trẻ em bằng adalimumab sau nhiễm Covid-19 tại Bệnh viện Nhi đồng 2: báo cáo một trường hợp

Hà Văn Thiệu^{1, 2*}, Dương Châu Giang¹, Lê Thị Minh Hồng¹

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bệnh viện Nhi đồng 2, 14 Lý Tự Trọng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 24/12/2021; ngày chuyển phản biện 27/12/2021; ngày nhận phản biện 14/1/2022; ngày chấp nhận đăng 18/1/2022

Tóm tắt:

Đại dịch Covid-19 (SARS-CoV-2) gây hội chứng hô hấp cấp tính nghiêm trọng, có thể dẫn đến phản ứng viêm nghiêm trọng hoặc cơn bão cytokine. Rối loạn chức năng miễn dịch trong bệnh Crohn không được điều trị có thể gia tăng nguy cơ gây phản ứng viêm nghiêm trọng với Covid-19. Ước tính có khoảng 2% trẻ nặng cần nhập viện và tỷ lệ tử vong là khoảng 0,08%. Bệnh Crohn thường xảy ra nhiều nhất ở ruột non và đại tràng. Bệnh có thể ảnh hưởng đến bất kỳ phần nào của đường tiêu hóa (GI), từ miệng đến hậu môn. Bệnh nhân mắc Crohn đang điều trị bằng liệu pháp ức chế miễn dịch có thể tăng nguy cơ nhiễm Covid-19. Ngược lại, liệu pháp ức chế miễn dịch cũng có thể có lợi ích thực sự đến kết quả lâm sàng ở bệnh nhân mắc Covid-19, vì liệu pháp này có thể ngăn chặn không chỉ tình trạng viêm niêm mạc, mà còn ngăn chặn đáp ứng viêm miễn dịch toàn thân, gây ra hội chứng hô hấp cấp tính nghiêm trọng. Liệu pháp adalimumab có thể điều trị hiệu quả cả bệnh Crohn và hội chứng viêm đa cơ quan ở trẻ em có liên quan tạm thời với Covid-19. Tuy nhiên, kế hoạch quản lý và theo dõi bệnh nhân cần được sự đồng thuận hơn nữa vì vẫn phụ thuộc nhiều vào điều trị steroid, adalimumab và các loại thuốc khác. Trong khi đó, trường hợp bệnh nhân Crohn mắc Covid-19 chưa được ghi nhận nhiều trong y văn. Do vậy, trong bài báo này, nhóm tác giả báo cáo một trường hợp bệnh nhi mắc bệnh Crohn được điều trị thành công bằng adalimumab sau khi mắc Covid-19 tại Bệnh viện Nhi đồng 2 từ ngày 7/9/2021 đến 4/11/2021.

Từ khóa: Covid-19, Crohn, IBD, SARS-CoV-2, ức chế miễn dịch.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Mở đầu

Bệnh viêm đường hô hấp cấp do Covid-19 là một bệnh lý nhiễm trùng lây qua đường hô hấp do virus SARS-CoV-2 gây ra, được phát hiện lần đầu tại Vũ Hán, Trung Quốc vào tháng 12/2019 [1]. Phần lớn trẻ em mắc Covid-19 không có hoặc có triệu chứng nhẹ như viêm hô hấp trên hoặc có biểu hiện ở đường tiêu hóa như đau bụng, tiêu chảy, rối loạn tiêu hóa. Ước tính có khoảng 2% trường hợp trẻ chuyển nặng cần nhập viện với tỷ lệ tử vong là 0,08% [2].

Đại dịch Covid-19 đã gây ra nhiều thách thức trong quản lý và chăm sóc các bệnh nhân mắc bệnh mạn tính, trong đó có nhóm bệnh viêm ruột mạn (IBD). IBD bao gồm Crohn và viêm loét đại tràng (VLĐT), là tình trạng viêm mạn tính của đường tiêu hóa với những biểu hiện đa dạng như: đau bụng, tiêu phân máu, sụt cân... [3]. Nguyên nhân gây bệnh đến nay vẫn chưa rõ ràng, nhiều giả thuyết cho rằng bệnh là kết quả của các yếu tố miễn dịch, di truyền và môi trường [4].

Mục tiêu điều trị Crohn và IBD là duy trì lui bệnh lâm sàng, ngăn chặn biến chứng, tối ưu hóa sự phát triển thể chất, bình thường hóa chất lượng cuộc sống, ngăn chặn tổn thương ruột, giữ lành niêm mạc ruột và giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc. Tuy nhiên, quá trình điều trị cũng làm tăng nguy cơ nhiễm trùng cơ hội, do vậy đặt ra câu hỏi về nguy cơ nhiễm Covid-19 nặng trên những bệnh nhân này.

Nhân có 1 trường hợp IBD vào điều trị tại Khoa Tiêu hóa, Bệnh viện Nhi đồng 2 bị nhiễm Covid-19, chúng tôi giới thiệu và bàn luận để cùng rút kinh nghiệm trong quá trình điều trị.

2. Ca lâm sàng

Bé gái 12 tuổi nhập viện trong tình trạng tiêu chảy kéo dài 3 tháng, đi phân có nhầy, lẫn máu đỏ tươi lượng ít (>10 lần/ngày), kèm sốt, đau bụng, sụt 10 kg trong vòng 3 tháng. Tiền căn bản thân và gia đình khỏe mạnh, không dị ứng. Bệnh nhân nhập bệnh viện tuyến dưới 3 đợt trong vòng 3 tháng, được điều trị nhiều loại kháng sinh, truyền máu nhưng bệnh không thuyên giảm nên được chuyển lên Bệnh viện Nhi đồng 2.

Tại Bệnh viện Nhi đồng 2, ghi nhận bệnh nhân có tổng trạng gây, cân nặng 25 kg, chiều cao 150 cm (BMI=11,1), xanh xao, ấn đau khắp bụng, không đề kháng, thăm khám các cơ quan khác chưa ghi nhận bất thường.

Công thức máu lúc nhập viện có bạch cầu (WBC) tăng 19,6 K/ μ l với neutrophil chiếm ưu thế, có thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc với Hb 9,37 g/dl và tiểu cầu (PLT) tăng 554 K/ μ l. Các chỉ số viêm tăng CRP 41,9 mg/l, VS 1 giờ/2 giờ là 25/55 mm. Bệnh nhân có tình trạng giảm albumin máu 17 g/l, protein máu 54 g/l, kết quả pANCA máu dương tính. Xét nghiệm phân có nhiều hồng cầu và WBC, calprotectin phân 673 ng/g. Cây phân không thấy vi trùng và ký sinh trùng hay trứng. Các xét nghiệm sinh hóa khác và xét nghiệm tìm lao cho kết quả âm tính (bảng 1).

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

Treatment of Crohn's disease in children with adalimumab after being infected with SARS-CoV-2 at Children's Hospital No. 2: A case report

Van Thieu Ha^{1,2*}, Chau Giang Duong¹, Thi Minh Hong Le¹

¹Pham Ngoc Thach University of Medicine, 2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Children's Hospital No. 2, 14 Ly Tu Trong Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 24 December 2021; revised 14 January 2022; accepted 18 January 2022

Abstract:

Covid-19 disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), may lead to a severe inflammatory response or cytokine storm. Immune dysfunction in untreated Crohn's disease may augment the risk for a severe inflammatory response to Covid-19. It is estimated that about 2% of severe children need to be hospitalised and the mortality rate is about 0.08%. Crohn's disease most commonly occurs in the small intestine and the colon. It can affect any part of the gastrointestinal (GI) tract, from the mouth to the anus. Crohn's patients on immunosuppressive medical therapy may encounter an increased SARS-CoV-2 infection risk. By contrast, immunosuppressive therapy may also have a potential benefit on clinical outcomes in Covid-19, since it may suppress not only mucosal inflammation but also the severe acute respiratory syndrome SARS-CoV-2-driven systemic inflammatory immune response. Adalimumab therapy can effectively treat both pediatric Crohn's disease and multisystem inflammatory syndrome in children temporally associated with coronavirus disease 2019 infection. However, the management and follow-up plan still needs more consensus because it almost depends on steroids, adalimumab, and other drugs. Covid-19 in patients with Crohn's disease has not been well documented in the literature. Therefore, in this study, the authors reported a case of a pediatric Crohn's disease successfully treated with adalimumab after infected coronavirus 2 at Children's Hospital No. 2 from September 7, 2021 to November 4, 2021.

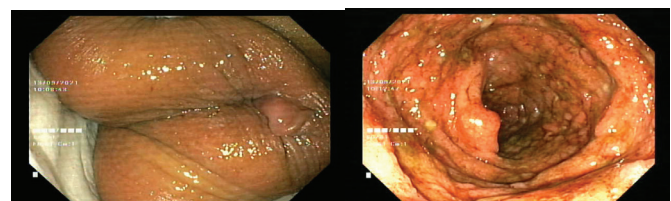
Keywords: Covid-19, Crohn, IBD, immunosuppressive, SARS-CoV-2.

Classification number: 3.2

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm trước và sau điều trị.

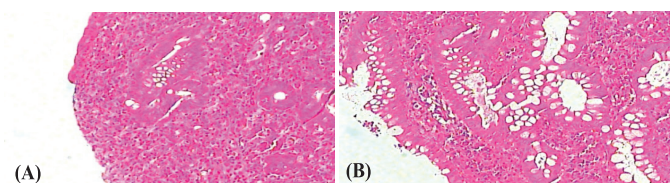
Đặc điểm	Trước điều trị	Sau điều trị
Lâm sàng		
Đau bụng	Đau khắp bụng	Không đau
Số lần đi tiêu	>10 lần/ngày	1 lần/ngày
Tình chất phân	Nhảy máu	Sệt vàng
Cận lâm sàng		
WBC (K/ μ l)	19,6	14,01
Neutrophils (%)	63,1	56,6
Hemoglobin (g/dl)	9,37	12,0
Hct (%)	30,1	39,5
MCV (fl)	76,9	79,5
PLT (K/ μ l)	554	455
Albumin (g/l)	17	37
Protein (g/l)	54	78
CRP (mg/l)	41,9	<1,0
VS 1 giờ/2 giờ (mm)	25/55	20/47
Fe (μ mol/l)	4	18
Ferritin (μ g/l)	9	23
Calprotectin phân (ng/g)	673	N/A

CT scan bụng cho thấy, viêm dày toàn bộ thành đại tràng (đường kính lớn nhất khoảng 12 mm) và dày tá tràng đoạn D2, D3 (đường kính khoảng 9 mm). Kết quả nội soi tiêu hóa trên có viêm dạ dày tá tràng dạng nốt.



Hình 1. Hình ảnh nội soi đại trực tràng thấy mô da thừa hậu môn ở vị trí 12 giờ, tổn thương viêm phù nề, viêm dạng nốt, các ổ loét sâu ở niêm mạc đại tràng.

Trên nội soi đại trực tràng thấy có viêm phù nề toàn bộ niêm mạc đại tràng, có nhiều ổ loét sâu, chạm dễ chảy máu, tổn thương lan qua van hồi manh tràng khoảng 10 cm, hồi tràng có viêm dạng nốt, có da thừa hậu môn ở vị trí 12 giờ, gợi ý bệnh Crohn (hình 1). Kết quả giải phẫu bệnh các mẫu mô ruột sinh thiết khi nội soi là viêm dạ dày tá tràng mạn tính, không có *Helicobacter pylori* và viêm loét hồi tràng, đại trực tràng mạn tính hoạt động (hình 2).



Hình 2. Hình ảnh giải phẫu bệnh (quang trường x100). (A) Hình ảnh viêm ruột, tập trung các tế bào viêm quanh hèm tuyến; (B) Loét niêm mạc ruột, mất tế bào dài.

Qua thăm khám lâm sàng, kết hợp xét nghiệm, kết quả nội soi hướng đến bệnh Crohn mức độ trung bình - nặng (Pediatric Crohn's disease activity index PCDAI 65 điểm), bệnh nhân được bắt đầu điều trị methylprednisolone tĩnh mạch liều 2 mg/kg/ngày trong 2 tuần, sau đó chuyển sang prednisolone uống 40 mg/ngày (1,5 mg/kg/ngày), mesalamine, azathioprine, chế độ ăn EEN (Exclusive enteral nutrition) cùng với kháng sinh tĩnh mạch.

Sau 3 tuần điều trị, bệnh nhân có cải thiện, PCDAI giảm 20 điểm. Tuy nhiên, khi giảm liều prednisolone xuống 1 mg/kg/ngày trong vòng 1 ngày, bệnh nhân xuất hiện tiêu lỏng nhày máu trở lại nên được sử dụng thuốc kháng TNF - adalimumab.

Thời điểm này, bệnh nhân dương tính với SARS-CoV-2, ngưỡng chu kỳ (CT) là 22 sau tiếp xúc với 1 ca nhiễm Covid-19 cùng phòng, hội chẩn khoa tạm hoãn dùng adalimumab.

Trong quá trình cách ly 18 ngày do Covid-19, bệnh nhân không sốt, có ho khan, không suy hô hấp, được tiếp tục điều trị prednisolone uống 40 mg/ngày và azathioprine. Bệnh nhân có 2 lần đi phân sệt vàng có ít máu đỏ tươi, cải thiện sau khi được thêm omeprazole.

Khi có kết quả Covid-19 âm tính và kết thúc cách ly, vào ngày thứ 19 nhiễm Covid-19, bệnh nhân được khởi động điều trị với adalimumab tiêm dưới da liều đầu 80 mg/ngày.

Sau 2 tháng điều trị, bệnh nhân diễn tiến tốt, được xuất viện điều trị ngoại trú và hẹn tái khám mỗi 2 tuần để tiêm adalimumab và đánh giá đáp ứng, nội soi kiểm tra sau 12 tuần điều trị.

3. Bàn luận

Crohn là một thể của IBD có thể dẫn đến những tổn thương ruột tiến triển và những biến chứng, ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống của trẻ. Trường hợp bệnh nhi trong nghiên cứu này đủ tiêu chuẩn chẩn đoán Crohn, gồm: đau bụng, tiêu lỏng, phân máu, VS tăng, albumin máu giảm nhiều, calprotectin/phân tăng cao, nội soi đại trực tràng thấy có viêm phù nề niêm mạc đại tràng, có nhiều ổ loét sâu, chàm dễ chảy máu, hồi tràng có viêm dạng nốt. Mô học: viêm ruột, tập trung các tế bào viêm quanh hèm tuyến, loét niêm mạc ruột, mất tế bào đài. Đối chiếu các triệu chứng Covid-19 của bệnh nhi này, theo phân độ lâm sàng ở trẻ em của Bộ Y tế thì đây là thể nhẹ.

Việc chẩn đoán muộn và điều trị trễ, tình trạng viêm mạn tính ngay cả khi không có triệu chứng sẽ dẫn đến kết cục xấu [5]. Vậy nên, các biện pháp can thiệp sớm và theo dõi tích cực có thể phòng ngừa các biến chứng [6]. Với tính chất mạn tính, kéo dài của Crohn, các điều trị hiện nay nhằm mục đích tạo sự thuyên giảm bệnh trong thời gian ngắn và duy trì sự thuyên giảm này dài hạn. Các chất đang được sử dụng hiện nay trong điều trị Crohn bao gồm mesalazine (5-ASA), steroid, thiopurine (ví dụ, azathioprine và mercaptopurine), methotrexate và các liệu pháp sinh học như kháng yếu tố hoại tử u (anti-TNF), kháng integrin và IL12/23 [7].

Đối với bệnh nhân Crohn trung bình - nặng được khuyến cáo khởi đầu bằng corticosteroids toàn thân để tạo sự lui bệnh, kết hợp với chất ức chế miễn dịch khác có tác dụng chậm hơn là thiopurine để duy trì lui bệnh [7].

Thử nghiệm REACT (phối hợp các ức chế miễn dịch sớm để kiểm soát bệnh Crohn) cho thấy, việc sử dụng sớm các kháng thể đơn dòng (ví dụ adalimumab) kết hợp với thuốc ức chế miễn dịch ở những bệnh nhân có nguy cơ biến chứng cao, so với việc xử trí theo từng

bước thông thường, có tỷ lệ biến chứng và cần nhập viện và/hoặc phẫu thuật ở bệnh nhân CD sớm thấp hơn đáng kể [6]. Tuy nhiên, một nghiên cứu đoàn hệ lớn trên toàn quốc cho thấy, liệu pháp phối hợp có liên quan đến nguy cơ nhiễm trùng nghiêm trọng cao hơn so với đơn trị liệu kháng TNF [8]. Điều này đặt ra mối lo ngại về nguy cơ nhiễm Covid-19 nặng trên bệnh nhân Crohn đang điều trị với các thuốc ức chế miễn dịch.

Mặc dù vậy, thực tế ở những bệnh nhân đang điều trị Crohn với methylprednisolone và azathioprine đã mắc Covid-19 mức độ nhẹ chỉ có triệu chứng ho khan. Điều này cũng được nhận thấy trên 7 ca trẻ mắc Covid-19 và IBD ở 102 trung tâm liên kết với nhóm IBD trẻ em Porto thuộc Hiệp hội Tiêu hóa, Gan mật và Dinh dưỡng Nhi khoa châu Âu (ESPGHAN) tính đến ngày 26/3/2020 [9]. Tất cả các ca này đều nhiễm mức độ nhẹ không cần nhập viện mặc dù đang điều trị với các thuốc ức chế miễn dịch, steroids và/hoặc các thuốc sinh học. Nghiên cứu trên 290 trẻ bị IBD trong thời kỳ đỉnh dịch Covid-19 ở Lombardy từ tháng 2/2020 đến tháng 4/2020, có 24 ca có triệu chứng nghi ngờ Covid-19 và tất cả các ca này đều không có triệu chứng nặng [10]. Tương tự, các quan sát trên những bệnh nhi mắc bệnh gan đang điều trị với ức chế miễn dịch ở miền bắc nước Ý cho thấy, chỉ có 3/700 trường hợp mắc Covid-19 và không có ca nào nặng [11].

Một nghiên cứu lớn hơn, đa trung tâm ở Hà Lan với cỡ mẫu 34.763 bệnh nhân IBD nhận thấy, tỷ lệ mắc Covid-19 ở những bệnh nhân này tương đương dân số chung và 20% các ca này diễn tiến nặng. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng chỉ ra việc có từ 1 bệnh kèm theo là yếu tố nguy cơ độc lập bệnh nhân IBD mắc Covid-19 phải nhập viện (OR=5,08, p<0,001), trong khi việc sử dụng thuốc ức chế miễn dịch và thuốc sinh học không là yếu tố nguy cơ [12]. Việc điều trị corticoid đối với bệnh Crohn của chúng tôi có làm tăng nguy cơ nhiễm Covid-19 hay không cần nghiên cứu tiếp với cỡ mẫu lớn.

Có nhiều cơ chế giải thích cho việc nhiễm Covid-19 nhẹ ở các bệnh nhân này. Bệnh Covid-19 do virus SARS-CoV-2 xâm nhập vào tế bào qua các thụ thể men chuyển angiotensin 2 (ACE2) và gây ra các đáp ứng viêm thông qua các cytokine tiền viêm như interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, ảnh hưởng đến nhiều cơ quan, đặc biệt là phổi [2]. Các nghiên cứu tại Vũ Hán (Trung Quốc) nhận thấy, nồng độ các cytokine và chemokine (ví dụ như IL-6) tăng có liên quan đến độ nặng của bệnh, thông qua cơ chế đáp ứng viêm quá mức do rối loạn điều hòa đáp ứng giai đoạn cấp phụ thuộc IL-6, giảm tế bào T gây độc và NK [13, 14]. Điều này giải thích tại sao ngoài thuốc kháng virus, các phương pháp điều hòa miễn dịch và tạo miễn dịch thụ động có tiềm năng trở thành biện pháp cải thiện dự hậu trên các bệnh nhân mắc Covid-19 nặng [15].

Tháng 5/2020, Tạp chí Tiêu hóa và Dinh dưỡng Nhi khoa đăng một báo cáo ca lâm sàng bệnh nhân Crohn mắc Covid-19 với hội chứng viêm đa cơ quan (MIS-C) [16]. Bệnh nhân này mới được chẩn đoán Crohn không rõ mức độ, mắc Covid-19 với các đáp ứng viêm mạnh, xét nghiệm cytokine có IL-6, IL-8, TNF- α tăng. Bệnh nhân được quyết định điều trị với thuốc kháng TNF- α Infliximab để điều trị Crohn và vai trò có thể trong điều trị cơn bão cytokine do MIS-C liên quan Covid-19. Kết quả bệnh nhân cải thiện ngoạn mục sau liều Infliximab đầu tiên và xuất viện, gợi ý khả năng ức chế cytokine với liệu pháp kháng TNF- α đơn độc [17]. Mặt khác, hiện tại vẫn chưa ghi nhận kết quả bất lợi ở những bệnh nhân IBD mắc Covid-19 điều trị với kháng TNF- α [18]. Tuy nhiên, việc sử dụng liệu pháp này cho

các rối loạn miễn dịch trong Covid-19 kèm IBD hoặc không cần được nghiên cứu thêm.

Hiệp hội Tiêu hóa Anh đưa ra hướng dẫn điều trị IBD trong dịch Covid-19 [19]. Theo đó, khuyến cáo không nên dùng các thuốc đang điều trị bệnh IBD, dựa trên kết quả một nghiên cứu hồi cứu mô tả lớn và nghiên cứu bệnh chứng cho thấy IBD hoạt động có liên quan đến nguy cơ tăng nhiễm trùng, tăng sử dụng steroid, nguy cơ nhập viện và trải qua cuộc mổ lớn [20]. Các thuốc steroid nên được tránh sử dụng nếu có thể và nên giảm liều nhanh, tuy nhiên không nên ngưng đột ngột. Hiện chưa có bằng chứng các thuốc điều hòa miễn dịch khác như azathioprine và kháng TNF (adalimumab, infliximab) làm tăng nguy cơ nhiễm Covid-19.

Bên cạnh đó, Hiệp hội Tiêu hóa Hoa Kỳ (AGA) đưa ra các cập nhật thực hành điều trị IBD khuyến cáo khi bệnh nhân dương tính với Covid-19 và không có triệu chứng, nên giảm liều prednisolone (<20 mg/ngày), có thể chuyển sang budesonide, tạm thời ngừng sử dụng các thuốc thiopurine, methotrexate và kháng TNF (nên hoãn 2 tuần); có thể khởi động lại các thuốc khi hết triệu chứng hoặc xét nghiệm lại Covid-19 âm tính hay đã bước sang giai đoạn miễn dịch của Covid-19 [21]. Tuy nhiên, cũng có các giả thuyết liên quan thuốc kháng TNF có thể sử dụng trong Covid-19 vì tác dụng chống cytokine, phòng ngừa diễn tiến suy hô hấp, mở ra tiềm năng về việc sử dụng thuốc này trong điều trị đồng thời Covid-19 và IBD.

Ảnh hưởng của Covid-19 đối với miễn dịch đường ruột và bệnh nhân IBD vẫn chưa rõ ràng. Đặc biệt, các vấn đề liên quan đến nhiễm SARS-CoV-2, đặc điểm lâm sàng của Covid-19 đối với IBD; ảnh hưởng thực sự của tuổi, giới tính và thuốc ức chế miễn dịch vẫn chưa được hiểu rõ.

Có tác giả nghiên cứu ghi nhận mức TNF- α tăng lên trong cơn bão cytokine do Covid-19 và IBD đang hoạt động. Điều trị bằng Infliximab có hiệu quả với trẻ em mắc bệnh Crohn và nhiễm Covid-19. Vai trò của tác nhân kháng TNF ở bệnh nhân MIS-C tạm thời liên quan đến Covid-19 cần được điều tra thêm.

Trên bệnh nhân của chúng tôi đang có bệnh Crohn mức độ trung bình - nặng, việc ngưng corticosteroid có nguy cơ làm bùng phát đợt viêm ruột. Bệnh nhân có xét nghiệm dương tính với SARS-CoV-2 nhưng chỉ có triệu chứng ho khan, nên có thể xem xét sử dụng azathioprine lại sớm và nhanh chóng khởi động adalimumab sau 2 tuần.

Đây là trường hợp đầu tiên được ghi nhận tại Bệnh viện Nhi đồng 2, việc dùng thuốc kháng TNF (adalimumab) ở thời điểm nào là phù hợp nhất đối với một trẻ bị bệnh Crohn và nhiễm đồng thời Covid-19, chúng tôi chưa có kinh nghiệm nhiều, mặt khác y văn cũng chưa được ghi nhận nhiều và còn nhiều vấn đề chưa được hiểu tường tận. Mỗi liên quan giữa việc sử dụng các thuốc điều hòa miễn dịch trong IBD và độ nặng khi nhiễm Covid-19 nên cần được nghiên cứu thêm.

4. Kết luận

Bệnh nhân Crohn khi giảm liều corticoid có xuất hiện triệu chứng nên được khởi động điều trị sớm với thuốc kháng TNF, cụ thể là adalimumab. Bên cạnh đó, bệnh nhân IBD nên tuân thủ các biện pháp phòng chống dịch nghiêm ngặt, mang khẩu trang, rửa tay và hạn chế đi đến chỗ đông người. Adalimumab có thể điều trị hiệu quả cả bệnh Crohn và nhiễm đồng thời Covid-19. Bệnh nhân IBD khi nhiễm Covid-19 không nên ngưng đột ngột corticoid và xem xét sử dụng sớm thuốc kháng TNF.

Mối liên quan giữa việc sử dụng các thuốc ức chế miễn dịch trong bệnh IBD và tăng nguy cơ nhiễm Covid-19 hoặc độ nặng khi mắc Covid-19 cũng như vai trò của thuốc kháng TNF đối với bệnh Crohn và nhiễm đồng thời Covid-19 cần được nghiên cứu thêm trong thời gian tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Ilaria, C. Pilotto, M. Bonanni, et al. (2020), "SARS-CoV-2 infection in children and newborns: A systematic review", *European Journal of Pediatrics*, **179**(7), pp.1029-1046, DOI: 10.1007/s00431-020-03684-7.
- [2] Y. Koichi, M. Fujiogi, S. Koutsogiannaki (2020), "COVID-19 pathophysiology: A review", *Clinical Immunology (Orlando, Fla)*, **215**, DOI: 10.1016/j.clim.2020.108427.
- [3] K.S. Geme, U. Farooq, M. Haseeb, et al. (2020), *Inflammatory Bowel Disease*, Elsevier, pp.7842-7890.
- [4] M.J. Rosen, A. Dhawan, S.A. Saeed (2015), "Inflammatory bowel disease in children and adolescents", *JAMA Pediatr.*, **169**(11), pp.1053-1060.
- [5] A.M. Schoepfer, M.A. Dehlavi, N. Fournier, et al. (2013), "Diagnostic delay in Crohn's disease is associated with a complicated disease course and increased operation rate", *Am. J. Gastroenterol.*, **108**(11), pp.1744-1753, DOI: 10.1038/ajg.2013.248.
- [6] R. Khanna, B. Bressler, B.G. Levesque, et al. (2015), "Early combined immunosuppression for the management of Crohn's disease (REACT): A cluster randomised controlled trial", *The Lancet*, **386**(10006), pp.1825-1834, DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00068-9.
- [7] T. Joana, B. Stefanos, D. Glen, et al. (2019), "ECCO guidelines on therapeutics in Crohn's disease: Medical treatment", *Journal of Crohn's and Colitis*, **14**(1), pp.4-22, DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjz180.
- [8] J. Kirchgessner, M. Lemaitre, F. Carrat, et al. (2018), "Risk of serious and opportunistic infections associated with treatment of inflammatory bowel diseases", *Gastroenterology*, **155**(2), pp.337-346, DOI: 10.1053/j.gastro.2018.04.012.
- [9] D. Turner, Y. Huang, J.M.D. Carpiet, et al. (2020), "Corona virus disease 2019 and paediatric inflammatory bowel diseases: Global experience and provisional guidance (March 2020) from the Paediatric IBD Porto Group of European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **70**(6), pp.727-733, DOI: 10.1097/MPG.0000000000002729.
- [10] S. Naire, L. Norsa, G. Zuin, et al. (2021), "Children with inflammatory bowel disease in the COVID-19 main endemic focus: The lombardy experience", **9**(183), DOI: 10.3389/fped.2021.607285.
- [11] M. Merli, G. Perricone, A. Lauterio, et al. (2020), "Coronaviruses and immunosuppressed patients: The facts during the third epidemic", *Liver Transpl.*, **26**(11), pp.1543-1544, DOI: 10.1002/lt.25806.
- [12] D. Laap, M.A. Lantinga, D.J. Jong, et al. (2021), "Clinical outcomes of COVID-19 in patients with inflammatory bowel disease: A nationwide cohort study", *J. Crohns. Colitis.*, **15**(4), pp.529-539, DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjaa215.
- [13] D. Sun, H. Li, X.X. Lu, et al. (2020), "Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: A single center's observational study", *World J. Pediatr.*, **16**(3), pp.251-259, DOI: 10.1007/s12519-020-00354-4.
- [14] C. Qin, L. Zhou, Z. Hu, et al. (2020), "Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China", *Clin. Infect. Dis.*, **71**(15), pp.762-768, DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
- [15] H.K. Siddiqi, M.R. Mehra (2020), "COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal", *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, **39**(5), pp.405-407.
- [16] M.T. Dolinger, H. Person, R. Smith, et al. (2020), "Pediatric Crohn disease and multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and COVID-19 treated with infliximab", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **71**(2), pp.153-155, DOI: 10.1097/MPG.0000000000002809.
- [17] M. Feldmann, R.N. Maini, J.N. Woody, et al. (2020), "Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed", *The Lancet*, **395**(10234), pp.1407-1409, DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30858-8.
- [18] E.J. Brenner, R.C. Ungaro, R.B. Geary, et al. (2020), "Corticosteroids, but not TNF antagonists, are associated with adverse COVID-19 outcomes in patients with inflammatory bowel diseases: Results from an international registry", *Gastroenterology*, **159**(2), pp.481-491, DOI: 10.1053/j.gastro.2020.05.032.
- [19] A.K. Nicholas, G.R. Jones, C.A. Lamb, et al. (2020), "British society of gastroenterology guidance for management of inflammatory bowel disease during the COVID-19 pandemic", *Gut*, **69**(6), pp.984-990, DOI: 10.1136/gutjnl-2020-321244.
- [20] G.R. Lichtenstein, B.G. Feagan, R.D. Cohen, et al. (2012), "Serious infection and mortality in patients with Crohn's disease: more than 5 years of follow-up in the TREATTM registry", *Am. J. Gastroenterol.*, **107**(9), pp.1409-1422, DOI: 10.1038/ajg.2012.218.
- [21] D.T. Rubin, J.D. Feuerstein, A.Y. Wang, R.D. Cohen (2020), "AGA clinical practice update on management of inflammatory bowel disease during the COVID-19 pandemic: Expert commentary", *Gastroenterology*, **159**(1), pp.350-357.

Cao chiết Rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) cải thiện hành vi tự kỷ theo cơ chế liên quan đến protein PTEN trên mô hình chuột thực nghiệm gây bởi muối natri valproat

Phạm Thị Nguyệt Hằng^{1*}, Phạm Anh Tùng², Trần Nguyên Hồng¹, Lê Thị Xoan¹,
Nguyễn Thị Lập², Nguyễn Thị Hiền³

¹Khoa Dược lý - Sinh hóa, Viện Dược liệu, 3B Quang Trung, phường Trảng Tiền, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Cao đẳng Y tế Hà Đông, 39 Nguyễn Viết Xuân, phường Quang Trung, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/6/2021; ngày chuyển phản biện 25/6/2021; ngày nhận phản biện 7/7/2021; ngày chấp nhận đăng 12/7/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu tiền đề của các tác giả đã chứng minh được tác dụng cải thiện khiếm khuyết hành vi của cao chiết Rau đắng biển (BME) trên mô hình chuột tự kỷ gây bởi muối natri valproat (VPA). Nghiên cứu này tập trung tìm hiểu thêm về tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh và cơ chế hóa sinh của BME. Chuột nhắt trắng cái mang thai 12-13 ngày được chia ra thành lô sinh lý và lô bệnh lý (tiêm phúc mạc bằng nước muối sinh lý hoặc VPA với liều 500 mg/kg). Lô sinh lý và lô bệnh lý lần lượt là lô chuột con có mẹ được tiêm nước muối sinh lý hoặc tiêm VPA và được uống nước cất trong suốt quá trình nghiên cứu. Lô điều trị gồm chuột con có mẹ được tiêm VPA và chuột mẹ sau khi sinh được uống BME hoặc nước cất cho đến khi con được 13 ngày tuổi. Từ 14 ngày tuổi, chuột con rối loạn tự kỷ được trực tiếp uống BME (50 mg/kg) nước cất trong suốt quá trình thí nghiệm. Các thử nghiệm hành vi (tự chải chuốt và giao tiếp xã hội) được đánh giá vào ngày tuổi thứ 20 và 30. Vào ngày tuổi thứ 40, não chuột được tách ra để đánh giá mức độ biểu hiện của protein PTEN bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả cho thấy, BME liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện tự chải chuốt lại và thiếu hụt hành vi tương tác xã hội trên chuột tự kỷ 20 và 30 ngày tuổi; đồng thời có tác dụng phục hồi sự giảm mức độ biểu hiện của protein PTEN ở vỏ não chuột tự kỷ. Những kết quả này đã chứng minh, BME có tác dụng cải thiện một số hành vi cốt lõi của bệnh tự kỷ thông qua cơ chế liên quan đến phục hồi sự giảm mức độ biểu hiện protein PTEN trong vỏ não chuột tự kỷ thực nghiệm.

Từ khóa: hành vi lặp lại, lo âu, muối natri valproat, rau đắng biển, tương tác cộng đồng, tự kỷ.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Rối loạn phổ tự kỷ (Autism spectrum disorder - ASD, gọi tắt là tự kỷ) là rối loạn phát triển thần kinh, đặc trưng bởi những khiếm khuyết về giao tiếp và tương tác xã hội, đồng thời kèm theo các mẫu hình hành vi, sở thích lặp khuôn, giới hạn. Đặc biệt, rối loạn này thường xuất hiện ở đối tượng nhạy cảm là trẻ nhỏ với tỷ lệ hiện mắc theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) là 1/270 trẻ vào năm 2021 [1]. Ở Việt Nam, số lượng trẻ được chẩn đoán mắc tự kỷ tăng lên theo từng năm do việc thay đổi các tiêu chuẩn chẩn đoán và các yếu tố nguy cơ ngày càng nhiều. Vào năm 2017, tỷ lệ mắc tự kỷ ở Việt Nam là 0,752% [2]. Do đó, ASD đang ngày càng được quan tâm và nghiên cứu sâu hơn về cả nguyên nhân, chẩn đoán và điều trị. Rối loạn này vẫn chưa có thuốc điều trị đặc hiệu. Các thuốc được dùng cho các trường hợp được chẩn đoán ASD chủ yếu là các thuốc điều trị triệu chứng cho các rối loạn đi kèm và hỗ trợ cho các can thiệp chức năng. Các thuốc này chủ yếu thuộc nhóm chống loạn thần không điển hình và được chỉ ra có nhiều tác dụng không mong muốn và biến cố bất lợi hơn là hiệu quả mang lại [3]. Các liệu pháp hiện nay chủ yếu vẫn dựa trên trị liệu giáo dục và hành vi, vừa tốn công sức của gia đình, nhân viên y tế, vừa tốn nhiều chi phí. Vì vậy, ASD đang nhận được nhiều sự quan tâm, hỗ trợ từ cộng đồng.

Cây Rau đắng biển, hay còn gọi là cây ruột gà, rau sam trắng, rau sam đắng, ba kích, là một loại cây leo mọc ở những nơi ẩm ướt và nhiều ánh sáng. Rau đắng biển được phân bố ở khắp các vùng

đồng bằng và trung du ở cả miền Bắc và miền Nam. Loài cây này đã được sử dụng từ rất lâu để điều trị nhiều bệnh, đặc biệt là các bệnh có liên quan đến thần kinh. Trong các văn tự cổ của Ấn Độ, Rau đắng biển được ghi nhận là có tác dụng tăng hiểu biết, học tập và trí nhớ. Trong y học hiện đại, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để chứng minh các tác dụng của loài thảo dược này. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã chứng minh rằng, BME có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và cơ chế tác dụng liên quan đến khả năng bảo vệ, kích thích tăng sinh tế bào thần kinh trên mô hình thiếu máu não cục bộ cũng như mô hình cắt bỏ thùy khứu giác ở chuột nhắt [4, 5]. Trên mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm gây bởi VPA, chúng tôi cũng đã chứng minh BME có tác dụng cải thiện khiếm khuyết hành vi của BME [6]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, chuột tự kỷ được điều trị bằng BME bắt đầu từ ngày tuổi thứ 21 mà không phải là qua sữa mẹ ngay từ khi mới sinh. Thêm vào đó, nhóm nghiên cứu chưa đánh giá cơ chế phân tử tác dụng của BME trên mô hình tự kỷ thực nghiệm. Chính vì vậy, để tìm hiểu thêm về tác dụng và cơ chế tác dụng của BME đối với bệnh ASD là cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tiến hành đánh giá tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh của BME trên mô hình chuột nhắt trắng tự kỷ gây bởi VPA thông qua thử nghiệm đánh giá tương tác xã hội và hành vi lặp lại. Từ đó, bước đầu tìm hiểu cơ chế hóa sinh của BME thông qua đánh giá thay đổi mức độ biểu hiện protein đặc trưng cho ASD trên mô hình chuột nhắt trắng tự kỷ gây bởi VPA sử dụng kỹ thuật Western blot.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyethangpt@nimm.org.vn

Bacopa monnieri extract ameliorates core autistic behavioural deficits of sodium valproate-induced autism spectrum disorder in mice, and its mechanism of action related to PTEN protein

Thi Nguyen Hang Pham^{1*}, Anh Tung Pham², Nguyen Hong Tran¹,
Thi Xoan Le¹, Thi Lap Nguyen², Thi Hien Nguyen³

¹Department of Pharmacology and Biochemistry, National Institute of Medicinal Materials,
3B Quang Trung, Trang Tien Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Pharmacy,

13-15 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam
³Ha Dong Medical College,

39 Nguyen Viet Xuan Street, Quang Trung Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 22 June 2021; revised 7 July 2021; accepted 12 July 2021

Abstract:

Our previous study demonstrated the effect of *Bacopa monnieri* extract (BME) on behavioural deficits in sodium valproate (VPA)-induced autism spectrum disorder in mice. The present study aims to further investigate the effect of BME on neurobehaviors of autism spectrum disorder (ASD) in mice and the biochemical mechanism(s) involved. Female pregnant mice were divided into control and VPA treated groups at 12-13 days of gestation (saline/sodium valproate 500 mg/kg respectively, i.p.). Control group pups of saline-treated mothers received distilled water. The VPA-treated mothers received either distilled water or BME (50 mg/kg, p.o.) after birth until 13 days later. Then, from postnatal day 14, ASD pups were orally treated with BME (50 mg/kg)/distilled water for the duration of the study. Behavioural deficits (repetitive behaviour and social behaviour deficit) were measured by a self-grooming test and a three-chamber test on postnatal days 20 and 30. On postnatal day 40, the cerebral cortex of pups was isolated for evaluation of the expression level of PTEN protein using the Western blot method. The results showed that BME (50 mg/kg, p.o.) significantly improved repetitive behaviour and social behaviour deficits in ASD mice on postnatal day 20 and 30, and also increased PTEN protein expression level in the brain of ASD mice. These results demonstrated that BME ameliorates core behaviours of autism and concurrently restores decreases in PTEN protein expression in the cerebral cortex of valproate-treated mice.

Keywords: anxiety, ASD, *Bacopa monnieri*, self-repetitive behaviour, social interaction, sodium valproate.

Classification number: 3.4

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị BME

Mẫu Rau đắng biển được thu thập tại Thanh Hóa (2019) và được giám định bởi Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. BME được chuẩn bị như những nghiên cứu trước tại Viện Dược liệu [4]. Phần trên mặt đất được liệu Rau đắng biển được sấy khô ở 50°C, sau đó cắt nhỏ và nghiền đến kích thước thích hợp. Bột dược liệu được chiết cách thủy ở 85°C 3 lần bằng ethanol 50%. Dịch chiết ethanol

được gộp lại và lọc qua giấy lọc. Dịch chiết được thu hồi ethanol dưới áp suất giảm và bốc hơi nước. Dịch cô đặc sau đó sẽ được chiết 3 lần với n-butanol. Pha butanol được rửa lại với nước rồi thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Cao được sấy trong tủ sấy chân không ở 50°C để thu được BME có hàm ẩm 4,5%. Hiệu suất chiết là 8,3%. BME sau đó được phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Kết quả thu được cao chứa 21,8% bacoside A và 11,0% bacopaside I [4].

2.2. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng mang thai chủng *Swiss albino* do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Chuột mẹ được nuôi ổn định trong chuồng riêng, điều kiện phòng thí nghiệm nhiệt độ 25±1°C, độ ẩm 65±5%, chu kỳ sáng và tối là 12/12 (bật đèn từ 7:00 đến 19:00 giờ), thức ăn và nước uống được cung cấp đầy đủ. Chuột con sau khi sinh ra được đánh dấu và nuôi cùng chuột mẹ trong 21 ngày đầu, sau đó tách mẹ. Sau khi tách mẹ, chuột con được nuôi theo nhóm (4-6 con/chuồng). Tất cả các thử nghiệm hành vi được tiến hành trong pha sáng từ 9:00 đến 18:00 giờ. Chuột con 40 ngày tuổi được tách lấy não để làm Western blot.

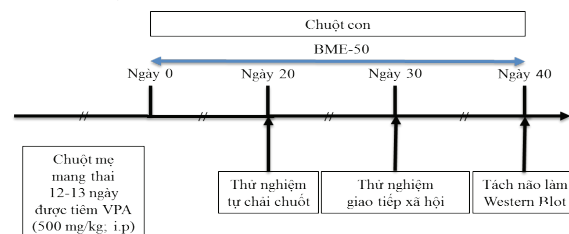
2.3. Phương pháp gây mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm bởi VPA

Áp dụng mô hình gây tự kỷ thực nghiệm trên chuột nhắt trắng bằng VPA [6]. Chuột mang thai 12-13 ngày, được tiêm phúc mạc VPA liều 500 mg/kg thể trọng.

Chuột mẹ được chia 3 lô (2 chuột mẹ/lô): lô 1 (lô chứng sinh lý): chuột mẹ khỏe mạnh và được cho uống nước cất trong vòng 13 ngày đầu sau sinh; lô 2 (lô chứng bệnh lý, ký hiệu VPA): chuột mẹ được tiêm VPA như trên và được cho uống nước cất trong vòng 13 ngày đầu sau sinh; lô 3 (lô điều trị, ký hiệu VPA-BME 50): chuột mẹ được tiêm VPA và được cho uống BME liều 50 mg/kg thể trọng trong vòng 13 ngày đầu sau sinh.

Chuột con sau sinh được chia 3 lô (9-11 con/lô) tương ứng với chuột mẹ: lô 1 (lô chứng sinh, 9 chuột con): con của chuột mẹ khỏe mạnh và được cho uống nước cất từ 14 ngày tuổi đến khi kết thúc quá trình thí nghiệm; lô 2 (lô chứng bệnh lý, VPA, 11 chuột con): con của chuột mẹ được tiêm VPA như trên và được cho uống nước cất từ 14 ngày tuổi đến khi kết thúc quá trình thí nghiệm; lô 3 (lô điều trị, VPA-BME 50, 11 chuột con): con của chuột mẹ được tiêm VPA như trên và được cho uống BME liều 50 mg/kg thể trọng từ 14 ngày tuổi đến khi kết thúc quá trình thí nghiệm.

Quá trình nghiên cứu được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Quy trình thí nghiệm. BME-50: BME liều 50 mg/kg.

2.4. Phương pháp đánh giá tác dụng cải thiện hành vi lặp lại bằng thử nghiệm tự chải chuốt (self-grooming assay)

Thử nghiệm được tiến hành theo nghiên cứu của J.L. Silverman và cs (2010) [7]. Thử nghiệm dựa trên tập tính tự chải chuốt nhằm

duy trì vệ sinh và các quá trình sinh lý quan trọng khác như điều chỉnh nhiệt độ, giao tiếp xã hội và kích thích của các loài gặm nhấm. Hành vi này được quan sát thấy thường xuyên nhất ở động vật gặm nhấm bình thường, mang tính lặp lại. Chuột con 20 ngày tuổi được cho uống nước muối sinh lý hoặc BME liều 50 mg/kg 30 phút trước khi tiến hành thử nghiệm. Chuột con được đặt vào trong một buồng thí nghiệm cách âm, cường độ ánh sáng là 7 lux, trên buồng có một camera. Chuột được tự do khám phá buồng trong 10 phút. Tất cả hoạt động của chuột trong 10 phút được camera ghi lại. Sau 10 phút, chuột được đưa ra ngoài và buồng được vệ sinh bằng ethanol 70% trước khi tiến hành thử nghiệm với các chuột con khác. Sau đó, tổng thời gian chuột chải chuốt (gãi đầu, tai và lông) được phân tích mù bởi 2 nghiên cứu viên một cách độc lập.

2.5. Phương pháp đánh giá tác dụng cải thiện suy giảm tương tác cộng đồng bằng thử nghiệm giao tiếp xã hội (social interaction test)

Thử nghiệm được tiến hành theo nghiên cứu của J.J. Nadler và cs (2004) [8]. Thử nghiệm dựa trên đặc điểm thích dành nhiều thời gian hơn với con cùng loài và tìm hiểu các thử mới hơn là những thử quen thuộc của loài gặm nhấm. Thử nghiệm gồm có 2 pha là làm quen và kiểm tra. Chuột con 30 ngày tuổi được cho uống nước hoặc BME (50 mg/kg) 1 giờ trước khi tiến hành thử nghiệm. Thử nghiệm cần một hệ thống gồm có 3 buồng, 2 buồng hai bên có chứa hộp lưới ở chính giữa, có phiên nhựa để ngăn các buồng khi cần. Cường độ ánh sáng trong buồng là 7-8 lux. Chuột được đặt nhẹ nhàng vào buồng giữa. Trong pha làm quen, chuột được tự do di chuyển khám phá cả 3 buồng trong 5 phút. Sau đó, chuột lại được đưa về buồng giữa trong 1 phút và buồng giữa được ngăn cách với các buồng còn lại bằng tấm nhựa. Trong pha kiểm tra, một chuột khác cùng giới và cùng khối lượng được đưa vào một trong hai hộp lưới. Con chuột cùng giới được đặt trong hộp lưới là chuột được nuôi ở riêng biệt với nhóm chuột thí nghiệm. Các tấm nhựa ngăn được đưa ra ngoài và chuột nghiên cứu lại được tự do khám phá cả 3 buồng trong 10 phút. Toàn bộ hoạt động của chuột được máy quay phim ghi lại. Thời gian chuột vào các buồng và tiếp xúc với các hộp lưới được lưu lại để phân tích bằng phần mềm ANY-maze, Stoeling, Mỹ.

2.6. Phương pháp đánh giá sự thay đổi biểu hiện của protein PTEN ở vùng vỏ não bằng kỹ thuật Western blot

Mức độ biểu hiện của protein PTEN được phân tích bằng kỹ thuật Western blot. Chuột con 40 ngày tuổi sẽ được gây mê để tách lấy não và thu lấy phần vỏ não. Các phần này được bảo quản trong tủ lạnh âm sâu (-86°C) cho đến khi tiến hành thí nghiệm tiếp theo. Quy trình thực hiện được tiến hành theo mô tả của các nghiên cứu trước của chúng tôi [5]. Vỏ não được đồng nhất hóa sử dụng máy nghiền mô Lab gen 125 (Cole-Parmer, Mỹ) trong đệm ly giải, chứa 50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% sodium deoxycholate, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 150 mM NaF, 1,12 µg/ml aprotinin, 20 mM sodium orthovanadate, 10 µg/ml leupeptin, 0,25 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride. Dịch ly giải được ly tâm ở tốc độ 15000 vòng/15 phút/4°C, thu lấy dịch nổi để định lượng protein. Nồng độ protein được xác định bằng bộ kit định lượng protein BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, Mỹ) và máy đọc đĩa ELISA (BioTek, Mỹ). Protein tổng số (15 µg) từ mỗi mẫu vỏ não chuột được được điện di trên gel 12,5% SDS-polyacrylamid (SDS-PAGE) và sau đó được chuyển bằng điện trường lên một màng nitrocellulose (Bio-Rad, Mỹ). Màng được khóa bằng dung dịch skim milk 5% (Sigma-Aldrich, Mỹ)

trong dung dịch đệm Tris chứa 0,1% Tween 20 (TBS-T) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Màng được ủ với kháng thể đơn dòng của chuột kháng protein PTEN (1:500, sc-7974, Santa Cruz Biotechnology, INC., Mỹ), kháng thể đơn dòng của thỏ kháng β -actin (1:6000, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Mỹ) ở 4°C qua đêm. Sau khi được rửa bằng TBS-T, màng được ủ với kháng thể thứ cấp IgG kháng thỏ hoặc chuột liên kết với HRP (DakoCytomation EnVision+System-HRP Labeled Polymer) (Dako Cytomation, Inc., Carpinteria, CA, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phức hệ miễn dịch được nhận biết bởi phương pháp phát quang hóa học tăng cường (GE Healthcare Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) (GE Healthcare, Mỹ) và được chụp lại bằng máy ImageQuant LAS500 (GE Healthcare, Mỹ). Định lượng các băng có phản ứng miễn dịch được phân tích bằng phần mềm ImageJ 1.50i (Wayne Rasband, NIH, Mỹ). Màng được tái sử dụng bằng đệm Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Mỹ).

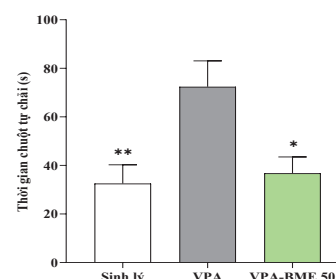
2.7. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0. Số liệu được biểu diễn bằng giá trị trung bình (MEAN) $\pm$ sai số chuẩn (SEM). Dữ liệu của thử nghiệm tự chải chuốt và Western blot được phân tích bằng one-way analysis of variance (ANOVA), theo sau bởi hậu kiểm (Dunnnett 2-sided t test). Dữ liệu của thử nghiệm 3 buồng được phân tích bằng Student's Pair T test. Sự khác biệt giữa các mẫu đạt ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Đánh giá tác dụng cải thiện các hành vi lặp lại bằng thử nghiệm tự chải chuốt

Thử nghiệm tự chải chuốt để đánh giá tác dụng cải thiện hành vi lặp lại trên chuột tự kỷ của BME. Thí nghiệm được thực hiện trên 3 lô (n=9-11 con/lô). Kết quả của thử nghiệm tự chải chuốt để đánh giá tác dụng cải thiện các hành vi lặp lại của BME được thể hiện ở hình 2 cho thấy, ở lô chuột VPA (bệnh lý), tổng thời gian chuột tự chải chuốt trong 10 phút tăng đáng kể so với lô chuột sinh lý. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Tổng thời gian chuột tự chải chuốt trong 10 phút ở nhóm điều trị BME liều 50 mg/kg giảm 1,97 lần so với lô bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

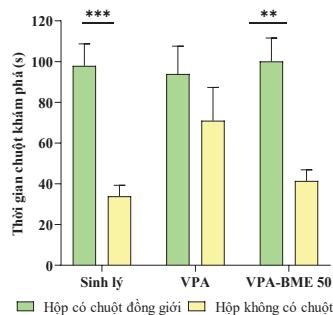


Hình 2. Tác dụng cải thiện hành vi lặp lại của BME. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ so sánh với lô VPA.

3.2. Đánh giá tác dụng cải thiện suy giảm tương tác xã hội của chuột ASD 30 ngày tuổi bằng thử nghiệm giao tiếp xã hội

Thử nghiệm giao tiếp xã hội được thực hiện để đánh giá tác dụng cải thiện thiếu hụt hành vi tương tác xã hội trên chuột tự kỷ của BME. Thí nghiệm được thực hiện trên 3 lô (n=8-10 con/lô). Kết

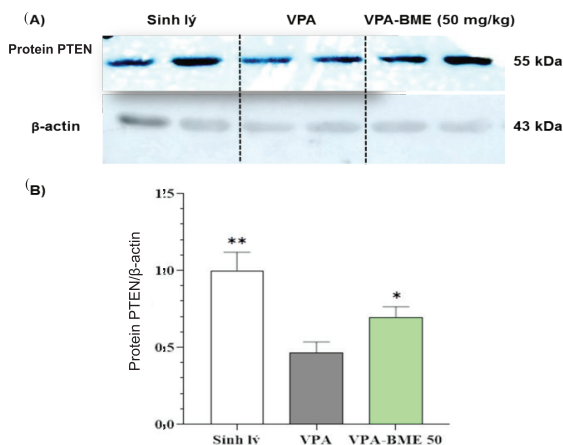
qua được thể hiện ở hình 3 cho thấy, đối với chuột ở lô sinh lý, thời gian chuột khám phá hộp có chuột đồng giới cao hơn đáng kể so với thời gian khám phá hộp không có chuột. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê về thời gian chuột khám phá hộp có chuột đồng giới so với thời gian khám phá hộp không có chuột ở lô bệnh lý. Đối với lô chuột tự kỷ được điều trị bằng BME với liều 50 mg/kg, thời gian chuột khám phá hộp có chuột đồng giới cao hơn gấp 2,39 lần so với thời gian khám phá hộp không có chuột. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.



Hình 3. Tác dụng tăng tương tác xã hội của BME. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ so sánh thời gian khám phá hộp có chuột đồng giới với thời gian khám phá hộp không có chuột của từng lô.

3.3. Đánh giá mức độ biểu hiện của protein PTEN

Để tìm hiểu về cơ chế tác dụng của BME, mức độ biểu hiện của protein PTEN được đánh giá bằng kỹ thuật Western blot. Thí nghiệm được thực hiện trên 3 lô ($n = 5-6$ con/lô).



Hình 4. Mức độ biểu hiện của protein PTEN. (A) Sự biểu hiện của protein PTEN theo cường độ tín hiệu hóa phát quang thu được; (B) Tỷ lệ tín hiệu protein PTEN/β-actin ở các lô chuột. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ so sánh với lô VPA.

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của protein PTEN được thể hiện ở hình 4 cho thấy, mức độ biểu hiện của protein PTEN của lô sinh lý cao gấp 2,14 lần so với lô bệnh lý (sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$). Mức độ biểu hiện của protein PTEN ở lô điều trị bằng BME cao gấp 1,49 lần so với lô bệnh lý (sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). Mặc dù vậy, phục hồi mức độ biểu hiện protein PTEN ở lô điều trị BME vẫn thấp hơn so với lô chứng sinh lý, đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng mô hình chuột nhắt trắng gây tự kỷ thực nghiệm bằng VPA để nghiên cứu tác dụng giảm các triệu chứng ASD của BME. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh BME (50 mg/kg) có tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh cốt lõi của rối loạn phổ tự kỷ trên mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm gây bởi VPA. Việc lựa chọn liều cao chiết BME 50 mg/kg được thiết kế dựa trên các nghiên cứu đã công bố trước đây của chúng tôi [4-6].

Trên thế giới cũng đã có nhiều nghiên cứu về mô hình chuột với các bệnh về thần kinh, đặc biệt là về rối loạn phổ tự kỷ. Để gây được mô hình tự kỷ trên chuột, có thể dùng phương pháp di truyền hoặc hóa chất gây độc. Tuy nhiên, các mô hình gây tự kỷ bằng di truyền yêu cầu những kỹ thuật đặc biệt và cần nhiều kinh phí hơn. Do đó, mô hình gây tự kỷ bằng VPA được ứng dụng nhiều hơn do dễ thực hiện hơn trong các nghiên cứu về ASD [4, 5, 9-14]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã quyết định lựa chọn mô hình chuột nhắt trắng gây tự kỷ thực nghiệm bằng VPA để nghiên cứu tác dụng giảm các triệu chứng ASD của BME. Sau khi đã khắc phục các nhược điểm của mô hình, các kết quả về hành vi và mức độ biểu hiện của protein PTEN trong nghiên cứu này đã cho thấy mô hình tự kỷ gây bởi VPA được xây dựng thành công vì đã có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô sinh lý và bệnh lý.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng cải thiện khả năng tương tác xã hội qua thử nghiệm giao tiếp xã hội của BME. Khiếm khuyết trong khả năng tương tác xã hội là một trong những triệu chứng cốt lõi của ASD. Khiếm khuyết này là một trong những gánh nặng đối với bệnh nhân và có thể dễ dàng quan sát được khi bệnh nhân ở nơi có người lạ. Khả năng tương tác xã hội có liên quan chặt chẽ với mức độ tiếp xúc với người lạ. Ở chuột bình thường, chuột sẽ có xu hướng tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới hơn là hộp không có chuột, do đó, thời gian chuột tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới cao hơn [7]. So sánh sự khác biệt về thời gian tiếp xúc giữa hộp có chuột đồng giới với thời gian tiếp xúc với hộp không có chuột là tiêu chí để đánh giá được khả năng tương tác cộng đồng. Nghiên cứu này cho thấy, chuột sinh lý có thời gian tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới lớn hơn đáng kể so với hộp không có chuột. Trong khi đó, không có sự khác biệt đáng kể, đạt ý nghĩa thống kê về thời gian tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới so với hộp không có chuột ở lô bệnh lý cho thấy khiếm khuyết về tương tác xã hội. Như vậy, mô hình chuột tự kỷ đã được gây thành công. Bên cạnh đó, thời gian tiếp xúc với hộp có chuột đồng giới ở lô được điều trị BME liều 50 mg/kg thể trọng cao hơn đáng kể so với thời gian tiếp xúc với hộp không có chuột. Điều đó cho thấy, BME có tác dụng cải thiện thiếu hụt hành vi tương tác xã hội ở chuột tự kỷ gây bởi VPA. Kết quả này cũng phù hợp với thử nghiệm giao tiếp xã hội của nhóm nghiên cứu trước, cũng trên mô hình chuột tự kỷ gây bởi VPA và được điều trị bằng BME [6].

Nghiên cứu về hành vi lặp lại bằng thử nghiệm tự chải chuốt cho thấy, BME (50 mg/kg) có tác dụng cải thiện các hành vi lặp lại ở chuột tự kỷ gây bởi VPA. Hành vi lặp lại là một trong những triệu chứng cốt lõi và dễ dàng quan sát, nhận biết nhất ở các bệnh nhân tự kỷ. Tần suất lặp lại hành vi có liên quan đến mức độ bệnh. Nghiên cứu này cho thấy, chuột bệnh lý có tổng thời gian tự chải chuốt trong 10 phút cao hơn đáng kể so với chuột sinh lý cho thấy chuột tự kỷ có mức độ lặp lại hành vi cao hơn chuột bình thường. Đã có nhiều nghiên cứu trước đó cũng cho kết quả tương tự [8, 15-17]. Bên cạnh đó, lô chuột được

điều trị bằng BME (50 mg/kg) cũng có tổng thời gian tự chải chuốt ít hơn đáng kể so với lô bệnh lý.

Kết quả bước đầu nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, BME có tác dụng phục hồi sự giảm mức độ biểu hiện của protein PTEN cho thấy BME có tác dụng cải thiện một số hành vi cốt lõi của ASD có thể một phần thông qua cơ chế liên quan đến mức độ biểu hiện của protein PTEN. Các nghiên cứu di truyền và hóa sinh về protein PTEN đã chứng minh vai trò của protein này trong bệnh lý tự kỷ [18-23]. Protein PTEN đóng vai trò quan trọng trong điều hòa chu trình tế bào và tổng hợp protein thông qua con đường PI3K/AKT/mTOR. Trong đó, khi thiếu hụt protein PTEN, đặc biệt ở các tế bào hệ thần kinh trung ương, cấu trúc của tế bào và của mô có thể thay đổi, dẫn đến các triệu chứng của ASD. Do đó, nếu cải thiện được mức độ biểu hiện của protein PTEN, các triệu chứng của tự kỷ cũng có thể được cải thiện. Bằng kỹ thuật Western blot, chúng tôi đã đánh giá mức độ biểu hiện protein PTEN ở não chuột thử nghiệm. Kết quả cho thấy, tỷ lệ protein PTEN/ β -actin ở lô bệnh lý (tiêm VPA) là thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,01$). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó [18-23]. Chuột VPA được điều trị bằng BME liều 50 mg/kg có tỷ lệ protein PTEN/ β -actin cao hơn 1,49 lần so với lô bệnh lý ($p < 0,05$).

Điểm mới của nghiên cứu này là thay vì cho chuột tự kỷ dùng thuốc từ 21 ngày tuổi như nhiều nghiên cứu trước đây, nghiên cứu này đã thay đổi thời điểm bắt đầu điều trị sang cho chuột uống thuốc điều trị ngay từ khi mới sinh. Điều này cũng tương đồng với chứng tự kỷ ở người, khi thời gian phát hiện ra bệnh chủ yếu rơi vào 3 năm đầu đời. Do đó, từ kết quả nghiên cứu trên mô hình chuột của đề tài này có thể rút ra khi tiến tới sử dụng trên người: nếu trẻ có thể dùng thuốc sớm thông qua sữa mẹ thì hiệu quả điều trị có thể được nâng cao hơn. Một điểm mới nữa có thể kể đến ở nghiên cứu này, đó là nghiên cứu đã chứng minh được BME có cải thiện mức độ biểu hiện của protein PTEN trên mô hình chuột nhất trắng gây tự kỷ thực nghiệm bởi VPA. Hiện tại trên thế giới, có một vài nghiên cứu sử dụng protein PTEN là một đích phân tử để đánh giá cơ chế tác dụng của Rau đắng biển. Tại Việt Nam, đây là nghiên cứu đầu tiên được tiến hành để tìm hiểu cơ chế hóa sinh của BME và sử dụng protein PTEN làm tiêu chí đánh giá. Theo hiểu biết của chúng tôi, còn có các đích phân tử khác như protein FOX hoặc SHANK. Tuy nhiên, do thời gian và điều kiện hạn chế của đề tài, chúng tôi hy vọng trong các nghiên cứu kế tiếp sẽ sử dụng các đích phân tử khác liên quan đến ASD để làm sáng tỏ hơn cơ chế cải thiện các khiếm khuyết hành vi thần kinh của Rau đắng biển.

5. Kết luận

Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu này có thể kết luận rằng, BME liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh cốt lõi của rối loạn phổ tự kỷ trên mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm gây bởi VPA một phần thông qua cơ chế tăng cường mức độ biểu hiện protein PTEN trong vỏ não chuột tự kỷ.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.05-2018.319. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] World Health Organization (2021), "Autism", <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>, accessed 20 June 2021.

[2] V.M. Hoang, L.T. Vui, C.T.T. Quynh, et al. (2019), "Prevalence of autism spectrum disorders and their relation to selected socio-demographic factors among children aged 18-30 months in northern Vietnam, 2017", *International Journal of Mental Health Systems*, **13**, pp.29-29.

[3] C. Lord, S. Risi, P.S. DiLavore, et al. (2018), "Autism spectrum disorder", *Lancet*, **392**(10146), pp.508-520.

[4] X.T. Le, P.T.M. Nguyet, N.V. Tai, et al. (2015), "Protective effects of *Bacopa monnieri* on ischemia-induced cognitive deficits in mice: the possible contribution of bacopaside I and underlying mechanism", *Journal of Ethnopharmacology*, **164**, pp.37-45, DOI: 10.1016/j.jep.2015.01.041

[5] H.T.N. Pham, T.N. Hong, N.T. Phuong, et al. (2020), "*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. extract improves memory performance via promotion of neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus of adolescent mice", *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(9), DOI: 10.3390/ijms21093365.

[6] P.T.N. Hang, L.T. Xoan, N.M. Khoi (2015), "Effects of improving autism syndrome of bitter seaweed extract on experimental autism mice model induced by valproate salt", *Journal of Medicinal Materials*, **2015**(4), pp.241-246 (in Vietnamese).

[7] J.L. Silverman, D.G. Smith, S.J.S. Rizzo, et al. (2010), "Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP", *Neuropsychopharmacology*, **35**(4), pp.976-989.

[8] J.J. Nadler, A. Perez, R.P. Barbaro, et al. (2004), "Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice", *Genes, Brain and Behavior*, **3**(5), pp.303-314, DOI: 10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x.

[9] V.B. Junior, L. Rodrigues, G.A. Behr, et al. (2011), "Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters", *Brain Research*, **1408**, pp.8-16.

[10] J.L. Ingram, S.M. Peckham, B. Tisdale, et al. (2000), "Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism", *Neurotoxicology and Teratology*, **22**(3), pp.319-324.

[11] K. Miyazaki, N. Narita, M. Narita (2005), "Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: Implication for pathogenesis of autism", *International Journal of Developmental Neuroscience*, **23**(2-3), pp.287-297.

[12] P.M. Rodier, Patricia (1997), "Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism", *Reproductive Toxicology*, **11**(2), pp.417-422.

[13] T. Sandhya, J. Sowjanya, B. Veeresh (2012), "*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. ameliorates behavioral alterations and oxidative markers in sodium valproate-induced autism in rats", *Neurochemical Research*, **37**(5), pp.1121-1131.

[14] G.C. Wagner, K.R. Reuhl, M. Cheh, et al. (2006), "A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate", *Journal of Autism and Developmental Disorders*, **36**(6), pp.779-793, DOI: 10.1007/s10803-006-0117-y.

[15] A.V. Kalueff, A.M. Stewart, J.H. Fentress (2016), "Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience", *Nature Reviews Neuroscience*, **17**(1), pp.45-59.

[16] H.G. McFarlane, G.K. Kusek, M. Yang, et al. (2008), "Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice", *Genes, Brain and Behavior*, **7**(2), pp.152-163, DOI: 10.1111/j.1601-183X.2007.00330.x.

[17] M. Yang, V. Zhodzishsky, J.N. Crawley (2007), "Social deficits in BTBR T+tf/J mice are unchanged by cross-fostering with C57BL/6J mothers", *International Journal of Developmental Neuroscience*, **25**(8), pp.515-521.

[18] C.H. Kwon, X. Zhu, L. Zhang, et al. (2006), "PTEN regulates neuronal arborization and social interaction in mice", *Neuron*, **50**(3), pp.377-388, DOI: 10.1016/j.neuron.2006.03.023.

[19] C.H. Kwon, X. Zhu, L. Zhang et al. (2003), "mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo", *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **100**(22), pp.12923-12928.

[20] U. Mahmood, S. Ahn, E.J. Yang, et al. (2018), "Dendritic spine anomalies and PTEN alterations in a mouse model of VPA-induced autism spectrum disorder", *Pharmacological Research*, **128**, pp.110-121.

[21] J. Sealy, I.P. Glovinsky (2016), "Strengthening the reflective functioning capacities of parents who have a child with a neurodevelopmental disability through a brief, relationship-focused intervention", *Infant Mental Health Journal*, **37**(2), pp.115-124.

[22] A.K. Tilot, T.W. Frazier, C. Eng (2015), "Balancing proliferation and connectivity in PTEN-associated autism spectrum disorder", *Neurotherapeutics*, **12**(3), pp.609-619.

[23] J. Zhou, K. Blundell, S. Ogawa, et al. (2009), "Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice", *The Journal of Neuroscience*, **29**(6), pp.1773-1783, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5685-08.2009.

Tối ưu hóa quy trình phun sấy hỗn dịch nano curcumin

Phạm Đình Duy*, Trần Quốc Thanh, Nguyễn Hoàng Tùng

Khoa Dược, Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh, 217 Hồng Bàng, phường 11, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/6/2021; ngày chuyển phân biên 21/6/2021; ngày nhận phân biên 29/7/2021; ngày chấp nhận đăng 14/8/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tối ưu hóa quy trình phun sấy hỗn dịch chứa nano curcumin. Phương pháp nghiên cứu: thiết kế mô hình I-Optimal bằng phần mềm Design Expert, gồm 22 thực nghiệm với các biến độc lập: nhiệt độ đầu vào (°C), tốc độ bơm (ml/phút) và tỷ lệ giá mang; các biến phụ thuộc được khảo sát như kích thước tiểu phân sau phân tán (nm), chỉ số đa phân tán, thời gian phân tán (giây) và hiệu suất phun sấy. Các thông số của quy trình tối ưu được kiểm chứng bằng thực nghiệm và khảo sát một số chỉ tiêu chất lượng. Đồng thời, các đặc tính của curcumin trong sản phẩm bột phun sấy được nghiên cứu bằng nhiễu xạ tia X, phân tích nhiệt quét vi sai và phân tích phổ hồng ngoại. Kết quả cho thấy, phần mềm Design Expert đã chỉ ra các thông số tối ưu của quy trình bao gồm nhiệt độ đầu vào 140°C, tốc độ bơm 5 ml/phút, tỷ lệ giá mang 2:1. Quy trình phun sấy sử dụng các giá trị tối ưu trên cho sản phẩm nano curcumin có các tính chất phù hợp với dự đoán của phần mềm. Sự so sánh phổ nhiễu xạ tia X của curcumin và bột nano curcumin cho thấy curcumin trong bột tồn tại ở dạng vô định hình. Phân tích giản đồ nhiệt vi sai của curcumin và bột nano curcumin cùng phân tích phổ hồng ngoại cho thấy có thể có sự tương tác giữa curcumin, chitosan và lipoid S100. Kết luận: quy trình phun sấy hỗn dịch nano curcumin đã được tối ưu hoá ở quy mô phòng thí nghiệm. Đây là nền tảng cho việc tiến tới sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Từ khóa: nano curcumin, phun sấy, thiết kế thực nghiệm.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Curcumin là một hợp chất tự nhiên có nhiều đặc tính sinh học quan trọng. Tuy nhiên, curcumin thuộc nhóm IV theo hệ thống phân loại sinh dược học với sinh khả dụng đường uống kém. Để giải quyết vấn đề này, hệ tiểu phân hỗn dịch nano curcumin là phương pháp bào chế hiệu quả giúp tăng độ tan và tốc độ hòa tan của curcumin, hướng tới cải thiện sinh khả dụng đường uống. Mặc dù vậy, hệ tiểu phân nano curcumin ở dạng hỗn dịch thường không bền theo thời gian và khó bảo quản [1].

Sấy phun là kỹ thuật đơn giản, nhanh chóng và được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp hóa chất, thực phẩm và dược phẩm. Đồng thời, chi phí cho thiết bị và sản xuất bằng phương pháp sấy phun cũng thấp hơn so với các công nghệ sấy khác, chẳng hạn như sấy đông khô [2]. Do đó, phương pháp sấy phun có thể được sử dụng để hóa rắn hỗn dịch nano curcumin, giúp thuận tiện hơn trong việc bảo quản. Trong khi đó, các nghiên cứu về tiểu phân nano curcumin tại nước ta những năm gần đây đều chú trọng vấn đề tăng sinh khả dụng đường uống của dược chất mà chưa đánh giá tính ổn định của chế phẩm trong quá trình bảo quản [3, 4]. Xuất phát từ những lý do trên, đề tài này được thực hiện nhằm xác định điều kiện tối ưu của quá trình phun sấy hỗn dịch nano curcumin để thu hồi lượng sản phẩm cao nhất và ít làm thay đổi tính chất tiểu phân nano curcumin nhất.

*Tác giả liên hệ: Email: pdduy@ump.edu.vn; duyphamding1981@gmail.com

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Curcumin đạt tiêu chuẩn USP 36 (Ấn Độ); chitosan trọng lượng phân tử thấp, 75-85% deacetyl hoá, 50000-190000 Da (Sigma Aldrich, Mỹ), lipoid S100 (Lipoid GmbH, Đức), acid acetic băng (Merck, Đức), maltodextrin (Roquette GmbH, Đức), poloxamer 407 (BASF, Đức) đạt tiêu chuẩn cơ sở; curcumin chuẩn (Việt Nam), ethanol tuyệt đối, nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V. Phần mềm Design Expert® trial phiên bản 11.0.4.0 (Stat - Ease, Inc., Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế và tối ưu hóa quy trình phun sấy nano curcumin: quá trình pha chế hỗn dịch nano curcumin được thực hiện dựa trên phương pháp của F. Sonvico và cs (2006) [5]. Tuy nhiên, trong quá trình pha chế có một số thay đổi để phù hợp với việc tải curcumin và làm cho hỗn dịch bền vững hơn trong thời gian phun sấy.

- Pha chế hỗn dịch nano curcumin: phân tán 0,05 g chitosan vào 30 ml nước cất 2 lần, khuấy đều, thêm 0,1 ml acid acetic băng, khuấy cho chitosan tan hết (dung dịch trở nên trong suốt) (1). Hòa tan 1,5 g poloxamer 407 vào 400 ml nước cất 2 lần trong môi trường lạnh. Khi poloxamer 407 tan hết, thêm (1) vào và thêm nước cất 2 lần vừa đủ, khuấy từ từ, thu được pha nước (2). Hòa tan 0,75 g lipoid S100 vào 30 ml ethanol tuyệt đối. Thêm từ từ 0,16 g curcumin, khuấy tan. Bổ sung ethanol

Optimisation of spray drying process parameters of curcumin nanosuspension

Dinh Duy Pham*, Quoc Thanh Tran,
Hoang Tung Nguyen

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,
217 Hong Bang Street, Ward 11, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 15 June 2021; revised 29 July 2021; accepted 14 August 2021

Abstract:

The aim of this study was to optimise spray drying process parameters of curcumin nanosuspension. Method: an I-Optimal experimental model was designed by Design Expert software including 22 experiments. The independent variables were inlet temperature (°C), pump speed (ml/minute) and weight ratio of curcumin-loaded nanoparticles and carrier and nanoparticle; the dependent variables were particle size after redispersing (nm), polydispersity index, dispersion time (second) and spray drying yield. After the optimal parameters had been verified by experiments, some quality requirements of spray-dried powders were evaluated. Then the physical and chemical properties of curcumin in spray-dried powders were studied by X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). Results: the optimal parameters were established with the inlet temperature of 140°C, the pump speed of 5 ml/minute, the weight ratio of carrier and nanoparticle of 2:1. The obtained results of verification experiments were highly repeatable and were similar to the predicted ones from the software. The comparison of XRD spectra between curcumin crystal and spray-dried powders showed that curcumin in spray-dried powders existed in amorphous form. Furthermore, DSC patterns and FT-IR spectra of curcumin crystal and spray-dried powder demonstrated that there were interactions among curcumin, chitosan and lipoid S100. Conclusion: nano curcumin powders have met the quality requirements of preparation in laboratory-scale. This is a platform for further research later and eventually put into industrial-scale production.

Keywords: curcumin nanoparticles, experimental design, spray drying.

Classification number: 3.4

vừa đủ thu được pha còn (3). Bơm (3) vào (2) trong môi trường lạnh với tốc độ bơm 3 ml/phút, tốc độ khuấy 800-1000 vòng/phút, thu được hỗn dịch nano curcumin.

- Khảo sát kích thước và chỉ số đa phân tán (PDI) của tiểu phân nano curcumin: pha loãng hỗn dịch nano curcumin 10 lần với nước cất 2 lần đã được lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành đo kích thước tiểu phân và PDI bằng máy ZetaPals (Brookhaven Instruments Corporation, Mỹ) ở nhiệt độ 25°C, góc đo 90°, độ dài sóng 660 nm.

- Hình dạng tiểu phân: khoảng 5 µl hỗn dịch nano curcumin được nhỏ lên miếng lưới đồng 200 mesh, đường kính 3 mm và để khô tự nhiên trên miếng lưới đồng trong máy hút ẩm ở nhiệt độ phòng 25°C. Hình ảnh tiểu phân được chụp bằng máy JEOL (JEM-1400) hoạt động dưới điện thế 100 kV.

- Phun sấy nano curcumin: thêm maltodextrin vào hỗn dịch nano curcumin với tỷ lệ phù hợp (tỷ lệ được thay đổi để tìm giá trị tối ưu), khuấy từ từ đến khi tan hoàn toàn. Quá trình phun sấy được tiến hành với các thông số: tần suất thổi khí 20 Hz, áp suất phun 0,18 MPa. Các thông số bao gồm nhiệt độ đầu vào và tốc độ bơm dịch được thay đổi để tìm thông số tối ưu. Hỗn dịch nano được khuấy từ từ liên tục trong thời gian phun sấy. Bột phun sấy được thu hồi trên cả cyclon và bộ phận thu mẫu. Bột thành phẩm được đựng trong túi zip kín, bảo quản ở điều kiện khô ráo và tránh ánh sáng.

- Xác định hiệu suất phun sấy: cân sản phẩm bột phun sấy và tính hiệu suất theo công thức:

$$\text{Hiệu suất} = \frac{\text{Khối lượng thực tế}}{\text{Khối lượng lý thuyết}}$$

- Kích thước tiểu phân nano và PDI khi tái phân tán trong nước cất: tùy vào tỷ lệ giá mang/hàm lượng chất rắn trong hỗn dịch nano mà cân lượng bột phun sấy sao cho sau khi phân tán vào 50 ml nước cất thu được nồng độ curcumin tương tự nồng độ curcumin trong hỗn dịch nano curcumin trước khi phun sấy. Tiếp tục pha loãng 10 lần với nước cất 2 lần đã được lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành đo kích thước tiểu phân và PDI bằng máy ZetaPals (Brookhaven Instruments Corporation, Mỹ) với các thông số máy bao gồm nhiệt độ 25°C, góc đo 90°, độ dài sóng 660 nm.

- Thời gian tái phân tán trong nước cất: cân 0,1 g bột phun sấy, cho vào cốc có sẵn 50 ml nước cất, khuấy từ ở tốc độ 700 vòng/phút. Đánh giá bằng cảm quan và ghi nhận thời gian bột phun sấy phân tán hoàn toàn trong nước.

- Thiết kế mô hình thực nghiệm: mô hình I-Optimal được thiết kế bằng phần mềm Design-Expert phiên bản trial 11.0.4.0 gồm 22 công thức. Các biến số độc lập quan trọng ảnh hưởng đến quy trình phun sấy được thiết lập bao gồm: nhiệt độ khí vào (°C), tốc độ bơm mẫu (ml/phút), tỷ lệ giá mang. Các biến phụ thuộc được chọn khảo sát để tối ưu hóa các biến độc lập bao gồm kích thước tiểu phân sau khi tái phân tán (nm) (R1), PDI (R2), thời gian tái phân tán bột phun sấy trong nước (giây) (R3), hiệu suất phun sấy (R4).

- Tối ưu hóa: việc xem xét sự có ý nghĩa về mặt thống kê của các yếu tố bằng phân tích phương sai thông qua việc so sánh giá trị p cũng như giá trị độ chính xác thích hợp (Adequate precision), đây là tỷ lệ giữa tín hiệu và nhiễu. Giá trị độ chính xác thích hợp so sánh khoảng các giá trị dự đoán tại các điểm thiết kế với sai số dự đoán trung bình. Giá trị này lớn hơn 4 cho thấy mô hình có khả năng dự đoán thích hợp. Việc lựa chọn công thức tối ưu dựa vào chỉ số mong muốn được gợi ý từ phần mềm Design-Expert, chỉ số này càng cao thì các giá trị dự đoán càng có khả năng sát với giá trị thực tế nhất.

Nghiên cứu tính chất của curcumin trong thành phẩm bột phun sấy:

- Phân tích phổ nhiễu xạ tia X: mẫu phân tích nhiễu xạ tia X được cho vào máy D8-ADVANCE (Bruker Corporation, Mỹ), với điện áp gia tốc 40 kV, cường độ dòng 40 mA, bức xạ Cu-K α (dùng tấm lọc Ni), tốc độ quét 0,01°/2 θ /0,2 giây. Sử dụng khoảng 1 g mẫu để phân tích sau khi nghiền thành mẫu bột, cho mẫu vào khay và cho vào máy phân tích. Phổ nhiễu xạ tia X được chạy cho mỗi mẫu với dải góc từ 3°2 θ đến 50°2 θ .

- Phân tích giản đồ nhiệt vi sai: sử dụng khoảng 1 mg mẫu để phân tích bằng máy phân tích nhiệt Q20 (TA Instruments, Mỹ), chương trình nhiệt 30-350°C, cân bằng nhiệt ở 30°C, tốc độ nhiệt thay đổi 10°C/phút.

- Phân tích phổ hồng ngoại FT-IR: lấy khoảng 10 mg mẫu phân tích, nghiền mịn và trộn đều với KBr, ép thành viên mỏng và tiến hành đo phổ hồng ngoại bằng máy Tensor 27 (Bruker Optics, Đức) ở nhiệt độ phòng, số sóng 4000-400 cm⁻¹.

3. Kết quả và bàn luận

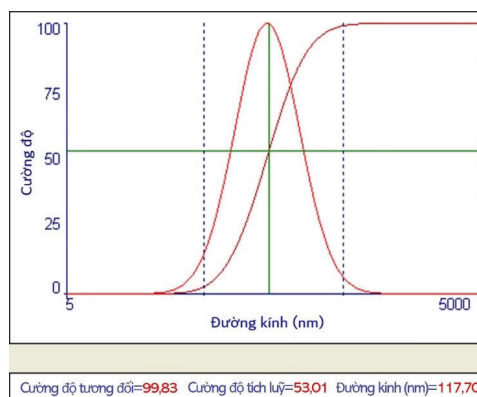
3.1. Kết quả khảo sát kích thước tiểu phân và PDI của tiểu phân nano curcumin

Kích thước tiểu phân và PDI của 3 lô hỗn dịch nano curcumin trước khi tiến hành phun sấy được thể hiện ở bảng 1. Đồng thời, đồ thị phân bố kích thước tiểu phân của hỗn dịch được thể hiện ở hình 1.

Bảng 1. Kích thước tiểu phân và PDI của tiểu phân nano curcumin.

Mẫu	Kích thước tiểu phân (nm)	PDI
1	117,7	0,544
2	114,8	0,274
3	132,1	0,417
Trung bình	121,5±7,04	0,412±0,092

Tương đồng với kỹ thuật bào chế tiểu phân nano tự kết tạo ở nghiên cứu này, Chen và cs (2016) [6] đã nghiên cứu hệ micelle polymer tự tạo mang curcumin sử dụng chitosan, lecithin và pluronic P123. Theo đó, công thức tối ưu cho kích thước tiểu phân <200 nm và sinh khả dụng dùng đường uống của hệ micelle này tăng 3-5 lần so với curcumin tự do.



Hình 1. Đồ thị phân bố kích thước tiểu phân.

3.2. Kết quả thiết kế và tối ưu hóa quy trình phun sấy nano curcumin

Dựa trên sự thay đổi tỷ lệ giá mang và các thông số của quy trình phun sấy, phần mềm Design-Expert đã được sử dụng để thiết kế mô hình thực nghiệm I-Optimal gồm 22 công thức được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Dữ liệu thực nghiệm của mô hình thiết kế I-Optimal.

Công thức	A	B	C	R1 (n=3)	R2 (n=3)	R3 (n=3)	R4 (n=3)
1	160	15	2:1	162,9±5,4	0,343±0,058	445±22	0,26±0,03
2	150	10	2:1	160,2±9,6	0,299±0,025	480±5	0,43±0,05
3	160	15	1,5:1	152,8±7,9	0,359±0,036	515±15	0,23±0,06
4	150	15	1,5:1	162,7±6,1	0,377±0,062	510±7	0,24±0,05
5	160	5	2:1	206,6±8,2	0,281±0,065	615±8	0,62±0,09
6	150	10	1,5:1	148,3±2,5	0,339±0,082	570±20	0,44±0,13
7	140	15	2:1	170,2±6,3	0,349±0,074	425±15	0,19±0,06
8	150	5	2:1	159,7±5,9	0,258±0,063	510±38	0,54±0,14
9	160	5	1,5:1	146,5±7,3	0,298±0,067	525±14	0,56±0,17
10	160	5	1:1	188,5±4,5	0,269±0,059	690±7	0,58±0,04
11	150	5	1,5:1	140,4±4,1	0,276±0,078	630±9	0,55±0,10
12	140	10	1,5:1	149,3±0,3	0,324±0,069	530±13	0,37±0,05
13	160	10	1,5:1	152,6±3,9	0,388±0,09	610±25	0,40±0,18
14	140	5	1:1	162,6±8,0	0,295±0,03	540±27	0,59±0,14
15	150	5	1:1	163,5±2,1	0,374±0,051	570±31	0,53±0,10
16	140	15	1:1	188,8±0,2	0,369±0,057	590±51	0,30±0,05
17	140	10	2:1	159,9±5,6	0,289±0,05	440±29	0,33±0,13
18	160	10	1:1	178,6±2,1	0,273±0,008	560±6	0,47±0,14
19	140	15	1,5:1	155,9±6,1	0,348±0,022	480±44	0,25±0,01
20	140	5	2:1	149,7±0,2	0,281±0,035	450±6	0,49±0,11
21	150	15	1:1	180,6±3,4	0,322±0,033	605±42	0,38±0,07
22	140	10	1:1	174,8±1,2	0,283±0,016	580±13	0,48±0,11

A: nhiệt độ khí vào (°C); B: tốc độ bơm mẫu (ml/phút); C: tỷ lệ giá mang; R1: kích thước tiểu phân sau khi tái phân tán (nm); R2: PDI; R3: thời gian tái phân tán bột phun sấy trong nước (giây); R4: hiệu suất phun sấy.

Từ dữ liệu thực nghiệm thu được (bảng 2), tiến hành phân tích phương sai nhằm xác nhận ý nghĩa thống kê của mô hình phân tích (bảng 3). Xác định p-value, R^2 hiệu chỉnh, R^2 dự đoán và độ chính xác thích hợp.

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai các yếu tố R1, R2, R3, R4.

Yếu tố	R1	R2	R3	R4
Tổng bình phương	2754,87	0,0188	45123,7	0,3029
Độ tự do	4	4	4	4
Độ lệch chuẩn	4,02	0,0156	23,26	0,0373
F-value	42,6	19,25	20,85	54,35
p-value	Model	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	A		0,0349	
	B	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	C	<0,0001	0,076	<0,0001
R^2	0,9241	0,8461	0,8652	0,9315
R^2 hiệu chỉnh	0,9024	0,8022	0,8237	0,9143
R^2 dự đoán	0,8598	0,7127	0,7494	0,8794
Độ chính xác thích hợp	20,1224	11,3007	12,3926	19,4552

Kết quả phân tích phương sai (bảng 3) cho thấy, giá trị p-value của 4 mô hình tổng thể đều <0,05 cho thấy rằng các mô hình có ý nghĩa. Giá trị độ chính xác thích hợp được đo bằng tỷ lệ giữa “tín hiệu” và “nhiều”, có giá trị >4 được cho là phù hợp. Sự chênh lệch của các giá trị R^2 hiệu chỉnh và R^2 dự đoán đều <0,2. Từ đó cho thấy, các mô hình này có thể sử dụng để điều hướng không gian thiết kế.

3.3. Sự ảnh hưởng của biến độc lập lên biến phụ thuộc

Xu hướng và mức độ ảnh hưởng của các biến độc lập lên từng biến phụ thuộc được thể hiện trong hình 2. Mỗi biến phụ thuộc bị ảnh hưởng bởi từng biến độc lập riêng biệt. Trong đó, tỷ lệ giá mang có ảnh hưởng đến cả 4 biến đầu ra của thiết kế thực nghiệm.

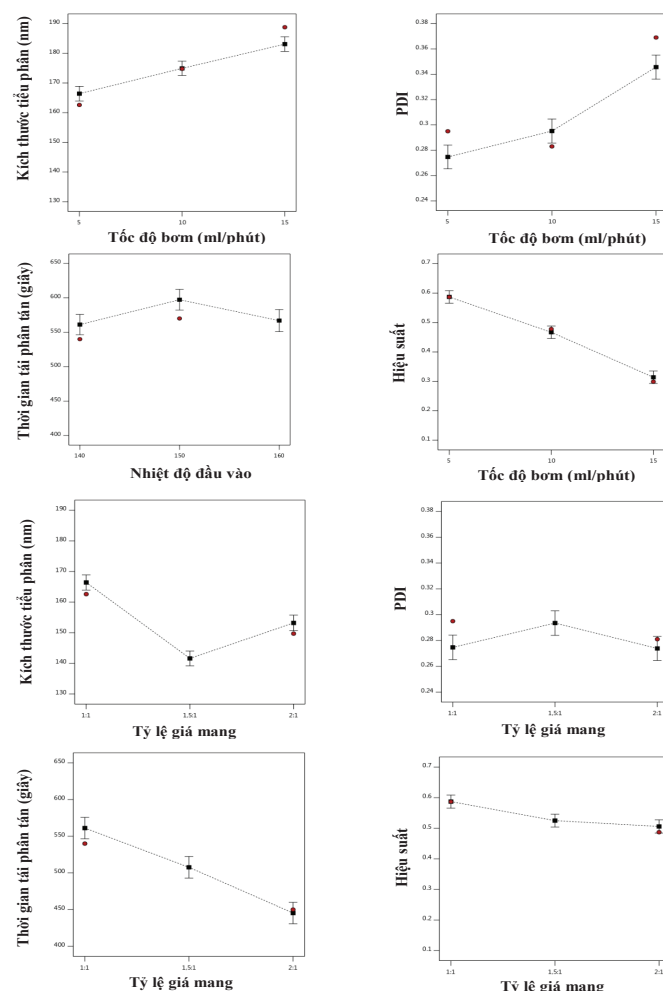
Kích thước tiểu phân sau khi tái phân tán: kích thước tiểu phân phụ thuộc vào cả tốc độ bơm và tỷ lệ giá mang. Việc tăng tốc độ bơm làm tăng kích thước tiểu phân, vì tốc độ bơm mẫu càng lớn càng làm giảm khả năng bay hơi của nước trong các giọt dịch phun ở cùng một nhiệt độ, dẫn tới các tiểu phân nano dễ bị kết dính vào nhau trước khi hình thành hạt bột phun sấy. Kết quả trên cũng phù hợp với nghiên cứu của B.B. Patel và cs (2015) [7] về tác động của tốc độ bơm tới kích thước tiểu phân. Bên cạnh đó, việc tăng tỷ lệ giá mang có xu hướng làm giảm kích thước tiểu phân. Điều này có thể giải thích do sự tăng tỷ lệ giá mang làm giảm khả năng tiếp xúc giữa các tiểu phân nano curcumin trong quá trình sấy phun, giúp tạo ra các tiểu phân có kích thước nhỏ hơn.

PDI: tốc độ bơm càng cao dẫn đến khả năng bay hơi của nước trong giọt dịch phun càng kém và tốc độ bay hơi dung môi cũng không đồng đều giữa các giọt dịch phun. Qua đó ảnh hưởng đến độ đồng đều kích thước của các hạt nano khi phun sấy, dẫn đến sự tăng rõ rệt của PDI ($p<0,0001$). Tỷ lệ

giá mang cũng ảnh hưởng đến PDI nhưng không đáng kể ($p=0,076$). Tỷ lệ giá mang 2:1 cho kết quả tốt nhất trong các tỷ lệ theo dự đoán của mô hình.

Thời gian tái phân tán của bột phun sấy trong nước (giây): thời gian tái phân tán bột phun sấy trong nước chịu ảnh hưởng rõ rệt của tỷ lệ giá mang. Tỷ lệ giá mang càng cao càng giúp giảm thời gian tái phân tán ($p<0,0001$), có thể vì giá mang sử dụng là maltodextrin rất dễ tan trong nước nên bột phun sấy có tỷ lệ giá mang cao hơn sẽ phân tán nhanh hơn. Nhiệt độ đầu vào 140°C cho thời gian phân tán thấp hơn 2 nhiệt độ thử nghiệm còn lại ($p=0,0349$).

Hiệu suất phun sấy: hiệu suất phun sấy chịu ảnh hưởng rõ rệt của cả tốc độ bơm và tỷ lệ giá mang. Tốc độ bơm quá cao làm giảm tốc độ bay hơi của dung môi trong giọt dịch phun, dẫn tới giọt dịch phun bám lại nhiều trên buồng sấy và tuýp thu mẫu, gây ra hiệu suất phun sấy thấp ($p<0,0001$). Kết quả này cũng tương tự một nghiên cứu về tối ưu hóa quy trình phun sấy của S.Z. Munawiroh và cs (2018) [8]. Việc tăng tỷ lệ giá mang làm giảm hiệu suất phun ($p=0,0029$) có thể giải thích do sự tăng độ nhớt của dịch phun làm giọt dịch có xu hướng bám nhiều hơn vào buồng sấy.



Hình 2. Sự ảnh hưởng của các biến độc lập lên các biến phụ thuộc.

3.4. Điều kiện ràng buộc cho biến độc lập và biến phụ thuộc

Để giúp phần mềm Design Expert thực hiện tối ưu hóa các thông số từ kết quả thực nghiệm, cần ràng buộc các biến độc lập trong khoảng giới hạn và đặt mục tiêu cụ thể cho các biến phụ thuộc. Các điều kiện này được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Điều kiện ràng buộc cho các biến số.

Biến số	Mục tiêu	Khoảng giới hạn
A	Trong khoảng giới hạn	140-160 (°C)
B	Trong khoảng giới hạn	5-15 (ml/phút)
C	Trong khoảng giới hạn	1:1-2:1
R1	Nhỏ nhất	140,4-206,6 (nm)
R2	Nhỏ nhất	0,258-0,374
R3	Nhỏ nhất	425-690 (giây)
R4	Lớn nhất	0,19-0,62

Dựa trên các điều kiện ràng buộc đối với các biến số, phần mềm Design-Expert đưa ra các thông số tối ưu với chỉ số mong muốn cao nhất, gồm: nhiệt độ đầu vào 140°C, tốc độ bơm 5 ml/phút, tỷ lệ giá mang 2:1.

Bảng 5. Kết quả thực nghiệm kiểm chứng.

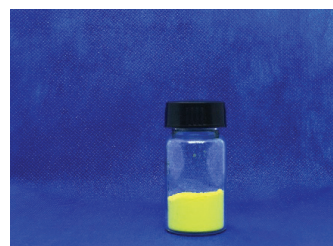
Lô	Giá trị trung bình của các chỉ tiêu kiểm nghiệm			
	R1	R2	R3	R4
1	153,8	0,284	435	0,5254
2	161,3	0,277	420	0,5377
3	172,4	0,288	430	0,5248
Trung bình	162,5	0,283	428,33	0,5293
Hệ số biến thiên CV (%)	5,759	1,967	1,783	0,728
Dự đoán	153,2	0,274	445,34	0,5062
Khoảng dự đoán (độ tin cậy 95%)	143,4-	0,237-	389,74-	0,4169-0,5948
	163,0	0,311	500,95	

Kết quả PDI, thời gian tái phân tán và hiệu suất có sự lặp lại tốt giữa 3 lô kiểm chứng (CV% lần lượt là 1,967, 1,783 và 0,728%). Kết quả trung bình của kích thước tiểu phân sau tái phân tán, PDI, thời gian tái phân tán và hiệu suất phun sấy đều nằm trong khoảng dự đoán (độ tin cậy 95%) của mô hình (bảng 5). Đồng thời, hình ảnh thành phẩm bột phun sấy hỗn dịch nano curcumin được thể hiện ở hình 3.

Hệ số biến thiên của 3 lô kiểm chứng về kích thước tiểu phân sau tái phân tán tương đối cao (5,759%), tuy nhiên kết quả trung bình vẫn nằm trong khoảng cho phép. Nguyên nhân có thể do trong quá trình điều chế nano curcumin, một số thay đổi nhỏ ở tốc độ khuấy từ trong lúc bơm pha cồn vào pha nước có thể làm ảnh hưởng đến độ đồng đều về kích thước của các tiểu phân nano.

Kích thước tiểu phân của bột thành phẩm sau khi tái phân tán trong nước cất lớn hơn nano curcumin ban đầu (ANOVA, $p=0,006$). Quá trình phun sấy giúp các tiểu phân nano curcumin được cố định trên giá mang maltodextrin. Bên cạnh đó, các tiểu

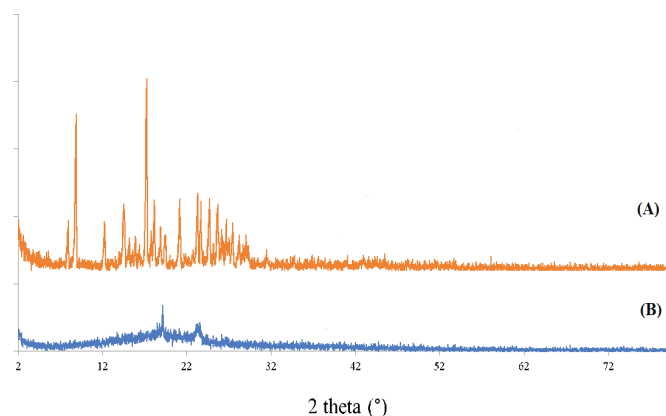
phân nano cũng có khả năng kết dính lại với nhau với một tỷ lệ nhất định trước khi các hạt này được sấy khô. Do vậy, khi thực hiện tái phân tán bột phun sấy trong nước cất bằng thiết bị khuấy từ sẽ ghi nhận giá trị kích thước tiểu phân cao hơn so với trước khi phun sấy. Kết quả này cũng tương đồng với thực nghiệm về hoá rắn tiểu phân nano bằng phương pháp phun sấy của X. Li và cs (2010) [9]. Trong nghiên cứu này, kích thước tiểu phân pha phân tán tăng từ 84,86-140,6 nm khi sử dụng maltodextrin làm chất mang cho quá trình phun sấy.



Hình 3. Thành phẩm bột phun sấy hỗn dịch nano curcumin.

3.5. Kết quả nghiên cứu tính chất của curcumin trong thành phẩm bột phun sấy

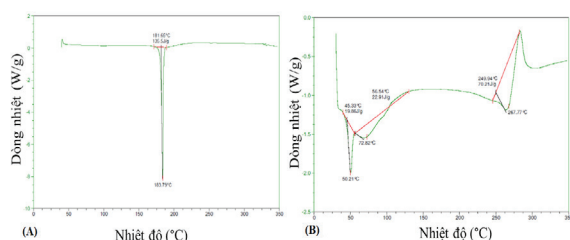
Kết quả phân tích phổ nhiễu xạ tia X (XRD):



Hình 4. XRD của curcumin nguyên liệu (A) và bột thành phẩm (B).

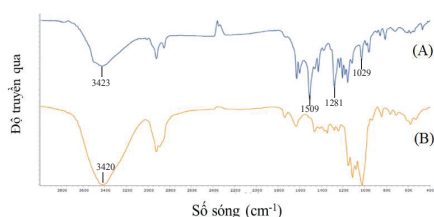
XRD là kỹ thuật dùng để phân tích nhanh, chủ yếu được dùng để xác định pha của vật liệu tinh thể. Mật độ và cường độ các đỉnh trong phổ XRD thể hiện mức độ kết tinh của dược chất [10]. Kết quả được trình bày ở hình 4 cho thấy, phổ nhiễu xạ tia X của curcumin nguyên liệu có nhiều đỉnh với cường độ lớn ở 8,64, 14,5, 17,22, 23,2, 24,31 và 25,62°, chứng tỏ curcumin tồn tại chủ yếu ở dạng kết tinh. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của F. Donsi và cs (2010) [11] về phổ nhiễu xạ tia X của curcumin. Trong khi mẫu bột thành phẩm phun sấy có mật độ và cường độ đỉnh đã giảm đi đáng kể so với mẫu nguyên liệu ban đầu, đồng thời không còn các đỉnh đặc trưng ở 8,64, 14,5, và 17,22°, chứng tỏ curcumin trong bột thành phẩm đã chuyển một phần sang trạng thái vô định hình. Kết quả này cũng tương tự như một số nghiên cứu về tính chất của curcumin trong nano curcumin [12] và trong bột phun sấy chứa curcumin [11].

Kết quả phân tích giản đồ nhiệt vi sai: Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) là công cụ nhiệt động lực học dùng để đánh giá trực tiếp sự hấp thu năng lượng nhiệt xảy ra ở một mẫu trong phạm vi tăng hoặc giảm nhiệt độ quy định. DSC thường được sử dụng để xác định nhiệt độ chuyển nhiệt của các chất trong dung dịch, chất rắn hoặc huyền phù [13]. Giản đồ nhiệt vi sai ở hình 5A cho thấy nhiệt độ nóng chảy của curcumin khoảng 183,8°C. Tuy nhiên, giản đồ nhiệt vi sai của bột thành phẩm (hình 5B) không có đỉnh ở vị trí tương tự. Kết quả này bổ sung thêm cho kết quả XRD chứng tỏ curcumin trong bột thành phẩm đã chuyển một phần sang trạng thái vô định hình.



Hình 5. Giản đồ nhiệt vi sai của curcumin nguyên liệu (A) và bột thành phẩm (B).

Kết quả phân tích phổ hồng ngoại FT-IR:



Hình 6. Phổ hồng ngoại của curcumin (A), bột phun sấy (B).

Phân tích phổ hồng ngoại giúp xác định được các loại dao động đặc trưng của các liên kết hay các nhóm chức có trong phân tử. Phổ hồng ngoại của curcumin (hình 6A) cho các đỉnh đặc trưng ở 3423 (nhóm OH phenol), 1509, 1281 và 1029 cm^{-1} . Kết quả thể hiện tương tự trong nghiên cứu của L. Pathak và cs (2015) [14]. Phổ hồng ngoại của mẫu bột phun sấy (hình 6B) đỉnh ở 3420 cm^{-1} cho thấy có sự chuyển dịch so với đỉnh ở 3423 cm^{-1} của curcumin, đồng thời có sự mất hoặc chuyển dịch các đỉnh ở vùng 1600-1400 cm^{-1} so với phổ hồng ngoại của curcumin. Điều này cho thấy có thể có sự tương tác ở nhóm OH phenolic và nhóm C=O của curcumin. Kết quả này phù hợp với kết quả phân tích nhiệt vi sai đã nêu trên.

4. Kết luận

Các thông số tối ưu của quá trình phun sấy nano curcumin đã được thiết lập thành công bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 11.0.4.0 (trial) với mô hình thực nghiệm I-Optimal. Phân tích phổ XRD cho thấy curcumin trong bột thành phẩm đã chuyển một phần sang trạng thái vô định hình, phân tích nhiệt quét vi sai và phân tích phổ hồng ngoại cho thấy có sự liên kết giữa chitosan, curcumin và lipoid S100. Bột phun sấy nano curcumin có thể được ứng dụng để tạo ra sản phẩm như viên nang nano curcumin, kem bôi ngoài chứa nano curcumin...

nhằm góp phần làm đa dạng hóa, cải thiện chất lượng và hiệu quả cùng các sản phẩm chứa curcumin khác trên thị trường. Tuy nhiên, để có thể ứng dụng vào sản phẩm, bột phun sấy nano curcumin cần được tiêu chuẩn hóa, đánh giá độ ổn định, khảo sát lại một số hoạt tính sinh học đặc trưng và đánh giá độc tính liên quan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Hu, Q. Hu, C. Yang (2018), "Spray-dried curcumin nanoemulsion: a new road to improvement of oral bioavailability of curcumin", *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(1), pp.169-173.
- [2] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, et al. (2007), "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview", *Food Research International*, 40(9), pp.1107-1121.
- [3] B.T. Tung, N.T. Hai, P.K. Son (2018), "Research preparation of curcumin in phytosome and PEGylated form", *VNU Journal of Science*, 34(1), pp.29-41 (in Vietnamese).
- [4] D.T.H. Anh, N.X. Duc (2020), "Preparation of curcumin nano emulsion using phase inversion method", *Pharmaceutical Research & Drug Information*, 11(1+2), pp.29-34 (in Vietnamese).
- [5] F. Sonvico, A. Cagnani, A. Rossi, et al. (2006), "Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction", *International Journal of Pharmaceutics*, 324, pp.67-73.
- [6] L.C. Chen, et al. (2016), "Development and characterization of lecithinbased self-assembling mixed polymeric micellar (saMPMs) drug delivery systems for curcumin", *Sci. Rep.*, 6, DOI: 10.1038/srep37122.
- [7] B.B. Patel, J.K. Patel, S. Chakraborty, D. Shukla (2015), "Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement", *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(4), pp.352-365.
- [8] S.Z. Munawiroh, V. Lipipun, G.C. Ritthidej (2018), "Optimization of redispersible spray dried powder of chitosan coated solid lipid-based nanosystems", *International Journal of Drug Delivery Technology*, 8(1), pp.19-32.
- [9] X. Li, N. Anton, C. Arpagaus, F. Belleiteix, T.F. Vandamme (2010), "Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi nano spray dryer B-90", *Journal of Controlled Release*, 147(2), pp.304-310.
- [10] F. Sima, C. Ristoscu, L. Dutu et al. (2016), "Laser thin films deposition and characterization for biomedical applications", *Laser Surface Modification of Biomaterials*, Woodhead Publishing, United Kingdom, pp.77-125.
- [11] F. Donsi, Y. Wang, J. Li, Q. Huang (2010), "Preparation of curcumin sub-micrometer dispersions by high-pressure homogenization", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), pp.2848-2853.
- [12] W. Wang, R. Zhu, Q. Xie, et al. (2012), "Enhanced bioavailability and efficiency of curcumin for the treatment of asthma by its formulation in solid lipid nanoparticles", *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp.3667-3677.
- [13] P. Gill, T.T. Moghadam, B. Ranjbar (2010), "Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience", *Journal of Biomolecular Techniques*, 21(4), pp.167-193.
- [14] L. Pathak, A. Kanwal, Y. Agrawal (2015), "Curcumin loaded self assembled lipid-biopolymer nanoparticles for functional food applications", *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), pp.6143-6156.

Thành phần hóa học và khả năng kháng nấm *Malassezia* gây bệnh trên da người của tinh dầu Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) trồng tại Hà Nội

Trần Bảo Trâm¹, Đào Ngọc Ánh^{1,2}, Trần Bình Minh¹, Đỗ Thị Kim Trang¹,
Trần Văn Tuấn², Vũ Xuân Tạo^{1*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/2/2022; ngày chuyển phản biện 25/2/2022; ngày nhận phản biện 7/3/2022; ngày chấp nhận đăng 11/3/2022

Tóm tắt:

Các loài nấm *Malassezia* có thể gây ra một số bệnh ngoài da nghiêm trọng trên người. Các thuốc kháng nấm được sử dụng phổ biến hiện nay trong điều trị các bệnh liên quan đến nấm *Malassezia* thuộc nhóm azole. Tuy nhiên, tình trạng mẫn cảm, kháng thuốc do sử dụng không đúng cách khiến người dùng lo ngại. Gần đây, việc nghiên cứu sử dụng các loại tinh dầu thảo dược trong kiểm soát nấm *Malassezia* đang được quan tâm. Nghiên cứu này đã phân tích và nhận diện được 19 chất trong thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.), trong đó, eugenol là hợp chất chính chiếm tới 42,4%. Tinh dầu Hương nhu tía thể hiện hoạt tính kháng mạnh 3 chủng nấm gây bệnh trên da người (*M. furfur* VNF01, *M. furfur* ATCC14521 và *M. globosa* VNG02) với nồng độ tối thiểu ức chế sinh trưởng các chủng nấm là 2,5 µl/ml. Với nồng độ này, số lượng tế bào của các chủng nấm men được thử nghiệm đã bị loại bỏ 74,66-80,66% sau 20 phút xử lý. Kết quả thu được cho thấy, tinh dầu Hương nhu tía là loại thảo dược tiềm năng để phát triển các dạng sản phẩm như dầu gội, kem bôi sử dụng cho việc phòng và trị bệnh liên quan đến nấm *Malassezia*.

Từ khóa: Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.), kháng nấm, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, tinh dầu.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Malassezia là nấm men ưa lipid ký sinh trên da người và động vật máu nóng. Trên da khỏe mạnh, nấm *Malassezia* sống ký sinh, sử dụng chất dinh dưỡng cần thiết cho quá trình sinh trưởng mà không gây bệnh. Khi gặp các điều kiện thuận lợi, chúng trở thành tác nhân gây bệnh cơ hội. Trong số 16 loài nấm *Malassezia* đã được ghi nhận, *M. furfur* và *M. globosa* là 2 loài phổ biến nhất gây bệnh trên da người, chúng đều không có khả năng sinh tổng hợp axit béo mà phải sử dụng lượng dầu tiết ra từ những vùng da có hệ thống tiết dầu mạnh (da mặt, da đầu...). Một số bệnh lý do nấm *M. furfur* và *M. globosa* gây ra như là gàu da đầu, viêm da đầu, lang ben, viêm da dị ứng, viêm nang lông [1-3].

Hiện nay, các phương pháp điều trị bệnh nấm da do *Malassezia* chủ yếu sử dụng các loại thuốc kháng nấm, phổ biến là nhóm azole gồm 3 loại: itraconazole, ketoconazole và fluconazole. Nhìn chung, các loại thuốc đều có tác dụng kìm hãm sự phát triển của nấm *Malassezia*. Ketoconazole là thế hệ đầu tiên của nhóm azole (ra đời năm 1980). Gần đây, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã công bố ketoconazole có nguy cơ gây độc tính suy gan thận khi sử dụng bằng đường uống. Từ năm 2013, Hoa Kỳ đã cấm lưu hành loại thuốc này và chỉ chấp nhận sử dụng dưới dạng chế phẩm tại chỗ là ketoconazole 2% dạng gel hoặc dầu gội [4]. Fluconazole và itraconazole đều có những tác động tích cực trong kiểm soát nấm *Malassezia* [5-7]. Tuy nhiên, theo khuyến cáo của nhà sản xuất, tác dụng phụ của cả 2 loại thuốc itraconazole

và fluconazole có thể gây ra hiện tượng đau đầu, chóng mặt, buồn nôn, đau bụng, đi ngoài, tăng men gan, nổi ban ngứa và tróc vảy ở da. Hơn thế nữa, việc sử dụng phổ biến các loại thuốc kháng nấm này có thể gây ra tình trạng kháng thuốc điều trị, đồng nghĩa với việc phát sinh các chủng nấm *Malassezia* kháng thuốc/đa kháng thuốc.

Những nghiên cứu về các hoạt tính của tinh dầu dược liệu và việc khai thác, ứng dụng nguồn dược chất tự nhiên này phục vụ bảo vệ sức khỏe con người đang ngày càng được quan tâm. Việt Nam là một trong những nước có nguồn tài nguyên thực vật phong phú và đa dạng, đặc biệt là các loài thực vật có tinh dầu. Hương nhu tía là một loại dược liệu thường được sử dụng trong nhiều bài thuốc dân gian dùng cho chữa trị các bệnh ngoài da. Tuy nhiên, hoạt tính kháng nấm *Malassezia* của tinh dầu Hương nhu tía còn ít nghiên cứu đề cập. Nghiên cứu này sẽ đưa ra những căn cứ khoa học cho việc ứng dụng tinh dầu Hương nhu tía trong việc phát triển các sản phẩm từ thảo dược kiểm soát nấm *Malassezia*.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm *M. furfur* VNF01 và *M. globosa* VNG02 được phân lập trên da người Việt Nam (người bị lang ben và gàu da đầu), chủng nấm *M. furfur* ATCC14521 được cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ, các chủng nấm đang được lưu giữ tại Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Chemical components of *Ocimum sanctum* L. essential oil grown in Hanoi, Vietnam and its antifungal properties against dermatologic pathogen - *Malassezia*

Bao Tram Tran¹, Ngoc Anh Dao^{1,2}, Binh Minh Tran¹, Thi Kim Trang Do¹, Van Tuan Tran², Xuan Tao Vu^{1*}

¹Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress, C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 22 February 2022; revised 7 March 2022; accepted 11 March 2022

Abstract:

Malassezia species can cause serious dermatologic diseases in humans. Synthetic antifungal drugs, which have been usually utilised as a treatment for *Malassezia*-associated diseases, are belonged to the azole group. However, the hypersensitivity and resistance to synthetic drugs due to improper use are raising public concerns. Recently, the study of using herbal essential oils in the control of *Malassezia* fungus has attracted great attention from researchers. This study analysed and identified 19 compounds of *Ocimum sanctum* L. essential oil, where eugenol is the main composition in *O. sanctum* L. essential oil, accounting for 42.4%. *O. sanctum* L. essential oil showed strong activity against 3 strains of human skin fungi *M. furfur* VNF01, *M. furfur* ATCC14521, and *M. globosa* VNG02 with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.5 µl/ml. Using this concentration, 74.66-80.66% of tested yeast strains' cell numbers were eliminated after a 20-minute treatment. The results suggested that the herbal *O. sanctum* L. essential oil could be a potential agent to develop cosmetic products including shampoo and cream for the prevention and treatment of *Malassezia*-associated diseases.

Keywords: antifungal, essential oils, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Ocimum sanctum* L.

Classification number: 3.4

Toàn bộ phần trên mặt đất của cây Hương nhu tía sau 6 tháng trồng (đang ở giai đoạn ra hoa 70%) được thu tại Hà Nội. Mẫu sau khi thu hái được đưa ngay về phòng thí nghiệm để sử dụng cho việc tách chiết tinh dầu.

2.2. Phương pháp tách chiết tinh dầu

Tinh dầu được tách chiết từ các mẫu thảo dược tươi bằng hệ thống Clevenger theo phương pháp chưng cất lôi kéo hơi nước. Tiến hành tách loại nước tinh dầu thu được bằng Na₂SO₄ khan. Tinh dầu được lưu giữ trong lọ tối màu và bảo quản ở 4°C [8].

2.3. Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía

Thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí GC/MS [9]. Hệ thống GC/MS-QP2020 của Hãng Shimadzu (Nhật Bản), cột mao quản SH-Rxi-5Sil MS có kích thước 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Chương trình nhiệt độ với điều kiện 60°C (giữ 2 phút), tăng lên nhiệt độ 120°C với tốc độ 10°C/phút, sau đó tăng lên 240°C với tốc độ 5°C/phút, tiếp đến giữ ở 240°C trong 5 phút. Khí heli được sử dụng làm khí mang với tốc độ dòng chảy 1,0 ml/phút. Detector khối phổ được cài đặt trong khoảng tín hiệu 50-900 m/z. Thể tích mẫu tiêm vào cột là 1 µl với dung dịch mẫu tinh dầu có nồng độ 1% (w/v) trong hexan. Tỷ lệ chia dòng là 1:20. Kết quả phân tích các thành phần trong mẫu tinh dầu được xử lý bằng cách so sánh về phổ khối của các chất với thư viện NIST.

2.4. Xác định hoạt tính kháng nấm của tinh dầu bằng phương pháp khuếch tán qua thạch

Trải 50 µl dịch nuôi nấm *Malassezia* (10⁶ tế bào/ml) lên đĩa chứa môi trường mDixon (malt extract 36 g/l, desiccated oxbile 20 g/l, tween40 10 ml/l, peptone 6 g/l, glycerol 2 ml/l, oleic acid 2 ml/l, pH 6). Tiến hành pha loãng tinh dầu bằng DMSO và bổ sung 50 µl tinh dầu ở các nồng độ khác nhau (1, 2,5, 5, 10 và 20%) vào các giếng đã được khoan lỗ trên đĩa thạch đã cấy nấm *Malassezia*, đặt các đĩa này vào tủ lạnh trong 4 giờ để dịch khuếch tán đều vào môi trường, sau đó chuyển sang tủ nuôi cấy ổn nhiệt 30°C để nấm phát triển và tiến hành quan sát, đánh giá kết quả sau 3 ngày nuôi. Thí nghiệm đối chứng là bổ sung riêng DMSO vào lỗ thạch thay vì tinh dầu. Hoạt tính kháng nấm được xác định theo công thức: D - d (mm), trong đó: D là đường kính vòng trong không có nấm; d là đường kính giếng thạch. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần thực hiện trên 3 đĩa khác nhau cho mỗi công thức xác định hoạt tính kháng [10].

2.5. Xác định nồng độ tối thiểu ức chế (MIC) sinh trưởng nấm *Malassezia* của tinh dầu

Khử trùng dịch môi trường mDixon ở 120°C/20 phút, để nguội xuống dưới 50°C và trộn đều tinh dầu vào môi trường với các tỷ lệ khác nhau, tiến hành đổ môi trường ra các đĩa petri (16 ml/đĩa). Từ ống dịch giống *Malassezia* (10⁶ tế bào/ml) pha loãng thành các nồng độ 10⁴ và 10⁵. Tại mỗi đĩa môi trường, chia đĩa thành 3 hàng, 3 cột (tức lặp lại thí nghiệm 3 lần/đĩa),

nhỏ 5 µl mỗi nồng độ của mỗi loại dịch nấm vào một cột từ 10^6 , 10^5 , 10^4 tương đương với số tế bào nấm *Malassezia* lần lượt là 5000, 500 và 50. Sau đó, đĩa được chuyển vào tủ nuôi cấy ổn nhiệt 30°C. Quan sát và đánh giá kết quả sau 48-72 giờ nuôi. Giá trị MIC là nồng độ tinh dầu mà tại đó 5000 tế bào nấm bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn [11].

2.6. Xác định thời gian diệt nấm *Malassezia* của tinh dầu Hương nhu tía

Phương pháp xác định thời gian diệt nấm *Malassezia* được tiến hành theo M.B. Joray và cs (2011) [12]. Môi trường nuôi cấy lỏng chứa 10^6 tế bào nấm men/ml được bổ sung tinh dầu ở giá trị MIC và được lắc 150 vòng/phút ở 5, 10, 20 và 30 phút. Tại các khoảng thời gian đã chọn, tiến hành lấy mẫu từ môi trường nuôi cấy và xác định mật độ tế bào nấm men bằng cách cấy trải trên môi trường thạch.

$$\% \text{tế bào chết} = 100 - \% \text{số tế bào sống.}$$

trong đó, $\% \text{tế bào sống} = (\text{nồng độ tế bào tại thời điểm 5, 10, 20 và 30 phút}) / (\text{nồng độ tế bào ban đầu}) \times 100$

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía

Tinh dầu Hương nhu tía thu được có màu vàng nhạt, mùi thơm đặc trưng. Thành phần hóa học của tinh dầu là một trong những căn cứ quan trọng nhất để đánh giá chất lượng tinh dầu, vì vậy, các tác giả đã tiến hành phân tích thành phần hóa học của mẫu tinh dầu Hương nhu tía, kết quả thu được thể hiện ở bảng 1.

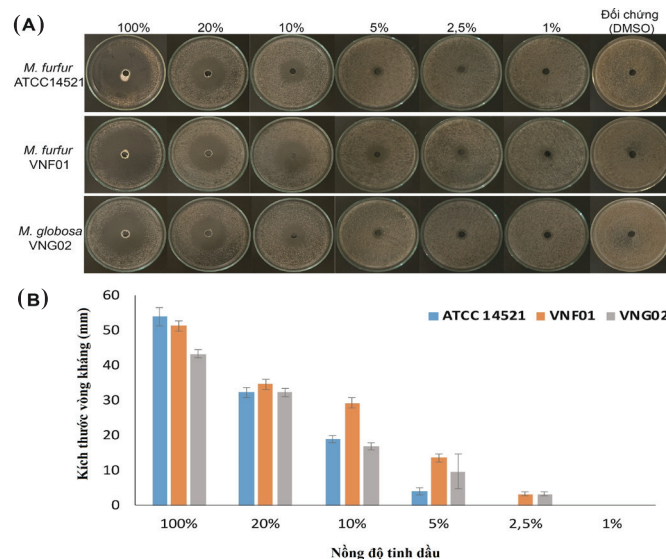
Bảng 1. Thành phần hóa học chính trong tinh dầu Hương nhu tía.

STT	Thành phần hóa học	Thời gian lưu (phút)	Tỷ lệ (%)
1	o-Cymene	6,075	1,40
2	Linalool	6,827	2,87
3	Eugenol	12,433	42,40
4	α -Copaene	12,900	9,59
5	β -Bourbonene	13,042	4,10
6	Methyleugenol	13,201	4,00
7	Caryophyllene	13,605	1,19
8	β -copaene	13,744	0,90
9	γ -Murolene	14,855	1,66
10	Alloaromadendrene oxide-(1)	15,276	1,38
11	Caryophyllene oxide	15,603	12,53
12	Salvial-4(14)-en-1-one	15,702	2,35
13	(-)-Spathulenol	15,907	3,74
14	Alloaromadendrene oxide-(2)	16,194	1,80
15	γ -himachalene	16,284	2,39
16	α -Bisabolene epoxide	16,425	1,99
17	Longiverbenone	16,467	1,00
18	α -Isonootkatol	16,616	3,59
19	Phytol	19,625	1,00
Tổng số			99,88

Kết quả bảng 1 cho thấy, tinh dầu Hương nhu tía gồm 19 chất chính, chiếm 99,88% tổng số chất trong mẫu tinh dầu. Trong đó, eugenol là thành phần chủ yếu chiếm tới 42,4%. Nghiên cứu của V.T.T. Tuyen và cs (2019) [13] cho thấy, tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Bình Định chứa 71,21% eugenol. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của M.J. Saharkhiz và cs (2015) [14], tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Borazjan, Iran ở các giai đoạn thu hoạch khác nhau chứa 15 chất chính, trong đó eugenol là thành phần chính chiếm 15,7-37,5%. Trong khi đó, hàm lượng eugenol trong tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Pakistan chỉ đạt 22% [15]. Điều này có thể do khí hậu và thổ nhưỡng tại các vùng khác nhau ảnh hưởng tới hàm lượng các hợp chất trong tinh dầu. Như vậy, có thể thấy tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Việt Nam có chất lượng cao, đây là nguồn hoạt chất rất tiềm năng cho phát triển các sản phẩm thảo dược chăm sóc sức khỏe.

3.2. Đánh giá khả năng kháng nấm *M. furfur* và *M. globosa* của tinh dầu Hương nhu tía bằng phương pháp khuếch tán qua thạch

Nhằm định hướng ứng dụng tinh dầu Hương nhu tía vào việc phát triển sản phẩm phòng và điều trị các bệnh trên da do nấm *Malassezia* gây ra, nghiên cứu này sẽ tiến hành đánh giá khả năng của tinh dầu Hương nhu tía kháng 2 loài nấm *Malassezia* gây bệnh phổ biến là *M. furfur* và *M. globosa*. Kết quả cho thấy, tinh dầu Hương nhu tía thể hiện tính kháng mạnh trên cả 3 chủng nấm *M. furfur* VNF01, ATCC14521 và *M. globosa* VNG02, khả năng kháng nấm giảm đi khi tinh dầu được pha loãng. Tại các nồng độ pha loãng tới 5%, tinh dầu Hương nhu tía vẫn thể hiện khả năng kháng lại cả 3 chủng nấm. Khi nồng độ tinh dầu giảm xuống 2,5%, chỉ còn biểu hiện hoạt tính kháng 2 chủng nấm VNF01 và VNG02. Tinh dầu Hương nhu tía không thể hiện khả năng kháng nấm khi bị pha loãng đến nồng độ 1% theo phương pháp khuếch tán qua thạch (hình 1).

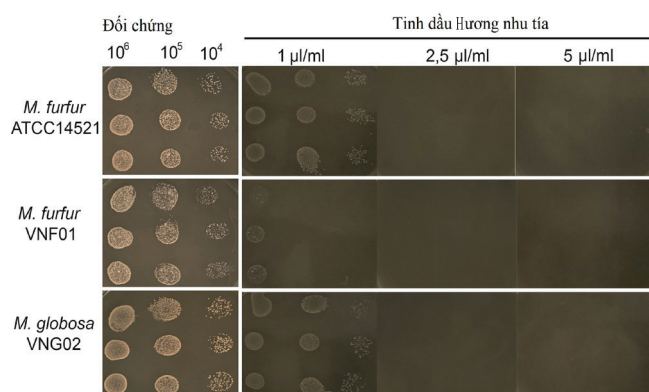


Hình 1. Khả năng kháng nấm *M. furfur* và *M. globosa* của tinh dầu Hương nhu tía ở các nồng độ pha loãng khác nhau. (A) Vòng kháng nấm *M. furfur* và *M. globosa* trên đĩa môi trường; (B) Kích thước vòng kháng.

Tinh dầu Hương nhu tía với thành phần hóa học chính là eugenol đã được khẳng định có khả năng kháng lại nhiều loài nấm trong chi *Candida* [16], ức chế sự sinh trưởng và sinh độc tố của nấm *Aspergillus flavus* [17]. Ngoài ra, một số nghiên cứu trước đây cho thấy rằng tinh dầu của các loài Hương nhu *O. canum*, *O. gratissimum*, *O. trichodon* và *O. urticifolium* cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt [18]. Tuy nhiên, đến nay chưa có nhiều các nghiên cứu đề cập tới khả năng kháng nấm *M. furfur* và *M. globosa* gây bệnh trên da người của tinh dầu Hương nhu tía. Như vậy, có thể coi đây là nghiên cứu bước đầu bổ sung thêm dữ liệu mới về hoạt tính kháng nấm *Malassezia* của tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Việt Nam.

3.3. Xác định MIC sinh trưởng nấm *M. furfur* và *M. globosa* của tinh dầu Hương nhu tía

Để có thể ứng dụng tinh dầu trong việc sản xuất các sản phẩm dược liệu thì việc xác định được giá trị MIC của tinh dầu ức chế được hoàn toàn sinh trưởng của nấm *Malassezia* là yêu cầu đầu tiên. Kết quả thử nghiệm đã xác định được giá trị MIC của tinh dầu Hương nhu tía đối với các chủng nấm *M. furfur* ATCC14521, *M. furfur* VNF01 và *M. globosa* VNG02 là 2,5 μ l/ml (hình 2).



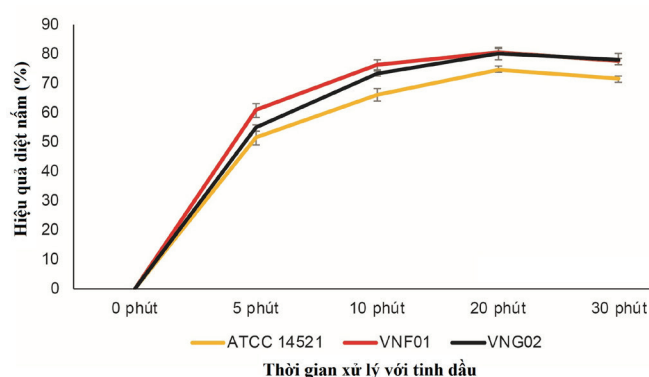
Hình 2. Nồng độ tối thiểu ức chế sinh trưởng nấm *M. furfur* và *M. globosa* của tinh dầu Hương nhu tía.

Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định được giá trị MIC của tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Việt Nam đối với các chủng nấm *Malassezia* gây bệnh trên da người. Cùng nghiên cứu trên 3 chủng nấm *M. furfur* ATCC14521, *M. furfur* VNF01 và *M. globosa* VNG02, T.X. Vu và cs (2021) [19] đã xác định được nồng độ tối thiểu ức chế hoàn toàn 3 chủng nấm trên của tinh dầu Bạc hà là 2,5 μ l/ml và tinh dầu Trầu không là 1 μ l/ml. Như vậy có thể thấy, tinh dầu Hương nhu tía là loại tinh dầu có tiềm năng cao trong phát triển các sản phẩm kháng nấm *Malassezia*.

3.4. Xác định thời gian diệt nấm *Malassezia* của tinh dầu Hương nhu tía

Để có thể ứng dụng các sản phẩm thảo dược dùng cho các bệnh lý ngoài da như gàu da đầu, viêm da dầu, lang ben, viêm da dị ứng, viêm nang lông... do nấm *M. furfur* và *M.*

globosa gây ra, cần xác định thời gian thích hợp lưu lại trên da đủ để kiểm soát nấm *Malassezia* một cách hiệu quả nhất. Để có căn cứ khoa học khi sử dụng các sản phẩm chứa tinh dầu Hương nhu tía kiểm soát nấm *Malassezia*, các tác giả đã tiến hành xác định hiệu quả diệt nấm *Malassezia* theo thời gian tiếp xúc với tinh dầu Hương nhu tía ở giá trị MIC. Kết quả cho thấy, ở nồng độ tinh dầu 2,5 μ l/ml, sau 5 phút ủ, tỷ lệ tế bào nấm *Malassezia* chết đạt trên 50%. Khi tăng dần thời gian ủ, tỷ lệ tế bào nấm chết tăng dần và đạt cao nhất sau 20 phút ủ. Sau 20 phút tiếp xúc với tinh dầu Hương nhu tía, các chủng *M. furfur* VNF01 và *M. globosa* VNG02 có tỷ lệ tế bào chết khá cao (80-80,66%), trong khi chủng *M. furfur* ATCC14521 đạt mức 74,66% (hình 3).



Hình 3. Khả năng diệt nấm *M. furfur* và *M. globosa* theo thời gian của tinh dầu Hương nhu tía.

Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, tinh dầu có khả năng kháng nhiều loài nấm bệnh thông qua việc phá vỡ các cấu trúc của thành tế bào, ức chế khả năng tổng hợp độc tố nấm [20]. Vì vậy, một số loại tinh dầu Sả như *Cymbopogon citratus* và *C. flexuosus* đã được sử dụng trong sản xuất dầu gội, kem bôi để điều trị thành công gàu và bệnh lang ben do nấm *Malassezia* gây ra [21]. Ngoài ra, dịch lên men cây Hương nhu tía cũng được chứng minh có khả năng kháng mạnh nấm *M. furfur* và được ứng dụng trong sản xuất dầu gội [22]. Với các kết quả đạt được, tinh dầu Hương nhu tía có tiềm năng sử dụng để phát triển các sản phẩm mới trong việc kiểm soát nấm *Malassezia*.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã đánh giá được thành phần hóa học của tinh dầu Hương nhu tía trồng tại Hà Nội gồm 19 chất chính, trong đó eugenol là thành phần chính với hàm lượng chiếm tới 42,4%. Tinh dầu Hương nhu tía thể hiện hoạt tính kháng mạnh 3 chủng nấm gây bệnh trên da người là *M. furfur* VNF01, *M. furfur* ATCC14521 và *M. globosa* VNG02 với giá trị MIC là 2,5 μ l/ml. Ở nồng độ tinh dầu sử dụng 2,5 μ l/ml, tỷ lệ tế bào nấm *Malassezia* chết đã đạt trên 50% sau 5 phút ủ và đạt cao nhất sau 20 phút ủ. Sau 20 phút tiếp xúc với tinh dầu ở nồng độ 2,5 μ l/ml, tỷ lệ nấm *Malassezia* chết đạt từ 74,66 đến 80,66%. Như vậy có thể

thấy, tinh dầu Hương nhu tía rất có tiềm năng ứng dụng trong các sản phẩm kiểm soát nấm *Malassezia*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ khoa học và công nghệ “Nghiên cứu phát triển một số sản phẩm kháng nấm *Malassezia* spp. gây bệnh phổ biến trên da người từ nguồn thảo dược Việt Nam” do Bộ Khoa học và Công nghệ quản lý. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.W. Saunders, A. Scheynius, J. Heitman (2012), “*Malassezia* fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases”, *PLOS Pathogens*, **8**(6), pp.1-4.
- [2] V.C. Erchiga, V.D. Florencio (2002), “*Malassezia* species in skin diseases”, *Current Opinion in Infectious Diseases*, **15**(2), pp.133-142.
- [3] A.K. Gupta, R. Batra, R. Bluhm, et al. (2004), “Skin diseases associated with *Malassezia* species”, *Journal of The American Academy of Dermatology*, **51**(5), pp.785-798.
- [4] United States Food and Drug Administration (2013), *FDA Drug Safety Communication: FDA Warns That Prescribing of Nizoral (ketoconazole) Oral Tablets for Unapproved Uses Including Skin and Nail Infections Continues; Linked to Patient Death*.
- [5] C.S. Bhogal, A. Singal, M.C. Baruah (2001), “Comparative efficacy of ketoconazole and fluconazole in the treatment of pityriasis versicolor: a one-year follow-up study”, *The Journal of Dermatology*, **28**(10), pp.535-539.
- [6] A. Kokturk, T. Kaya, G. Ikizoglu, et al. (2002), “Efficacy of three short-term regimens of itraconazole in the treatment of pityriasis versicolor”, *Journal of Dermatological Treatment*, **13**(4), pp.185-187.
- [7] O. Köse, H.B. Taştan, A.R. Gür, et al. (2002), “Comparison of a single 400 mg dose versus a 7-day 200 mg daily dose of itraconazole in the treatment of tinea versicolor”, *Journal of Dermatological Treatment*, **13**(2), pp.77-79.
- [8] T.T.A. Ngoc, N.V. Kien (2011), “Survey of factors affecting the distillation process of ginger essential oil”, *CTU Journal of Science*, **19**B, p.62-69 (in Vietnamese).
- [9] R.P. Adams (2001), *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corp., 456pp.
- [10] F. Hadacek, H. Greger (2000), “Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice”, *Phytochemical Analysis*, **11**(3), pp.137-147.
- [11] R. Lambert, J. Pearson (2000), “Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values”, *Journal of Applied Microbiology*, **88**(5), pp.784-790.
- [12] M.B. Joray, M.R.D. Rollán, G.M. Ruiz, et al. (2011), “Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina - isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*”, *Planta Medica*, **77**(1), pp.95-100.
- [13] V.T.T. Tuyen, N.T.M. Bien (2019), “Survey of chemical composition and antibacterial activity of *Ocimum sanctum* L. essential oil in Binh Dinh”, *Quy Nhon University Journal of Science*, **13**(3), pp.83-90 (in Vietnamese).
- [14] M.J. Saharkhiz, A.A. Alam, N.K. Kazerani, et al. (2015), “Chemical compositions and antimicrobial activities of *Ocimum sanctum* L. essential oils at different harvest stages”, *Jundishapur Journal of Microbiology*, **8**(1), pp.1-7.
- [15] A.I. Hussain, S.A.S. Chatha, G.M. Kamal, et al. (2017), “Chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Ocimum sanctum*”, *International Journal of Food Properties*, **20**(7), pp.1569-1581.
- [16] A. Janssen, J. Scheffer, L. Ntezurubanza, et al. (1989), “Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda”, *Journal of Ethnopharmacology*, **26**(1), pp.57-63.
- [17] A. Khan, A. Ahmad, N. Manzoor, et al. (2010), “Antifungal activities of *Ocimum sanctum* essential oil and its lead molecules”, *Natural Product Communications*, **5**(2), pp.1345-1349.
- [18] A. Kumar, R. Shukla, P. Singh, et al. (2010), “Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant-based antimicrobial”, *Food and Chemical Toxicology*, **48**(2), pp.539-543.
- [19] T.X. Vu, T.B. Tran, C.Q. Hoang, et al. (2021), “Chemical compositions and anti-malassezia properties of Vietnamese *Mentha arvensis* and *Piper betle* essential oils”, *International Journal of Agricultural Technology*, **17**(4), pp.1619-1630.
- [20] F. Nazzaro, F. Fratianni, R. Coppola, et al. (2017), “Essential oils and antifungal activity”, *Pharmaceuticals*, **10**(4), pp.1-20.
- [21] R. Donato, C. Sacco, G. Pini, et al. (2020), “Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species”, *Journal of Ethnopharmacology*, **249**, DOI: 10.1016/j.jep.2019.112376.
- [22] C. Punyoyai, S. Sirilun, P. Chantawannakul, et al. (2018), “Development of antidandruff shampoo from the fermented product of *Ocimum sanctum* Linn”, *Cosmetics*, **5**(3), pp.43-54.

Thành phần loài và giá trị sử dụng cây thuốc theo kinh nghiệm của dân tộc Xinh Mun tại xã biên giới Phiêng Pắn, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La

Vũ Thị Liên*, Ngô Hoàng Long, Lò Văn Loa, Lò Thị Bích Hậu

Trường Đại học Tây Bắc, đường Chu Văn An, phường Quyết Tâm, TP Sơn La, tỉnh Sơn La, Việt Nam

Ngày nhận bài 4/10/2021; ngày chuyển phản biện 8/10/2021; ngày nhận phản biện 29/10/2021; ngày chấp nhận đăng 4/11/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá thành phần loài và giá trị sử dụng cây thuốc theo kinh nghiệm của dân tộc Xinh Mun tại xã biên giới Phiêng Pắn, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La từ tháng 7/2019 đến tháng 5/2020. Kết quả thu được 362 loài cây thuốc thuộc 269 chi, 110 họ, 4 ngành thực vật bậc cao có mạch, trong đó có 9 họ có nhiều loài nhất. Các loài cây thuốc được dân tộc Xinh Mun sử dụng khác nhau để điều trị 19 nhóm bệnh, trong đó cây thuốc chữa bệnh ngoài da có số lượng nhiều nhất với 77 loài (chiếm 21,27%). Trong các bộ phận được sử dụng làm thuốc, lá được sử dụng nhiều nhất (chiếm 45,58%), tiếp đến là thân và rễ được sử dụng lần lượt với 93 và 87 loài. Nghiên cứu đã xác định được 26 loài cây thuốc (chiếm 7,18%) có nguy cơ bị đe dọa được ghi trong Sách đỏ Việt Nam (2007), 18 loài được ghi trong Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam (2019) và 9 loài trong Nghị định 06/2019/NĐ-CP. Đây là những loài có số cá thể còn ít nên cần có những chính sách ưu tiên bảo tồn và phát triển.

Từ khóa: cây thuốc, kinh nghiệm, Mai Sơn, Phiêng Pắn, Sơn La, thành phần loài, Xinh Mun.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Phiêng Pắn là xã, vùng cao biên giới, xã đặc biệt khó khăn của huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La. Trên địa bàn xã có gần 7.500 nhân khẩu với hơn 1.600 hộ, gồm có 4 dân tộc sinh sống, trong đó dân tộc Xinh Mun có số lượng đông nhất (gần 6.000 người, chiếm 76,0%) [1]. Từ thời xa xưa, dân tộc Xinh Mun đã có cuộc sống gắn bó với hệ thực vật rừng rất phong phú ở vùng cao biên giới Việt - Lào, do địa hình phức tạp, đường giao thông đi lại rất khó khăn. Trong khi đó, cơ sở vật chất về y tế nghèo nàn lại xa nơi họ sinh sống. Mặt khác, điều kiện kinh tế khó khăn không đủ tiền đến các cơ sở y tế. Để thích nghi, cộng đồng dân tộc Xinh Mun đã không ngừng tìm tòi tích lũy riêng cho mình các tri thức và kinh nghiệm sử dụng thực vật để phòng và chữa bệnh. Trải qua thời gian, các bài thuốc có tính độc đáo và trở nên thông dụng trong việc chăm sóc sức khỏe người dân và các dân tộc xung quanh. Việc sử dụng các cây thuốc theo phương pháp truyền thống đã có từ lâu đời, với những kinh nghiệm bản địa được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác và giữa các cộng đồng chủ yếu bằng cách truyền miệng. Đây chính là nguồn tri thức bản địa vô cùng quý báu cần khai thác, bảo tồn và phát triển. Có nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam về cây thuốc cũng như kinh nghiệm dân gian đã được thực hiện và mang lại giá trị khoa học, thực tiễn như: nghiên cứu cây thuốc được sử dụng bởi các thầy lang ở quận Kancheepuram của Tamil Nadu, Ấn Độ [2]; nghiên cứu về kiến thức và sử dụng cây thuốc cổ truyền chữa bệnh của người địa phương ở quận Sekoru, Jimma Zone, Tây Nam Ethiopia [3]; kiến thức truyền

thống về cây thuốc và thực phẩm được sử dụng ở Val San Giacomo (Sondrio, Ý) [4]; nghiên cứu ưu tiên các cây thuốc Tây Phi để bảo tồn [5]; nghiên cứu về đa dạng cây thuốc thuộc ngành Ngọc lan (Magnoliophyta) tại Khu bảo tồn thiên nhiên Tà Xùa tỉnh Sơn La [6]; nghiên cứu về cây thuốc và giá trị sử dụng của dân tộc Mông tại xã Mường Phăng, huyện Điện Biên, tỉnh Điện Biên [7]; nghiên cứu về cây thuốc được dân tộc Dao sử dụng tại xã Phiêng Côn, huyện Bắc Yên, tỉnh Sơn La [8]...

Kinh nghiệm sử dụng cây thuốc của các dân tộc là tiềm năng để sản xuất các loại thuốc mới. Trên thế giới, đây là hướng nghiên cứu ứng dụng được quan tâm từ rất sớm và thu được nhiều thành tựu. Ở nước ta, đây là lĩnh vực còn ít được nghiên cứu, mặc dù tiềm năng rất lớn. Mặt khác, những hoạt chất sinh học và cơ sở khoa học của các bài thuốc được dân tộc Xinh Mun sử dụng chưa được nghiên cứu, chứng minh bằng con đường khoa học. Cùng với đó, hiện nay tại khu vực nghiên cứu tình trạng khai thác và mua bán các sản phẩm từ rừng diễn ra phức tạp, do phát nương làm rẫy, lạm dụng thuốc diệt cỏ... dẫn đến diện tích rừng tự nhiên ngày càng bị thu hẹp và nguồn tài nguyên cây thuốc ngày càng bị suy giảm. Đặc biệt, với những loài có khả năng tái sinh và sinh trưởng chậm thì nguy cơ bị đe dọa và tuyệt chủng là rất cao. Vì thế, việc tìm hiểu về cây thuốc và giá trị sử dụng theo kinh nghiệm của dân tộc Xinh Mun tại xã biên giới Phiêng Pắn, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La là một việc có ý nghĩa quan trọng, góp phần bảo tồn tri thức y học cổ truyền dân tộc.

*Tác giả liên hệ: Email: luocvang2018@utb.edu.vn

Species composition and use value of medicinal plants according to the experience of Xinh Mun ethnic people at Phieng Pan border commune, Mai Son district, Son La province

Thi Lien Vu*, Hoang Long Ngo,
Van Loa Lo, Thi Bich Hau Lo

Tay Bac University, Chu Van An Street, Quyet Tam Ward, Son La City, Son La Province, Vietnam

Received 4 October 2021; revised 29 October 2021; accepted 4 November 2021

Abstract:

This study was conducted to evaluate the species composition and the use value of medicinal plants according to the experience of the Xinh Mun ethnic group at Phieng Pan border commune, Mai Son district, Son La province, from July 2019 to May 2020. The results showed that there were 362 species of medicinal plants belonging to 269 genera and 110 families of 4 phyla of vascular plants. There were 9 families with the highest number of species. The medicinal plants were differently used by the Xinh Mun ethnic to treat 19 groups of diseases. The number of plant species used for the treatment of skin diseases was highest with 77 species (21.27%). Of the parts used, leaves were most used (45.58%), followed by stems and roots with 93 and 87 species, respectively. 26 medicinal species (accounting for 7.18%) have been identified in Vietnam's Red Data Book (2007), 18 species were listed in Vietnam's Red List of Medicinal Plants, and 9 species were listed in the Governmental Decree 06/2019/NĐ-CP. These species had few individuals that need to have policies for conservation and development.

Keywords: experience, Mai Son, medicinal plants, Phieng Pan, Son La, species composition, Xinh Mun.

Classification number: 3.4

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các loài thực vật và kinh nghiệm sử dụng thực vật làm thuốc của dân tộc Xinh Mun tại xã biên giới Phiêng Păn, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La.

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7/2019 đến tháng 5/2020 tại 6 bản: Xá Kênh, Kết Nà, Nà Nhụng, Tà Vắt, Phiêng Kháng và Nà Pồng thuộc xã Phiêng Păn, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp kế thừa tài liệu: Kế thừa những kinh nghiệm sử dụng cây thuốc của các ông lang, bà mẹ dân tộc Xinh Mun và các tài liệu nghiên cứu có liên quan đến đề tài, có chọn lọc.

Phương pháp nghiên cứu thực vật: Sử dụng phương pháp lập tuyến điều tra, thu và bảo quản mẫu thực vật được thực hiện theo N.N. Thín (2008) [9]. Cụ thể, dựa vào kết quả điều tra sơ bộ và dựa vào bản đồ địa hình, bản đồ hiện trạng sử dụng đất của khu vực nghiên cứu đã tiến hành lập 8 tuyến điều tra (tổng chiều dài là 49,5 km), mở rộng phạm vi điều tra trên mỗi tuyến về 2 bên khoảng 20 m. Các tuyến này phân bố đi qua các sinh cảnh khác nhau của khu vực nghiên cứu. Ngoài ra, còn điều tra bổ sung tại vườn nhà người dân và thu mẫu tiêu bản tại thực địa. Trên mỗi tuyến thu thập, ghi lại đặc điểm hình thái, thống kê, chụp ảnh mẫu, sử dụng GPS để xác định tọa địa lý, độ cao phân bố các loài cây thuốc... Việc điều tra tại các tuyến có đi cùng người dân địa phương và được ghi vào mẫu phiếu điều tra với các thông tin như giới tính, tuổi, trình độ học vấn, kinh nghiệm, tên địa phương, tên khoa học, tên phổ thông, dạng sống, sinh cảnh, công dụng, bộ phận sử dụng, mùa thu hái, cách chế biến, phương pháp sử dụng, nơi thu hái, mùa thu hái các loài cây làm thuốc.

Phương pháp phân tích và phân loại mẫu: Xác định tên khoa học các loài thực vật bằng phương pháp so sánh hình thái theo các tài liệu: Danh lục các loài thực vật Việt Nam [10, 11], Cây cỏ Việt Nam [12], Từ điển cây thuốc Việt Nam [13], Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam [14]. Mẫu vật được lưu giữ tại Phòng Bảo tàng, Trường Đại học Tây Bắc. Phân nhóm công dụng của các loài thực vật làm thuốc chủ yếu dựa vào kinh nghiệm thực tế của dân tộc Xinh Mun tại khu vực nghiên cứu và tài liệu của V.V. Chi (2012) [13], D.T. Loi (2005) [14], T.D. Ly (1995) [15]. Danh lục các loài cây thuốc sắp xếp theo R.K. Brummitt (1992) [16].

Phương pháp điều tra phỏng vấn: theo các phương pháp nghiên cứu thực vật dân tộc học, gồm RRA (Rapid rural appraisal - phương pháp đánh giá nhanh nông thôn) và PRA (Participatory rural appraisal - phương pháp đánh giá nông thôn có sự tham gia của người dân), phương pháp của G.J. Martin (2002) [17] và A.B. Cunningham (2001) [18]. Có tổng số 180 người cung cấp thông tin (người thu hái, gây trồng, thầy lang, người tiêu dùng và buôn bán) trong độ tuổi từ 25 đến 78 đã trả lời phỏng vấn.

Đánh giá mức độ nguy cấp của các loài cây thuốc: Theo các tài liệu Sách đỏ Việt Nam (2007) [19], Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam (2019) [20] và Nghị định số 06/2019/NĐ-CP [21]. Thống kê, xử lý và tính toán các số liệu điều tra, phiếu phỏng vấn bằng phần mềm Excell.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đa dạng các bậc taxon của nguồn tài nguyên cây thuốc được dân tộc Xinh Mun sử dụng

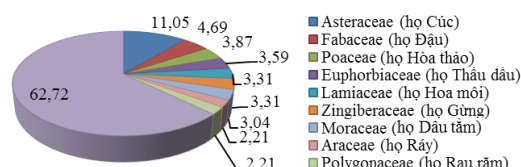
Đa dạng bậc ngành: Kết quả điều tra đã xác định được 362 loài cây thuốc, 269 chi, 110 họ thuộc 4 ngành: Thông đất (Lycopodiophyta), Cỏ tháp bút (Equisetophyta), Dương xỉ (Polypodiophyta) và Ngọc lan (Magnoliophyta) được dân tộc Xinh Mun sử dụng để chữa bệnh tại xã Phiêng Pần, huyện Mai Sơn (bảng 1). Từ dữ liệu bảng 1 cho thấy, phần lớn các taxon thuộc ngành Ngọc lan với 338 loài (93,37%), 251 chi (93,31%), 95 họ (86,36%) và thấp nhất là ngành Cỏ tháp bút với 1 loài (chiếm 0,28%), 1 chi (0,37%) và 1 họ (0,91%). Như vậy, các taxon chủ yếu tập trung ở ngành Ngọc lan với số chi và loài chiếm trên 90%, điều này hoàn toàn hợp lý so với sự tiến hóa của thực vật, bởi Ngọc lan là ngành chiếm ưu thế của thực vật bậc cao có mạch. Các chỉ tiêu về cấu trúc hệ thống của thực vật làm thuốc được dân tộc Xinh Mun sử dụng gồm: chỉ số đa dạng họ là 3,29 (trung bình mỗi họ có 3 loài), chỉ số đa dạng chi là 1,35 (trung bình mỗi chi có 1 loài), số chi trung bình của mỗi họ là 2,45 (trung bình mỗi họ có 2 chi được sử dụng làm thuốc chữa bệnh) (bảng 1). Sự phân bố không đều của các taxon không chỉ được thể hiện giữa các ngành mà còn được thể hiện giữa các taxon lớp trong ngành Ngọc lan. Thực vật làm thuốc được dân tộc Xinh Mun sử dụng có tỷ trọng lớp Hai lá mầm (Dicotyledones) với số lượng các taxon chiếm ưu thế với 74,74% tổng số họ, 77,69% số chi và 76,92% số loài của ngành; lớp Một lá mầm (Monocotyledones) với 24 họ (25,26%), 56 chi (22,31%) và 78 loài (23,08%). Tỷ lệ lớp Dicotyledone (D) và Monocotyledones (M) là: 2,96, 3,48 và 3,33, nghĩa là có gần 3 họ của lớp Dicotyledones thì có 1 họ lớp Monocotyledones; có 3 chi Dicotyledones thì có 1 chi của lớp Monocotyledones; có 3 loài của lớp Dicotyledones thì có 1 loài của lớp Monocotyledones. Qua bảng 1 thấy rằng, thực vật làm thuốc được dân tộc Xinh Mun sử dụng ở khu vực nghiên cứu có tỷ trọng của lớp Hai lá mầm so với lớp Một lá mầm luôn cao hơn 3. Kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu về đa dạng cây thuốc thuộc ngành Ngọc Lan tại Khu bảo tồn thiên nhiên Tà Xùa, tỉnh Sơn La của P.Q. Anh và cs (2016) [6], V.T. Lien và cs (2017) [7], V.T. Lien (2018) [8].

Bảng 1. Số loài cây thuốc được dân tộc Xinh Mun sử dụng ở khu vực nghiên cứu.

TT	Ngành thực vật	Họ		Chi		Loài	
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Lycopodiophyta (ngành Thông đất)	2	1,82	2	0,74	3	0,83
2	Equisetophyta (ngành Cỏ tháp bút)	1	0,91	1	0,37	1	0,28
3	Polypodiophyta (ngành Dương xỉ)	12	10,91	15	5,58	20	5,52
4	Magnoliophyta (ngành Ngọc lan)	95	86,36	251	93,31	338	93,37
	Dicotyledones (lớp hai lá mầm) - D	71	74,74	195	77,69	260	76,92
	Monocotyledones (lớp một lá mầm) - M	24	25,26	56	22,31	78	23,08
	Tỷ lệ D/M	2,96		3,48		3,33	
	Tổng	110	100	269	100	362	100

Đa dạng ở bậc dưới ngành: Sự đa dạng của hệ thực vật còn được xem xét ở bậc dưới ngành, cụ thể là cấp độ họ và chi. Cụ thể như sau:

- Đa dạng họ: kết quả ở hình 1 cho thấy, trong số 108 họ thực vật làm thuốc theo kinh nghiệm của dân tộc Xinh Mun sử dụng, một số họ có nhiều loài cây thuốc như họ Cúc (Asteraceae) có số loài nhiều nhất (40 loài, chiếm 11,05%), tiếp đến là họ Đậu (Fabaceae, 17 loài, chiếm 4,69%), Hòa thảo (Poaceae, 14 loài, chiếm 3,87%), Thầu dầu (Euphorbiaceae, 13 loài, chiếm 3,59%), Hoa môi (Lamiaceae, 12 loài, 3,31%), Gừng (Zingiberaceae, 12 loài, chiếm 3,31%), Dâu tằm (Moraceae, 11 loài, chiếm 3,04%), hai họ Ráy (Araceae) và Rau răm (Polygonaceae) đều có 8 loài (2,21%). Các họ còn lại có ít hơn 8 loài, chiếm 62,72% tổng số loài. Đây đều là những họ lớn và giàu loài của hệ thực vật Việt Nam.



Hình 1. Các họ thực vật có số loài được sử dụng nhiều nhất.

- Đa dạng chi: trong số 271 chi làm thuốc tại khu vực nghiên cứu có 6 chi có nhiều loài là: Sung (Ficus) với 8 loài (chiếm 2,21%) - đây là chi đại diện cho rừng nhiệt đới, tiếp theo là Rau răm (Polygonum) 7 loài (1,93%), Thóc lép (Desmodium) 5 loài (1,38%); các chi Ngải (Artemisia), Đại bi (Blumea) và Cà (Solanum) mỗi chi có 4 loài (1,10%). Các chi còn lại dưới 4 loài, chiếm 91,18% tổng số loài.

3.2. Đa dạng về sử dụng của các bộ phận làm thuốc

Nghiên cứu nắm rõ về các bộ phận làm thuốc không chỉ cho thấy tính phong phú và đa dạng trong khả năng chữa bệnh của các bộ phận đó, mà còn có ý nghĩa giúp cho biện pháp bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu có hiệu quả. Đồng thời, việc nghiên cứu các bộ phận sử dụng làm thuốc còn có giá trị đánh giá được tính bền vững trong thực trạng khai thác và sử dụng tài nguyên cây thuốc của dân tộc Xinh Mun tại khu vực nghiên cứu.

Bảng 2. Phân bố số loài thực vật theo các bộ phận sử dụng làm thuốc.

TT	Bộ phận sử dụng	Số lượng loài	Tỷ lệ (%)
1	Lá	165	45,58
2	Thân	93	25,69
3	Rễ	87	24,03
4	Cá cây	75	20,71
5	Quả	22	6,08
6	Vỏ thân	21	5,80
7	Hạt	21	5,80
8	Hoa	7	1,93
9	Nhựa	4	1,10
10	Vỏ rễ	3	0,83
11	Lông	1	0,28

Một loài có thể sử dụng trong một số nhóm công dụng khác nhau.

Kết quả bảng 2 cho thấy, lá là bộ phận được sử dụng nhiều nhất và thông dụng nhất với 165 loài, chiếm 45,58% tổng số loài thu được. Có thể nói, lá cây làm thuốc khá đa dạng cả về cách sử dụng lẫn công dụng, việc sử dụng này thuận tiện trong thu hái và ít ảnh hưởng đến sinh trưởng tái sinh của cây thuốc so với việc khai thác các bộ phận khác của cây. Kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu về bộ phận làm thuốc của dân tộc Mông tại xã Mường Phăng, huyện Điện Biên của V.T. Lien và cs (2017) [7], dân tộc Dao tại xã Phiêng Côn, huyện Bắc Yên của V.T. Lien (2018) [8]. Một số nghiên cứu về cây thuốc được tiến hành ở trên thế giới cũng cho thấy, lá được sử dụng nhiều hơn các phần khác của cây [2, 3, 22], việc sử dụng lá làm giảm mức độ đe dọa đối với các loài thực vật làm thuốc. Tiếp theo bộ phận thân có 93 loài (chiếm 25,69%), bộ phận rễ 87 loài (chiếm 24,03%), sử dụng cả cây là 75 loài (chiếm 20,71%). Việc sử dụng các bộ phận cả cây và rễ có tỷ lệ khá lớn, điều này làm ảnh hưởng không nhỏ tới công tác bảo tồn và phát triển bền vững cây thuốc, vì sẽ dẫn đến việc hủy hoại đời sống của các cây thuốc khi không còn rễ hoặc lấy tất cả các bộ phận của cây thuốc để làm thuốc. Do vậy, cần phải có biện pháp gây trồng các loài cây thuốc sử dụng cả cây hoặc rễ để chữa bệnh nhằm bảo tồn và phát triển bền vững nguồn dược liệu. Sử dụng quả với 22 loài, chiếm 6,08%. Những cây sử dụng bộ phận vỏ thân làm thuốc và hạt có 21 loài, chiếm 5,80%. Tuy nhiên, các bộ phận này có tỷ lệ sử dụng càng lớn thì mức độ ảnh hưởng của việc khai thác đến khả năng tái sinh của cây càng cao. Các bộ phận sử dụng còn lại như: hoa, nhựa, vỏ rễ và lông được sử dụng với tần số thấp nhưng tác dụng chữa bệnh rất hiệu quả. Sự phân bố không đồng đều trong các bộ phận sử dụng làm thuốc là do đặc tính về thời vụ và tích lũy kinh nghiệm chữa bệnh của dân tộc Xinh Mun.

3.3. Tính đa dạng về giá trị sử dụng của các loài cây thuốc

Kết quả bảng 3 cho thấy, các loài cây thuốc chữa nhóm bệnh ngoài da có số lượng nhiều nhất với 77 loài (chiếm 21,27%)

Bảng 3. Đa dạng về giá trị sử dụng các loài cây thuốc của dân tộc Xinh Mun.

TT	Các nhóm bệnh	Số lượng loài	Tỷ lệ (%)
1	Ngoài da (dị ứng, nhọt, nước ăn chân...)	77	21,27
2	Tiêu hoá (tiêu chảy, xơ gan, đau dạ dày, ruột...)	70	19,34
3	Xương khớp, gân, cơ (gãy xương, đau lưng, khớp gối, mỏi cơ, tê thấp...)	52	14,36
4	Tim mạch (cảm máu, huyết áp cao, tụ máu đông, tai biến mạch máu não...)	49	13,54
5	Hô hấp (viêm họng, ho, hen, viêm xoang...)	45	12,43
6	Bệnh phụ nữ (an thai, hiếm muộn, tắc tia sữa...)	42	11,60
7	Bài tiết (đường tiết niệu, lợi tiểu, sỏi tiểu, đái buốt...)	38	10,49
8	Thần kinh (đau đầu, an thần, thần kinh tọa...)	37	10,22
9	Động vật cắn (rắn cắn, ong cắn, rết cắn...)	36	9,94
10	Bồi bổ cơ thể (bổ máu, bổ thận, bổ gan...)	27	7,46
11	Giải độc (ngộ độc rượu, nầm, ngộ độc thức ăn...)	21	5,80
12	Bệnh nam giới (xuất tinh sớm, yếu sinh lý, viêm tinh hoàn...)	12	3,31
13	Bệnh trẻ em (nhanh biết đi...)	11	3,04
14	Đái tháo đường	6	1,66
15	Bệnh về tóc (gây rụng...)	4	1,10
16	U bướu (ung thư, hạch, u nang...)	3	0,82
17	Bệnh về mắt (đau mắt...)	3	0,82
18	Bệnh về tai (ve chui vào tai, viêm tai)	3	0,82
19	Thuốc cho động vật nuôi (tăng sức đề kháng, phòng dịch...)	1	0,28

Điều tra thực tế năm 2019 và 2020 tại xã Phiêng Pần.

thuộc 41 họ và 68 chi; nhóm bệnh tiêu hóa chiếm tỷ lệ 19,34%, gồm 70 loài trong tổng số 362 loài thu được, thuộc 38 họ và 63 chi; nhóm bệnh về xương khớp, gân, cơ chiếm 14,36%, gồm 52 loài thuộc 30 họ và 39 chi. Có 49 loài có tiềm năng chữa bệnh tim mạch (chiếm 13,54%) thuộc 29 họ và 42 chi; nhóm bệnh hô hấp có 45 loài (chiếm 12,43%) thuộc 12 họ và 14 chi; nhóm bệnh phụ nữ có 42 loài (chiếm 11,60%) thuộc 35 họ và 48 chi; nhóm bệnh bài tiết có 38 loài (chiếm 10,49%) thuộc 25 họ và 33 chi. Có 37 loài có tiềm năng chữa bệnh thần kinh (chiếm 10,22%) thuộc 22 họ và 31 chi. Có 36 loài có tiềm năng chữa bệnh động vật cắn (chiếm 9,94%) thuộc 20 họ và 30 chi; bồi bổ cơ thể với 27 loài (chiếm 7,46%) thuộc 21 họ và 23 chi. Có 21 loài có tiềm năng giải độc cơ thể (chiếm 5,80%) thuộc 15 họ và 15 chi. Các nhóm bệnh còn lại có số loài có tiềm năng chữa bệnh dưới 21 loài. Mỗi loại cây thuốc sẽ có những cách chế biến khác nhau tùy thuộc vào cách chữa của từng ông lang, bà mẹ và tùy thuộc vào tình trạng của người bệnh. Trong đó, phương pháp thái lát mỏng phơi khô đun nước uống được sử dụng nhiều nhất hiện nay, ngoài ra có thể đun nước tắm, xông hơi, ngâm rượu để uống hoặc xoa bóp..., thuốc được lấy vào lúc sáng sớm hoặc lúc mặt trời lặn.

3.4. Một số loài cây thuốc bị đe dọa cần được bảo vệ

Tại khu vực nghiên cứu, thực vật được khai thác để chữa bệnh cho người dân địa phương với lượng không nhiều, nhưng

Bảng 4. Các loài cây thuốc cần bảo tồn được ghi nhận tại xã Phiêng Pần.

TT	Tên khoa học	Tên phổ thông	Cấp quy định		
			Sách Đỏ Việt Nam 2007	Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam	Nghị định 06/2019/NĐ-CP
1	<i>Acanthopanax trifoliatum</i>	Ngũ gia bì gai	EN	VU	
2	<i>Acorus macrospadiceus</i>	Thủy xương bồ lá to	EN	EN	
3	<i>Ardisia silvestris</i>	Khôi tia	VU		
4	<i>Balanophora laxiflora</i>	Dỏ đất	EN	EN	
5	<i>Canarium tramdenanum</i>	Trám đen	VU		
6	<i>Chukrasia tabularis</i>	Lát hoa	VU		
7	<i>Cirsium japonicum</i>	Đại kê	VU	EN	
8	<i>Codonopsis javanica</i>	Đảng sâm	VU	EN	
9	<i>Curculigo orchoides</i>	Sâm cau	EN	EN	
10	<i>Dendrobium aphyllum</i>	Hạc vĩ	VU		NII
11	<i>Dendrobium chrysanthum</i>	Ngọc vạn vàng	EN		NII
12	<i>Disporopsis longifolia</i>	Hoàng tinh cách	VU	EN	NII
13	<i>Drynaria bonii</i>	Tắc kè đá	VU	VU	NII
14	<i>Drynaria fortunei</i>	Cốt toái bỏ	EN	EN	NII
15	<i>Elsholtzia penduliflora</i>	Chùa dù	VU	EN	
16	<i>Fallopia multiflora</i>	Hà thủ ô đỏ	VU	EN	
17	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Giảo cổ lam	EN		
18	<i>Kadsura heteroclita</i>	Na rừng	VU	EN	NII
19	<i>Melientha suavis</i>	Rau sắng	VU		
20	<i>Murraya glabrum</i>	Vương tửng	VU		
21	<i>Nervilia fordii</i>	Lan một lá	EN	EN	NII
22	<i>Paris polyphylla</i>	Bảy lá một hoa	EN	CR	NII
23	<i>Polygonatum kingianum</i>	Hoàng tinh vòng	EN	EN	NII
24	<i>Selaginella tamariscina</i>	Quyển bá trường sinh	VU	VU	
25	<i>Stephania brachyandra</i>	Bình vôi nhị ngắn	EN	EN	
26	<i>Stemona cochinchinensis</i>	Bách bộ	VU	VU	

khai thác vì mục đích thương mại theo đường tiêu ngạch với số lượng rất lớn. Đây là nguyên nhân chính làm cho số loài thực vật có nguy cơ tuyệt chủng tăng cao đã dẫn đến số lượng, trữ lượng nhiều loài cây thuốc bị suy giảm nghiêm trọng và có nguy cơ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên. Kết quả điều tra đã ghi nhận được 26 loài cây thuốc quý hiếm (bảng 4). Trong đó, có 15 loài cây thuốc ở mức độ sẽ nguy cấp (VU), 11 loài đang ở mức nguy cấp cần được bảo vệ (EN) trong Sách đỏ Việt Nam (2007) [19]. Theo Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam của N. Tap (2019) [20], có 18 loài, trong đó có 4 loài cây thuốc ở thứ hạng VU (sắp nguy cấp), 13 loài ở thứ hạng EN (nguy cấp) và 1 loài ở thứ hạng CR (cực kỳ nguy cấp). Có 9 loài trong Nghị định 06/2019/NĐ-CP [21] thuộc nhóm IIA. Đây là những loài cây thuốc quý đang bị khai thác mạnh cần quan tâm và có chính sách ưu tiên trong việc bảo tồn và phát triển.

4. Kết luận

Kết quả điều tra các loài cây thuốc được dân tộc Xinh Mun sử dụng ở xã biên giới Phiêng Pắn, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La đã ghi nhận được 362 loài thuộc 269 chi, 110 họ. Ngành Ngọc lan đa dạng nhất, chiếm 93,37% tổng số loài, 93,31% tổng số chi và 86,36% tổng số họ. Tỷ trọng của lớp Hai lá mầm so với lớp Một lá mầm trong ngành Ngọc lan luôn cao hơn 3. Điều này cho thấy hệ thực vật nơi đây mang tính chất nhiệt đới. Đa dạng ở bậc dưới ngành: 9 họ có số loài đa dạng nhất, chiếm 8,18%. Sử dụng các bộ phận để làm thuốc bao gồm: lá là bộ phận sử dụng nhiều và thông dụng nhất với 165 loài, thân có 93 loài, rễ có 87 loài, cả cây có 75 loài, quả 22 loài vỏ thân và hạt có 21 loài, hoa có 7 loài, nhựa có 4 loài, vỏ/rễ có 3 loài và lông có 1 loài. Đã thống kê được 19 nhóm bệnh khác nhau sử dụng cây thuốc để chữa bệnh. Số lượng cây thuốc thuộc diện cần bảo tồn ở khu vực nghiên cứu có 26 loài, chiếm 7,18% tổng số loài cây thuốc thu được.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí từ đề tài cấp bộ mã số CT-2019.06.05. Xin bày tỏ lòng biết ơn tới UBND xã Phiêng Pắn, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La đã tạo điều kiện thuận lợi trong quá trình nghiên cứu. Cảm ơn các thầy thuốc cổ truyền dân tộc Xinh Mun, người thu hái cây thuốc và người dân địa phương đã tham gia phỏng vấn, khảo sát thực địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] People's Committee of Phieng Pan Commune, Mai Son District, Son La Province (2020), *Report on The implementation of The Socio-economic Development Plan, Ensuring National Defense and Security in 2019 and Directions for Implementing Tasks Plan for Socio-economic Development, Homeland Protection and Security in 2020* (in Vietnamese).

[2] C. Muthu, M. Ayyanar, S. Ignacimuthu (2006), "Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India", *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **2**, DOI: 10.1186/1746-4269-2-43.

[3] H. Yineger, D. Yewhalaw (2007), "Traditional medicinal plant knowledge and use by local Healers in Sekoru district, Jimma Zone, Southwestern Ethiopia", *J. of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **3**, DOI: 10.1186/1746-4269-3-24.

[4] S. Vitalini, M. Iriti, C. Puricelli, et al. (2013), "Traditional knowledge on medicinal and food plants used in Val San Giacomo (Sondrio, Italy) - An alpine ethnobotanical study", *Journal of Ethnopharmacology*, **145**, pp.517-529, DOI: 10.1016/j.jep.2012.11.024.

[5] T.R.V. Andel, S. Croft, E.E. Loon (2015), "Prioritizing west African medicinal plants for conservation and sustainable extraction studies based on market surveys and species distribution models", *Biological Conservation*, **181**, pp.173-181.

[6] P.Q. Anh, T.T. Bach, V.T. Lien (2016), "Diversity of medicinal plants belonging to the Magnoliophyta phylum at Ta Xua Nature Reserve, Son La province", *VNU Journal of Science*, **32**, pp.8-13 (in Vietnamese).

[7] V.T. Lien, H.T. Me, H.T.T. Ha (2017), "Investigation of medicinal plants and their use values according to the experience of the Mong ethnic group in Muong Phang commune, Dien Bien district, Dien Bien province", *Conference The 7th National Science of Ecology and Biological Resources*, pp.1311-1316 (in Vietnamese).

[8] V.T. Lien (2018), "Species composition and life forms of medicinal plants Dao ethnic group used in Phieng Con commune, Bac Yen district, Son La province", *Conference The 3rd National Study on Biology Research and Teaching in Vietnam*, pp.264-270 (in Vietnamese).

[9] N.N. Thin (2008), *Plant Research Methods*, Hanoi National University Publishing House (in Vietnamese).

[10] Center for Natural Resources and Environmental Research, Hanoi National University (2001), *List of Vietnamese Plant Species*, Agricultural Publishing House, **1**, 1181pp (in Vietnamese).

[11] N.T. Ban (2003, 2005), *List of Vietnamese Plant Species*, Agriculture Publishing House, **2-3** (in Vietnamese).

[12] P.H. Ho (1999-2000), *Vietnamese Plants*, **1-3**, Ho Chi Minh City Youth Publishing House (in Vietnamese).

[13] V.V. Chi (2012), *Vietnamese Dictionary of Medicinal Plants*, Medical Publishing House, Volumes 1-2 (in Vietnamese).

[14] D.T. Loi (2005), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Science and Technology Publishing House (in Vietnamese).

[15] T.D. Ly (1995), *1900 Useful Plant Species*, World Publishing House (in Vietnamese).

[16] R.K. Brummitt (1992), *Vascular Plant Families and Genera*, Royal Botanic Gardens.

[17] G.J. Martin (2002), *Ethnobotany*, Agriculture Publishing House, 363pp (Vietnamese).

[18] A.B. Cunningham (2001), *Applied Ethnobotany: People Wild Plant Use and Conservation*, Taylor & Francis eBooks, pp.269-270.

[19] Ministry of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology (2007), *Vietnam Red Book (Part II: Plants)*, Natural Science and Technology Publishing House (Vietnamese).

[20] N. Tap (2019), "Red List of Vietnamese medicinal plants", *Journal of Medicinal Plants*, **24(6)**, pp.319-328 (Vietnamese).

[21] Government (2019), *Decree No. 06/2019/CP-ND dated January 22, 2019 on Management of Endangered, Precious and Rare Forest Plants and Animals and Implementation of The Convention on International Trade Endangered Species of Wild Animals and Plants* (Vietnamese).

[22] A.Asase, A.A.O. Yeboah, G.T. Odamtten, et al. (2005), "Ethnobotanical study of some Ghanaian antimalarial plants", *J. of Ethnopharmacology*, **99(2)**, pp.273-279, DOI: 10.1016/j.jep.2005.02.020.

Khả năng ức chế *Helicobacter pylori* của một số mẫu cao chiết methanol từ thực vật thu tại tỉnh Lâm Đồng

Phan Nhã Hòa^{1*}, Phạm Bảo Yên²

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

²Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,

334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/11/2021; ngày chuyển phản biện 4/11/2021; ngày nhận phản biện 26/11/2021; ngày chấp nhận đăng 30/11/2021

Tóm tắt:

Helicobacter pylori được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) xếp vào nhóm nguyên nhân loại I dẫn đến ung thư dạ dày. Trong dân gian đã có nhiều bài thuốc từ thảo dược được sử dụng để điều trị các bệnh liên quan đến dạ dày. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã đánh giá khả năng ức chế *H. pylori* *in vitro* của một số mẫu cao chiết methanol thực vật thu tại tỉnh Lâm Đồng bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả nghiên cứu xác định được 10 mẫu cao chiết thực vật có khả năng ức chế *H. pylori* tại nồng độ 100 mg/ml, trong đó có 5 mẫu ức chế 100% (Hoàng liên gai, Cóc kền Mã Lai, Trạng quả trái, An điền mềm, Aralia) và 5 mẫu ức chế với đường kính vòng vô khuẩn 6-7 mm (Mạo dài, Chua ngút, Vàng lô bụi, Móng tai Langbiang, Hoa anh đào). Đây là những kết quả đầu tiên về tác dụng kháng *H. pylori* của các loài thực vật và là cơ sở để tiếp tục tìm kiếm các mẫu có tiềm năng phát triển làm thuốc điều trị *H. pylori* tại Việt Nam.

Từ khóa: cao chiết methanol thực vật, *H. pylori*, khả năng ức chế vi khuẩn.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

H. pylori là một vi khuẩn xoắn ốc, gram âm, được phát hiện lần đầu vào năm 1984 và là một trong những vi khuẩn gây bệnh mãn tính phổ biến nhất ở người [1]. Khoảng hơn 50% số người trên thế giới bị nhiễm và tỷ lệ nhiễm bệnh ở các nước đang phát triển cao hơn nhiều so với các nước phát triển [2]. Nhiễm *H. pylori* là một nguyên nhân chính thường dẫn đến viêm dạ dày mãn tính, loét dạ dày, tá tràng. Dữ liệu dịch tễ học cho thấy, tỷ lệ nhiễm *H. pylori* cao dẫn đến tỷ lệ mắc ung thư dạ dày và ung thư biểu mô [3, 4]. Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế của WHO đã xếp *H. pylori* là nguyên nhân gây ung thư loại I, nhiều nghiên cứu cho thấy, *H. pylori* làm tăng nguy cơ ung thư dạ dày [5]. Phác đồ điều trị *H. pylori* thường kết hợp các loại thuốc khác nhau như: kháng sinh, ức chế bơm proton, khóa thụ thể H₂ và các muối bismuth mang lại hiệu quả lên đến 90%. Tuy nhiên, khi điều trị theo các phác đồ kháng sinh thường dẫn đến một số tác dụng phụ không mong muốn như: loạn khuẩn đường ruột, nhiễm khuẩn các cơ quan, đặc biệt là hiện tượng kháng kháng sinh của các chủng *H. pylori* ngày càng tăng [6]. Từ ngàn năm trước, nhiều loài thực vật đã được sử dụng làm thuốc [7]. Phân lập và sinh hóa đặc điểm của các hợp chất có hoạt tính được lý từ cây thuốc vẫn được tiếp tục cho đến ngày nay [8, 9]. Trong những năm gần đây, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng nhiễm *H. pylori* có thể được ức chế thông qua việc sử dụng cây thuốc [10-12].

Ở Việt Nam, trong thời gian gần đây đã có nghiên cứu sàng lọc, đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *H. pylori* của một số dịch chiết thảo dược Việt Nam [7]. Kết quả cho thấy, trong số 30 mẫu

thảo dược nghiên cứu, 10 mẫu có hoạt tính kháng *H. pylori* mạnh như: Đỗ rùng, Nghệ đen, Trầu không, Quế chi, Bắc mộc hương, Kim ngân hoa, Tô mộc, Sa nhân, Chè dây và Dạ cẩm. Như vậy, nếu mở rộng quy mô sàng lọc theo hoạt tính này, sẽ còn phát hiện nhiều loài được liệu có tiềm năng sử dụng trong điều trị *H. pylori*.

Lâm Đồng có nguồn tài nguyên thực vật, cây thuốc vô cùng đa dạng. Các kết quả nghiên cứu trước đây tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã xây dựng danh mục cây thuốc và cây có khả năng làm thuốc của 1003 loài thu thập ở Lâm Đồng cùng với tiêu bản và ngân hàng dịch chiết của tất cả các loài thu thập được [13]. Các khảo sát, sàng lọc hoạt tính sinh học trước đây chỉ mới thực hiện trên 200 mẫu dịch chiết chọn lọc với các hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa và gây độc tế bào [13]. Do đó, việc nghiên cứu, áp dụng các phương pháp thử hoạt tính khác là cần thiết mà cụ thể trong nghiên cứu này là hoạt tính kháng *H. pylori* để tìm kiếm những loài thực vật có tiềm năng sử dụng trong điều trị *H. pylori* ở Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

Vật liệu: lá và cành nhỏ của các mẫu thực vật nghiên cứu được thu hái tại Lâm Đồng. Tên khoa học được định danh bởi tiến sỹ Nông Văn Duy (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) và tiêu bản được lưu giữ tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên với các số hiệu tiêu bản tương ứng ở bảng 1.

Hóa chất: môi trường nuôi cấy là Columbia agar (OXOID) có bổ sung 10% máu cừu, túi Genbag tạo môi trường vi hiếu khí

*Tác giả liên hệ: Email: phannhahoa87@gmail.com

Inhibitory effects on *Helicobacter pylori* of methanol extracts from plants collected in Lam Dong province

Nha Hoa Phan^{1*}, Bao Yen Pham²

¹Taynguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology, 116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²The Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 1 November 2021; revised 26 November 2021; accepted 30 November 2021

Abstract:

World Health Organization has recently categorised *H. pylori* infection as a class I gastric carcinogen. Many medicinal plants have traditionally been used for gastrointestinal problems. This study aims to evaluate the inhibitory effect on *H. pylori* activity of plant extracts collected in Lam Dong province. The broth microdilution method was used *in vitro*. The research results have identified 10 extracts that can inhibit *H. pylori* at a concentration of 100 mg/ml. In which there were five samples of complete inhibition: *Mahonia nepalensis* DC.ex Dipple, *Derris malaccensis* Prain, *Desmodium laxiflorum* DC, *Hedyostics capitellata* var. *pubescens* Kurz, and *Aralia hiepihana* J. Wen & Lowr. Five anti- *H. pylori* samples with the antibacterial diameter (mm) of a zone of inhibition 6-7 mm: *Mitrephora thorelii* Pierre, *Embelia ribes* Burn, *Maclura fruticosa* (Kurz), *Impatiens lanbianensis* Tardieu, and *Prunus javanica* (Teijsm & Binn.) Miq. The results have never been published before. They are the basis to expand the evaluation of anti- *H. pylori* activity of other plants to the search for species with potential for use in the treatment of *H. pylori* in Vietnam.

Keywords: *H. pylori*, inhibitory effects, medicinal plants extracts.

Classification number: 3.4

(bioMérieux), Amocillin (đối chứng dương), DMSO (đối chứng âm), methanol, eppendorf có BHI (Brain heart infusion của Difco, East Molesey, UK) và 10% glycerol dùng để bảo quản chủng giống, hóa chất nhuộm Gram, hydrogen peroxyde (H₂O₂) 3%, phenylenediamine dihydrochloride 1%, băng nhựa Pylori-test.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập chủng vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy: kỹ thuật nuôi cấy *H. pylori* được tiến hành theo quy trình của D.T.T. Trung và cs (2018) [6].

Mẫu sinh thiết được nhuộm Giemsa xác định sự có mặt của vi khuẩn *H. pylori*. Mẫu dương tính được nghiền nát và cấy vào môi trường OXOID có bổ sung 10% máu cừu và kháng sinh chọn lọc cho phân lập *H. pylori*. Các đĩa thạch được ủ ở 37°C trong điều

kiện vi hiếu khí tạo bởi túi bioMérieux. Đọc kết quả sau 5-7 ngày. Tiến hành xác định vi khuẩn *H. pylori* bằng các thử nghiệm như: nhuộm gram, khả năng sinh các enzym urease, catalase và oxidase.

Phương pháp tạo cao chiết MeOH: Từ các mẫu thực vật thu được, tạo ra cao chiết tổng MeOH theo quy trình sau: các mẫu thực vật được rửa sạch, sấy khô ở 50°C và xay nhỏ thành bột. Bột khô của mỗi mẫu thực vật (25 g) được ngâm chiết 3 lần với MeOH (100 ml) trên thiết bị chiết siêu âm (Ultrasonic 2010, 950 W) ở nhiệt độ 40-50°C, thời gian chiết mỗi lần tối thiểu 30 phút. Dịch chiết của 3 lần chiết được lọc qua giấy lọc (Whatman, d=25 mm, No 1) gộp lại và tiến hành cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ dưới 50°C thu được cao chiết tổng MeOH. Cân và tính lượng cao chiết phần trăm hiệu suất. Bảo quản mẫu trong các lọ đựng cao chiết (theo tiêu chuẩn bảo quản mẫu) và đặt trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C cho đến khi thử hoạt tính.

Sàng lọc khả năng ức chế H. pylori của các cao chiết: Việc sàng lọc khả năng ức chế *H. pylori* của các cao chiết được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [14]. Theo đó, hoạt tính đối kháng vi sinh vật kiểm định được đánh giá bằng cách đo đường kính vòng ức chế vi sinh vật (DK) theo công thức:

$$DK (mm) = D - d$$

với D là đường kính vòng vô khuẩn và d là đường kính khoan giấy.

Vi khuẩn *H. pylori* được chuẩn bị có độ đục chuẩn McFarlands 2 (OD₆₂₅=0,451, khoảng 6x10⁸ tế bào), sau đó cấy dịch khuẩn lên các đĩa môi trường Columbia agar có bổ sung 10% máu cừu (100 µl/đĩa). Các mẫu cao được cân và hoà tan trong DMSO để thu được dung dịch có nồng độ là 100 mg/ml. Trước khi thử hoạt tính, 5 µl dịch chiết (nồng độ 100 mg/ml) được nhỏ lên trên khoan giấy thấm đã khử trùng (đường kính 5 mm), để khô và bảo quản ở 4°C. Mẫu đối chứng dương là khoan giấy thấm 5 µl kháng sinh amoxicillin (20 mg/ml), đối chứng âm là khoan giấy thấm 5 µl DMSO 100%. Sau khi cấy vi khuẩn, các khoan giấy được đặt lên bề mặt thạch và nuôi ở điều kiện vi hiếu khí, 37°C. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Đọc kết quả: Quan sát thời gian xuất hiện vòng kháng khuẩn và đo đường kính vòng kháng khuẩn (nếu có) sau 7 ngày ủ đĩa.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel, so sánh Anova 1 yếu tố với phép thử Duncan ($\alpha=0,05$) trên phần mềm SPSS 16.0.

3. Kết quả

3.1. Phân lập và bảo quản chủng *H. pylori*

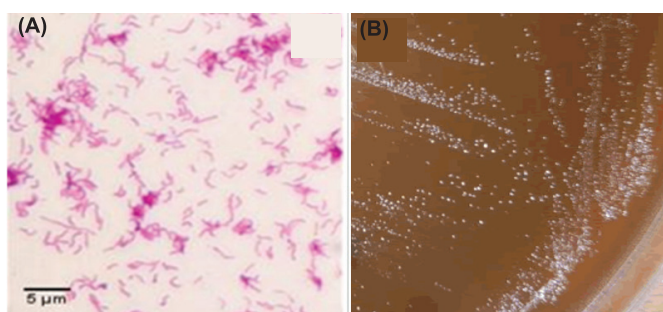
Đã tiến hành phân lập *H. pylori* từ mẫu sinh thiết dạ dày, kết quả chủng *H. pylori* được phân lập lâm sàng có các đặc điểm:

Hình thái: Khuẩn lạc nhỏ, tròn khoảng 1 mm như đầu đinh ghim, màu xám nhạt, trong suốt, lồi lên khỏi mặt thạch.

Nhuộm gram: Dưới kính hiển vi quang học với vật kính đầu 100x, sẽ nhìn thấy các vi khuẩn nhỏ, có hình cung hoặc cánh chim hải âu, bắt màu hồng của vi khuẩn Gram âm, đường kính 0,3-1 μm , dài 1,5-5 μm với 4-6 lông ở mỗi đầu.

Khả năng sinh các enzym urease, catalase, oxidase: thử nghiệm urease (+), oxydase (+), catalase (+).

Bảo quản: Chủng *H. pylori* được bảo quản trong môi trường Brain Heart Infusion (BHI) có bổ sung 5% máu cừu và 10% glycerol ở nhiệt độ 4°C để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn *H. pylori*. (A) Tế bào vi khuẩn; (B) Khuẩn lạc.

3.2. Lượng cao chiết tổng số từ các mẫu thực vật

Với 10 mẫu thực vật dùng trong nghiên cứu, sau khi chiết bằng dung môi MeOH thu được 10 mẫu cao chiết khác nhau. Sau khi làm khô, tổng lượng cao khô methanol của các mẫu nằm trong khoảng 2,52-5,76 g (tương đương 10,08-23,04%). Kết quả tạo cao chiết được chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả hàm lượng cao chiết thu được từ 10 mẫu thực vật.

STT	Số hiệu tiêu bản	Tên khoa học	Tên địa phương	Họ	Bộ phận dùng	Cao MeOH (%)
1	TN3/044	<i>Mitrephora thorelii</i>	Mạo dài	Annonaceae		23,04
2	TN3/073	<i>Embelia ribes</i>	Chua ngút	Myrsinaceae		10,08
3	TN3/145	<i>Mahonia nepalensis</i>	Hoàng liên gai	Berberidaceae		18,54
4	TN3/191	<i>Derris malaccensis</i>	Cốc kèn Mã Lai	Fabaceae		15,66
5	TN3/355	<i>Desmodium laxiflorum</i>	Trăng quả trái	Fabaceae		
6	TN3/435	<i>Maclura fruticosa</i>	Vàng lò bụi	Moraceae	Lá và cành nhỏ	11,05
7	TN3/658	<i>Hedyostictis capitellata subpubescens</i>	An điền mềm	Rubiaceae		13,21
8	TN3/129	<i>Aralia hiepihana</i>	Aralia	Araliaceae		16,84
9	TN3/331	<i>Impatiens lanbianensis</i>	Móng tai Langbiang	Balsamiaceae		20,29
10	TN3/928	<i>Prunus javanica</i>	Hoa anh đào	Rosaceae		12,95

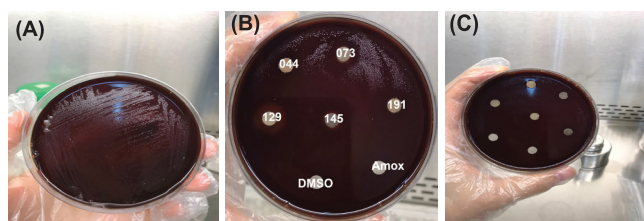
3.3. Khả năng ức chế *H. pylori* của một số cao chiết

Kết quả đánh giá khả năng ức chế *H. pylori* được thể hiện ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Đường kính vòng vô khuẩn của các mẫu cao chiết.

Số hiệu tiêu bản	Cao chiết	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	$\bar{X} \pm SD$
TN3/044	Mạo dài	7	7	7	7 $\pm$ 0
TN3/073	Chua ngút	7	6	7	6,7 $\pm$ 0,47
TN3/145	Hoàng liên gai	x	x	x	x
TN3/191	Cốc kèn Mã Lai	x	x	x	x
TN3/355	Trăng quả trái	x	x	x	x
TN3/435	Vàng lò bụi	7	7	6	6,7 $\pm$ 0,47
TN3/658	An điền mềm (dạ cảm)	x	x	x	x
TN3/129	Aralia	x	x	x	x
TN3/331	Móng tai Langbiang	6	6	7	6,3 $\pm$ 0,58
TN3/928	Hoa anh đào	6	6	6	6 $\pm$ 0
DMSO	Dimethyl sulfoxit (đối chứng âm)	0	0	0	0
Amox	Amoxicilin (đối chứng dương)	8	8	8	8

x: không xác định được vòng kháng khuẩn do vi khuẩn mọc thưa, yếu hoặc không mọc; X: giá trị trung bình của những lần lặp lại.



Hình 2. Vi khuẩn trên đĩa không đặt mẫu (A) và có đặt mẫu (B, C).

Kết quả cho thấy (sau 3 lần lặp lại), trong cùng điều kiện nuôi (vi hiếu khí, nhiệt độ 37°C) và cùng lượng giống [100 μl dịch khuẩn/đĩa với McFarland 2 ($OD_{625} = 0,451$, khoảng 6×10^8 tế bào)], sau khoảng 5 ngày đặt mẫu thấy xuất hiện vòng vô khuẩn và sau 7 ngày vòng vô khuẩn thể hiện rõ (với những mẫu có đường kính vòng vô khuẩn). Sau 7 ngày nuôi cấy đối với những đĩa không đặt mẫu thì vi khuẩn mọc dày, đều (hình 2A). Tuy nhiên, ở những đĩa có đặt mẫu thì hầu hết vi khuẩn đều mọc rất thưa, yếu, thậm chí không mọc (hình 2B và C). Trong khi đó, đối chứng dương 5 μl Amoxicilin (20 mg/ml) cho đường kính vòng kháng khuẩn là 8 mm, với đối chứng âm DMSO (100%) vi khuẩn vẫn mọc xung quanh đĩa giấy và không xuất hiện vòng vô khuẩn. Vì vậy, trong điều kiện thí nghiệm này 10 mẫu cao chiết thử nghiệm đều có khả năng ức chế sự sinh trưởng của *H. pylori* với mỗi dịch chiết có nồng độ 100 mg/ml trên 1 khoanh giấy thấm đã khử trùng (đường kính 5 mm). Sự ức chế vi khuẩn *H. pylori* của các mẫu khác nhau có khác nhau. Ở đây có thể chia làm 2 nhóm: nhóm 1, gồm một số mẫu vi khuẩn mọc yếu nhưng vẫn cho đường kính vòng kháng khuẩn như: Mạo dài, Chua ngút, Vàng lò bụi, Móng tai Langbiang, Hoa anh đào với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình 6-7 mm. Nhóm 2, gồm những mẫu mà vi khuẩn mọc rất yếu, thậm chí không mọc và không quan sát được vòng kháng khuẩn như: Hoàng liên gai, Cốc kèn Mã Lai, Trăng quả trái, An điền mềm, Aralia. Sự khác nhau này có thể do mỗi một cây hoặc một nhóm cây có những hợp chất kháng *H. pylori* khác nhau [2].

So sánh công bố trước đây trên một số thảo dược khác của Việt Nam như D.T.T. Trung và cs (2018) [6] khi đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *H. pylori* của 30 dịch chiết thảo dược Việt Nam các tác giả sử dụng nồng độ cao chiết là 200 mg/ml thì đường kính vòng kháng khuẩn là từ 12 đến 42 mm. Tuy nhiên, với 10 mẫu mà chúng tôi thử nghiệm tại nồng độ 100 mg/ml đều cho kết quả ức chế sự phát triển của *H. pylori*, đặc biệt là cao chiết từ Hoàng liên gai, Cóc kèn Mã Lai, Tràng quả trái, An điền mềm, Aralia gây ức chế hoàn toàn. Với những kết quả ban đầu như vậy, chúng tôi hy vọng Hoàng liên gai, Cóc kèn Mã Lai, Tràng quả trái, An điền mềm, Aralia là những mẫu có hoạt tính ức chế sự phát triển của *H. pylori* mạnh hơn những mẫu công bố trước đây của D.T.T. Trung và cs [6].

Trong 10 mẫu thực vật mà chúng tôi nghiên cứu có 2 mẫu đã được nghiên cứu về thành phần hóa học, đó là TN3/044 *Mitrephora thorelii* và TN3/129 *Aralia hiepihana*. N.T.D. Thuan và cs (2014) [15] đã phân lập được 4 hợp chất flavonoid từ lá cây Mạo đài là: astragalin, juglanin, quercetin và quercitrin. Từ các dịch chiết phân đoạn của lá cây *Aralia hiepihana*, bằng các phương pháp sắc ký bước đầu đã phân lập được 7 hợp chất sạch: *n*-nonacosano, β -sistosterol, kaempferol, quercetin, apigenin 7-O- β -glucoside, kaempferitrin, kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranoside. Các hợp chất trên lần đầu tiên được phân lập từ loài *Aralia hiepihana* [16]. Dựa trên kết quả điều tra, sàng lọc nguồn tài nguyên dược liệu thực vật tỉnh Lâm Đồng theo định hướng hoạt tính sinh học, các nhà khoa học đã phát triển các loài dược liệu có giá trị cao [13]. Từ 1003 cao chiết tổng MeOH của 1003 loài thực vật có 202 mẫu đã được thử hoạt tính kháng 4 loại vi khuẩn kiểm định (*Escherichia coli* (ATTC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC 25922), *Bacillus subtilis* (ATTC 11774), *Staphylococcus aureus* (ATTC 11632)), hoạt tính chống oxy hóa và gây độc tế bào ung thư. 10 mẫu mà chúng tôi sử dụng có TN3/044 Mạo đài có khả năng kháng *Bacillus subtilis* (ATTC 11774) ở nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) 200 μ g/ml và TN3/355 Tràng quả trái có khả năng kháng *Staphylococcus aureus* ở MIC là 200 μ g/ml. Những mẫu còn lại chưa được thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định. Về hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro* có TN3/435 Vàng lồ bụi dương tính với dòng tế bào RD (Human rhabdomyosarcoma - ung thư mô liên kết) và TN3/331 Móng tai Langbiang dương tính với 2 dòng tế bào RD và Hep-G2 (Human hepatocellular carcinoma - ung thư gan). Về hoạt tính chống oxy hóa, TN3/044 có hoạt tính chống oxy hóa mạnh (SC_{50} 167,3 μ g/ml), TN3/331 (SC_{50} 139,5 μ g/ml) và TN3/355 có khả năng bắt gốc tự do yếu.

Với nguồn dược liệu phong phú này trong thời gian tới sẽ mở rộng quy mô sàng lọc hoạt tính sinh học để phát hiện nhiều loài dược liệu có tiềm năng. Đặc biệt, cần có những nghiên cứu sâu hơn để xác định được mẫu thực vật nào có tiềm năng nhất trong việc ức chế *H. pylori* cũng như chiết tách và phân lập các hợp chất có tiềm năng cho thử nghiệm tác dụng ức chế *H. pylori*.

4. Kết luận

Nội dung chính của công trình nghiên cứu là đánh giá khả năng ức chế *H. pylori* của một số mẫu cao chiết methanol thực vật thu được tại Lâm Đồng. Kết quả nghiên cứu đã xác định 10 mẫu cao chiết có khả năng ức chế *H. pylori* với nồng độ 100 mg/ml, trong đó 5 mẫu ức chế hoàn toàn là Hoàng liên gai, Cóc kèn Mã Lai, Tràng quả trái, An điền mềm, Aralia và 5 mẫu ức chế với đường kính vòng vô khuẩn đạt 6-7 mm là Mạo đài, Chua ngút, Vàng lồ bụi, Móng tai Langbiang, Hoa anh đào. Hoàng liên gai, Cóc kèn Mã Lai, Tràng quả trái, An điền mềm, Aralia nên được lựa chọn để thử hoạt tính ở các nồng độ thấp hơn cũng như chiết tách và phân lập các hợp chất có tiềm năng cho thử nghiệm tác dụng ức chế *H. pylori*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Owen (1995), "Bacteriology of *Helicobacter pylori*", *Baillieres Clin. Gastroenterol*, **9**(3), pp.415-446.
- [2] Y. Wang (2014), "Medicinal plants and *H. pylori*-induced diseases", *World J. Gastroenterol.*, **20**(30), pp.10368-10382.
- [3] P. Kosikowska, L. Berlicki (2011), "Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review", *Expert Opin. Ther. Pat.*, **21**, pp.945-957.
- [4] H. Mobley, L.T. Hu, P.A. Foxal (1991), "Helicobacter pylori urease: properties and role in pathogenesis", *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, **187**, pp.39-46.
- [5] D. Forman (1996), "Helicobacter pylori and gastric cancer", *Scand. J. Gastroenterol.*, **215**, pp.48-51.
- [6] D.T.T. Trung, P.B. Yên, P.T. Vui, et al. (2018), "Evaluating the ability of some Vietnamese herbal extracts to inhibit *Helicobacter pylori* bacteria", *Vietnam Journal of Science and Technology*, **60**(7), pp.23-27 (in Vietnamese).
- [7] M. Balunas, A. Kinghorn (2005), "Drug discovery from medicinal plants", *Life Sci.*, **78**, pp.431-441.
- [8] D. Soejarto, C. Gyllenhaal, M. R. Kadushin, et al. (2012), "An ethnobotanical survey of medicinal plants of Laos toward the discovery of bioactive compounds as potential candidates for pharmaceutical development", *Pharm. Biol.*, **50**(1), pp.42-60.
- [9] L. Cellini, E.D. Campli, M. Masulli, et al. (1996), "Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*)", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **13**(4), pp.277-279.
- [10] S. Maliheh, M.S. Ardakani, A. Foroumadi, et al. (2015), "Medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections", *Pharm. Biol.*, **53**(7), pp.939-960.
- [11] S. George, C. Clarkson, V. Mahara, et al. (2003), "In vitro anti - *Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines", *Journal of Ethnopharmacology*, **88**, pp.175-179.
- [12] E. Bae, M.J. Han, N.J. Kim, et al. (1998), "Anti - *Helicobacter pylori* activity of herbal medicines", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **21**(9), pp.990-992, DOI: 10.1248/bpb.21.990.
- [13] N.H.T. Phan (2016), *Report on Results of The Project Investigating and Screening Plant Medicinal Resources in Lam Dong Province According to Biological Activity Orientation to Develop High-value Medicinal Herbs (code: TN3/T14)* (in Vietnamese).
- [14] C. Njume, N.O. Donkorm, T. Vasiljevic, et al. (2011), "In-vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of acetone, ethanol and methanol extracts of the stem bark of *Combretum molle* (Combretaceae)", *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(14), pp.3210-3216.
- [15] N.T.D. Thuan, P. Toan, N.T.T. Hien, et al. (2014), "Flavonoid compounds from leaves of *Mitrephora thorelii* Pierre (Annonaceae)", *Journal of Science and Technology, VAST*, **52**(5A), pp.358-363 (in Vietnamese).
- [16] N.T.D. Thuan, T. Phan, N.T.D. Hien, et al. (2018), "Flavonoids from the leaves of *Aralia hiepihana*", *Vietnam Journal of Science and Technology*, **56**(4A), pp.259-265, DOI: 10.15625/2525-2518/56/4A/12882.

Đặc điểm di truyền ở bệnh nhân Covid-19: tình hình nghiên cứu, triển vọng và thách thức trong điều trị Covid-19

Vũ Phương Nhung¹, Trần Thị Bích Ngọc¹, Nguyễn Đăng Tôn¹, Lê Thị Thu Hiền¹, Nguyễn Thùy Dương¹, Phạm Ngọc Thạch², Nông Văn Hải¹, Nguyễn Hải Hà^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương, xã Kim Chung, huyện Đông Anh, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/9/2021; ngày chuyển phản biện 24/9/2021; ngày nhận phản biện 15/10/2021; ngày chấp nhận đăng 19/10/2021

Tóm tắt:

Sự xuất hiện của virus viêm đường hô hấp cấp SARS-CoV-2 đã dẫn đến đại dịch Covid-19 trên toàn thế giới. Xác định các yếu tố nguy cơ khiến bệnh tiến triển nặng cũng như đánh giá mức độ đa dạng về tình trạng bệnh của người nhiễm SARS-CoV-2 đã trở thành một trong những mối quan tâm hàng đầu của các nhà khoa học. Các yếu tố nguy cơ đã biết bao gồm tuổi cao và bệnh nền của bệnh nhân có liên quan đến tình trạng bệnh Covid-19 tiến triển nặng. Ngoài ra, hàng loạt nghiên cứu bệnh/chứng, mô phỏng, docking, dự đoán *in silico* cũng như đánh giá tương quan toàn hệ gen đã được thực hiện trên nhiều quần thể người khác nhau gần đây đã đạt được một số kết quả quan trọng. Trong đó, các nhóm gen được báo cáo nhiều nhất nằm trong các con đường nhiễm của SARS-CoV-2, phản ứng miễn dịch của cơ thể chủ và gen quy định nhóm máu. Các biến thể di truyền hoặc locus gen có thể đóng vai trò bảo vệ cơ thể, tăng tính miễn dịch hoặc có liên quan đến tình trạng bệnh nặng hay tử vong đã được phân tích chi tiết. Mặc dù các kết quả tổng hợp đều được rút ra thông qua các phân tích thống kê, mô phỏng, nhưng đây là những thông tin khởi đầu rất có ý nghĩa cho những nghiên cứu sâu về cơ chế bệnh sinh của Covid-19 và y học cá thể hóa trong tương lai.

Từ khóa: biến thể di truyền, Covid-19, di truyền cơ thể chủ, GWAS, SARS-CoV-2.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Mở đầu

Đại dịch viêm đường hô hấp cấp Covid-19 do virus SARS-CoV-2 đã gây ra những ảnh hưởng nặng nề đối với hệ thống y tế, kinh tế và an sinh xã hội trên toàn thế giới. Đặc điểm lâm sàng của các bệnh nhân Covid-19 rất đa dạng, từ không biểu hiện triệu chứng tới bệnh cảnh suy hô hấp cấp nguy kịch và đe dọa tính mạng. Mặc dù các con số thống kê ban đầu cho thấy, các yếu tố như bệnh nền, tuổi cao hay giới tính có mối liên quan với nguy cơ tiến triển bệnh nặng nhưng chưa đủ để giải thích sự khác biệt đã ghi nhận trong đáp ứng của các cá thể khi bị lây nhiễm virus SARS-CoV-2. Nghiên cứu về đặc điểm di truyền của cá thể liên quan tới cách thức cơ thể phản ứng khi tiếp xúc với mầm bệnh là cơ hội làm sáng tỏ những nguyên nhân bệnh sinh, phát hiện đích tác dụng của thuốc, dự đoán phản ứng của người bệnh với liệu pháp điều trị và tiêm chủng. Đối với bệnh truyền nhiễm, nhiều nghiên cứu triển khai theo hướng phân tích từng ca bệnh hoặc đánh giá tương quan toàn bộ hệ gen (Genome wide association studies - GWAS) đã chỉ ra một số biến thể trên hệ gen người bệnh liên quan đến những đặc điểm lâm sàng nhất định. Cụ thể, đối với bệnh sốt rét, áp lực của chọn lọc tự nhiên thể hiện rõ rệt trên một số quần thể có khả năng kháng lại căn bệnh này như đột biến gây tan máu bẩm sinh ở các khu vực Địa Trung Hải, Tây Á, châu Á, sự vắng mặt của nhóm máu Duffy ở Tây Phi, hemoglobin E ở Nam Á và hemoglobin C ở Tây Phi. Những biến đổi trong gen mã hóa cho thụ thể CCR5 (ví dụ như CCR5Δ32) làm suy giảm sự xâm nhập của virus HIV vào tế bào T, từ đó làm chậm tiến triển của hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS). Ngoài ra, locus gen

MICB và biến thể rs3765524 của gen *PLCE1* đã được báo cáo là có liên quan đến hội chứng sốc sốt xuất huyết Dengue.

Trong những năm qua, các công bố về yếu tố di truyền người tham gia vào đáp ứng của cá thể với các bệnh truyền nhiễm bao gồm các nhóm gen sau: mã hóa cho thụ thể trên bề mặt tế bào, mã hóa cho các protein đáp ứng miễn dịch, quy định các thành phần của huyết sắc tố. Những nghiên cứu trên quy mô lớn hứa hẹn sẽ cung cấp những hiểu biết sâu sắc về mối liên kết giữa hệ gen cơ thể chủ - mầm bệnh, tạo cơ sở quan trọng cho những tiếp cận xa hơn với hệ gen cá thể, nhằm hỗ trợ công tác phòng ngừa và điều trị hiệu quả các bệnh truyền nhiễm. Đối với đại dịch Covid-19 trong thời gian gần đây, việc tiếp cận và khai thác chi tiết đặc điểm di truyền của các cá nhân mắc bệnh với những triệu chứng lâm sàng đa dạng là công việc rất cấp thiết. Chúng tôi sẽ khái quát một số kết quả khảo sát đa dạng hệ gen bệnh nhân Covid-19 của cộng đồng khoa học trên thế giới và thảo luận về những xu hướng nghiên cứu trong tương lai.

2. Tiêu chí sàng lọc và chọn lựa nguồn tài liệu

Tìm kiếm trên ngân hàng dữ liệu PubMed với các từ khóa liên quan (Covid-19 host genetics, Covid-19 susceptibility, Covid-19 severity, SARS-CoV-2, Covid-19 GWAS) cập nhật đến thời điểm tháng 9/2021. Các thiết kế nghiên cứu được tham khảo bao gồm: tổng quan tài liệu, tổng quan hệ thống, nghiên cứu bệnh chứng, nghiên cứu GWAS, nghiên cứu phân tích tổng hợp bệnh chứng, nghiên cứu đoàn hệ, các bằng chứng *in vitro*, các phân tích *in silico*.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenhaiha@igr.ac.vn

Host genetic variation and Covid-19 disease: Recent discoveries, prospects and challenges in the treatment of Covid-19

Phuong Nhung Vu¹, Thi Bích Ngọc Tran¹,
Dang Ton Nguyen¹, Thi Thu Hien Le¹,
Thuy Duong Nguyen¹, Ngọc Thạch Phạm²,
Van Hai Nong¹, Hai Ha Nguyen^{1*}

¹Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghĩa Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

²National Hospital for Tropical Diseases, Kim Chung Commune, Dong Anh District, Ha Noi, Vietnam

Received 20 September 2021; revised 15 October 2021; accepted 19 October 2021

Abstract:

The emergence of the acute respiratory infection virus SARS-CoV-2 has spread the Covid-19 pandemic over the world. Identifying the risk factors relevant to Covid-19 clinical features, given the striking difference in the clinical symptoms observed from SARS-CoV-2 infected individuals, have become one of the primary concerns among scientists. It has been well-known that host factors such as older age and comorbidities are associated with higher severity. Recently, numerous case/control studies, simulations, docking, *in silico* prediction, and genome-wide association study (GWAS) performed in various human populations have achieved many significant results. The reported genetic variants were mostly categorised into the SARS-CoV-2 entry pathway, host immune responses and ABO blood groups. Genetic variants or loci that may play a protective role, increase susceptibility or be associated with severity/mortality have been analysed in detail. Despite the results being all drawn through statistical analysis and simulation, the knowledge still deserves consideration as supporting materials for in-depth studies on the pathogenesis of Covid-19 and personalised medicine in the forthcoming years.

Keywords: Covid-19, genetic variant, GWAS, host genetics, SARS-CoV-2.

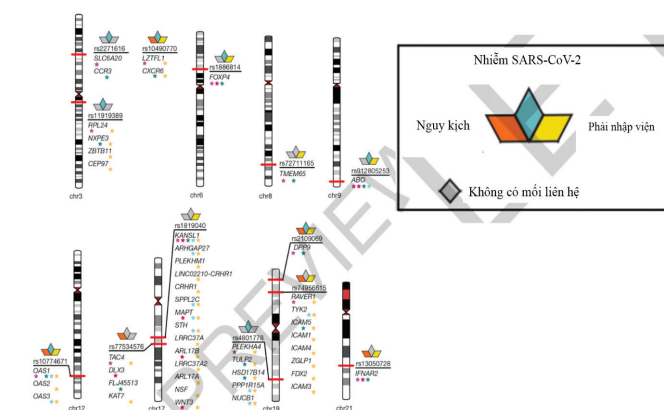
Classification number: 3.5

3. Tình hình nghiên cứu quốc tế về hệ gen cơ thể chủ của Covid-19

Trong vòng hơn 1 năm trở lại đây, các nhà khoa học và các nhà nghiên cứu lâm sàng đã và đang cố gắng tìm hiểu lý do vì sao diễn biến của Covid-19 ở các bệnh nhân lại rất khác nhau. Bên cạnh những yếu tố đã biết như tuổi cao, tình trạng bệnh nền và điều kiện kinh tế, xã hội khác nhau thì đặc điểm hệ gen của cơ thể chủ cũng được cho là một yếu tố đóng vai trò quan trọng đối với tình trạng bệnh trở nặng. Việc xác định được những yếu tố đóng vai trò then chốt trong hệ gen của người bệnh có thể làm sáng tỏ

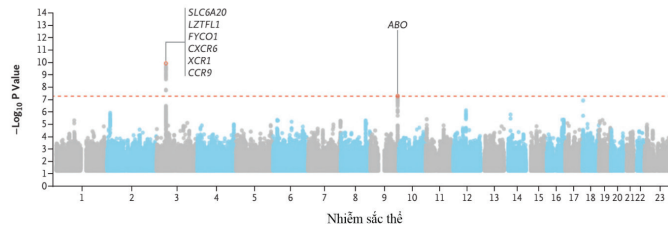
những cơ chế sinh học có liên quan đến liệu pháp điều trị cũng như mối quan hệ nhân quả giữa sự biến động của các yếu tố nguy cơ với quá trình lây nhiễm virus và diễn biến ở bệnh nhân. Các tổ chức: Sáng kiến Di truyền Cơ thể chủ Covid-19 (Covid-19 Host Genetics Initiative) và Nỗ lực nghiên cứu Di truyền người mắc Covid (Covid Human Genetic Effort) đã nhanh chóng được thành lập vào tháng 4/2020. Đây là những hệ thống mạng lưới liên kết các nhà khoa học và trung tâm nghiên cứu đa quốc gia, nhằm chia sẻ các cơ sở dữ liệu về hệ gen cơ thể chủ, từ đó phối hợp phân tích bộ dữ liệu lớn và khám phá những yếu tố nguy cơ trong tính miễn cảm và mức độ nguy kịch của bệnh nhân Covid-19 [1], mặt khác cũng truy tìm yếu tố di truyền và đáp ứng miễn dịch là nguyên nhân trực tiếp gây nên những ca bệnh thể hiện tính dễ kháng cao với virus hoặc diễn biến nặng ở các bệnh nhân Covid-19 [2]. Động lực chính thúc đẩy hoạt động của các tổ chức này là tiềm năng ứng dụng của những kiến thức khoa học mới trong việc nâng cao chất lượng quản lý lâm sàng và cải thiện hiệu quả điều trị.

Các hướng tiếp cận sử dụng GWAS hoặc các ngành khoa học khác nhau có thể được áp dụng để xác định những biến thể di truyền cũng như khám phá mạng lưới sinh học của mối tương tác giữa cơ thể chủ và mầm bệnh [3]. GWAS là một phương pháp tiếp cận thông qua khảo sát toàn hệ gen/hệ mã hóa được áp dụng trong nghiên cứu di truyền nhằm xác định những biến thể liên quan đến một tính trạng cụ thể nào đó. Các công bố gần đây nhất dựa trên nghiên cứu GWAS đã xác định được các locus nhạy cảm với bệnh cảnh suy hô hấp ở bệnh nhân Covid-19 thuộc nhiễm sắc thể số 3 (*SLC26A20*, *LZTFL1*, *FYCO1*, *CXCR6*, *XCRI*, *CCR9*) và số 9 (*ABO*) [4], ngoài ra, có 13 locus gen đã được xác định là có liên quan đến khả năng nhiễm virus và tiên lượng nặng của bệnh nhân [5]. Một phần kết quả từ các nghiên cứu GWAS được thể hiện ở hình 1 và 2. Một nghiên cứu khác trên 2.393 bệnh nhân Covid-19 và 3.298 đối chứng khỏe mạnh ở Nhật Bản cho thấy, biến thể rs60200309 (g.169519612G>A) thuộc vùng không mã hóa của gen *DOK2* có mối tương quan với tình trạng nguy kịch của các bệnh nhân dưới 65 tuổi. Đây là biến thể gen xuất hiện phổ biến ở khu vực Đông Á với tần số là 0,097 [6]. Tương tự, những dữ liệu hệ gen đơn bội *HLA* hay gen quy định nhóm máu ABO cũng có thể



Hình 1. Kết quả nghiên cứu GWAS trên bệnh nhân Covid-19 [5]. Có 13 locus gen trên 8 nhiễm sắc thể đã được xác định là có mối liên hệ với những tình trạng bệnh khác nhau của bệnh nhân.

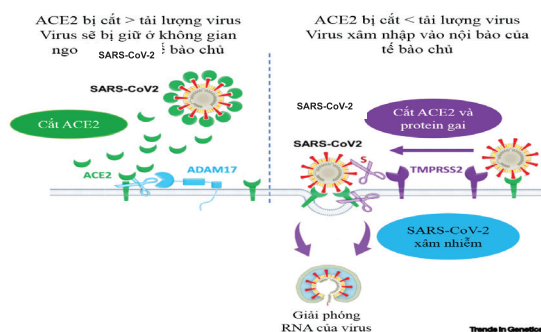
được đánh giá mối tương quan với độ nhạy cảm, sức đề kháng và các biến chứng ở bệnh nhân Covid-19 [7]. Ngoài ra, việc liên kết dữ liệu hệ gen với hồ sơ sức khỏe điện tử có thể được tận dụng để điều tra ảnh hưởng của yếu tố di truyền đối với biểu hiện lâm sàng ở những người nhiễm SARS-CoV-2 [8].



Hình 2. Sơ đồ Manhattan về mối liên hệ của 2 locus gen nhạy cảm với bệnh cảnh suy hô hấp của các ca bệnh Covid-19 nguy kịch [4]. Hai locus gen gồm có *SLC6A20*, *LZTFL1*, *FYCO1*, *CXCR6*, *XCR1*, *CCR9* (nhiễm sắc thể số 3) và *ABO* (nhiễm sắc thể số 9). Đường giới hạn màu đỏ hiển thị ngưỡng ý nghĩa thống kê trên toàn hệ gen với giá trị $P < 5 \times 10^{-8}$.

4. Nhóm gen liên quan đến quá trình xâm nhập tế bào của virus

Để xâm nhập vào tế bào người, virus SARS-CoV-2 sử dụng enzyme chuyển hóa angiotensin 2 (*ACE2*) để gắn với domain liên kết với thụ thể của nó (Receptor binding domain - RBD) và serine protease xuyên màng (*TMPRSS2*) để cắt protein gai. Khi protein gai của virus đã bị cắt bởi *TMPRSS2* sẽ khởi động cho quá trình xâm nhập vào tế bào và hỗ trợ virus tránh được sự tấn công của hệ miễn dịch. Mặt khác, protein màng *ADAM17* tham gia thủy phân thụ thể *ACE2* nhưng không tác động lên protein gai của virus, kết quả là thụ thể *ACE2* bị tách vào không gian ngoại bào và giữ cho tế bào tránh bị virus xâm nhiễm (hình 3). Thực tế dữ liệu trước đây cho thấy, hiệu quả tách khỏi màng tế bào của thụ thể *ACE2* là kết quả của quá trình tinh chỉnh phụ thuộc vào 2 protein *TMPRSS2* và *ADAM17* [9]. Như vậy, sự đa dạng về mặt di truyền của các gen mã hóa cho các protein *ACE2*, *TMPRSS2* và *ADAM17* có thể là yếu tố tiềm năng gây ra những khác biệt trong đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân Covid-19.



Hình 3. Mô hình giả thuyết về sự trung hòa virus ở không gian ngoại bào liên quan đến thụ thể *ACE2* [10]. Khi lượng *ACE2* bị cắt lớn hơn tải lượng virus thì virus sẽ không tiếp cận được tế bào chủ, ngược lại khi lượng *ACE2* bị cắt nhỏ hơn tải lượng virus thì virus có cơ hội xâm nhiễm cao hơn. Quá trình này liên quan đến sự điều chỉnh và tham gia của các protein thủy phân là *ADAM17* và *TMPRSS2*.

Trong đợt bùng phát dịch SARS (giai đoạn 2002-2003), các nhà khoa học đã chứng minh rằng, một số đột biến gen mã hóa cho thụ thể *ACE2* ở người có liên quan tới mức độ biểu hiện của thụ thể này trên bề mặt tế bào và từ đó dẫn tới hiệu quả xâm nhập của virus khác nhau giữa các cá thể [11]. Hiện nay, có 25 biến thể khác nhau của *ACE2* đã được công bố trên cơ sở dữ liệu mở về biến thể di truyền Leiden (Leiden open variation database - LOVD), trong khi đó, có tới 1.700 biến thể của gen này đã được tổng hợp tại các cơ sở dữ liệu như ChinaMAP và 1 KGP. Trong số đó, 2 allele của gen này là rs73635825 và rs143936283 làm giảm ái lực của thụ thể với protein gai của SARS-CoV-2, từ đó giảm khả năng bị virus xâm nhập và người mang biến thể gen, do vậy cũng có khả năng đề kháng với virus này [12]. Một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy, những biến thể gen *ACE2* trong quần thể gây ảnh hưởng đến ái lực với protein của virus, góp phần gây tổn thương phổi hoặc tổn thương hệ thống ở bệnh nhân Covid-19 thông qua việc tăng cường phản ứng viêm, đông máu, tăng tính thấm của mao mạch và quá trình tự chết của các tế bào phế nang. Đầu năm 2020, một nghiên cứu khảo sát tần số của 1.700 biến thể gen *ACE2* trên các quần thể người khác nhau cho thấy, có 11 biến thể phổ biến và 1 biến thể hiếm của gen này có vai trò tăng cường biểu hiện của thụ thể *ACE2* [13]. Đặc biệt trong số này, biến thể gen rs4646127 trong intron của *ACE2* có liên quan đến sự biểu hiện mạnh nhất ở người Đông Á. Qua đó, có thể phản ánh quần thể người châu Á sẽ có mức độ miễn dịch đặc thù khi đáp ứng với virus SARS-CoV-2 so với các quần thể khác nếu đặt trong cùng môi trường [13, 14]. Một nghiên cứu khác phân tích dữ liệu hệ gen hơn 290.000 mẫu thuộc hơn 400 quần thể người khác nhau đã xác định có ít nhất 9 biến thể gen *ACE2* được dự đoán là tăng độ nhạy cảm với virus, trong khi đó, 17 biến thể gen khác lại có tác dụng bảo vệ cơ thể khỏi sự xâm nhập của virus do có xu thế liên kết yếu hơn với protein gai của SARS-CoV-2 [15]. Những lập luận nêu trên cũng đã được khẳng định bởi một nghiên cứu độc lập khác dựa trên bằng chứng khi so sánh hiệu quả liên kết giữa các biến thể gen *ACE2* với RBD của SARS-CoV-2 [16]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu dựa trên mô phỏng docking về biến thể rs4646116 của *ACE2* đã đưa ra những kết quả trái ngược về ái lực tương tác giữa thụ thể khi mang biến thể gen này với protein gai của SARS-CoV-2 [17, 18].

Bên cạnh *ACE2*, hoạt động của enzyme *TMPRSS2* rất quan trọng đối với quá trình lây lan và sinh bệnh học ở vật chủ bị nhiễm virus. Enzyme này tham gia phân cắt *ACE2* và protein gai của SARS-CoV-2, ức chế enzyme này làm giảm khả năng xâm nhập của SARS-CoV-2 qua thụ thể *ACE2* trên màng tế bào phổi [19]. Gen mã hóa enzyme này có tính đa hình rất cao ở các quần thể người khác nhau. Nghiên cứu khảo sát tần số của 1.025 biến thể gen *TMPRSS2* từ cơ sở dữ liệu Genome aggregation database (gnomAD) cho thấy, biến thể rs35074065 đi kèm với sự biểu hiện mạnh protein này và do đó, có thể là một ứng viên liên quan đến tình trạng nặng của bệnh nhân Covid-19 [20, 21]. Đây là một biến thể gen cực hiếm ở khu vực Đông Á nhưng lại phổ biến ở Bắc Mỹ và châu Âu. Khai thác dữ liệu toàn bộ hệ gen mã hóa và SNP-array trên người Italia cho thấy, một nhóm allele đơn bội bao gồm ít nhất 9 biến thể gen rs463727, rs34624090, rs55964536, rs734056, rs4290734, rs34783969, rs11702475, rs35899679 và rs35041357

phổ biến ở người châu Âu và hoàn toàn không xuất hiện ở khu vực châu Á. Một điều thú vị là nhóm đơn bội này có mối liên hệ về mặt chức năng với rs8134378, đây là biến thể gen nằm ở vị trí tăng cường điều hòa biểu hiện gen *TMPRSS2*. Trong khi đó, nhóm đơn bội thứ 2 cũng được dự đoán liên quan đến mức độ biểu hiện mạnh của *TMPRSS2*, bao gồm 3 biến thể gen là rs2070788, rs9974589 và rs7364038. Đây cũng là những biến thể gen mà tần số xuất hiện cao ở người châu Âu [22]. Ngoài những thiết kế nghiên cứu bệnh - chứng/quần thể để khai thác những biến thể là nguy cơ lây nhiễm/liên quan đến tình trạng bệnh nặng, cũng có một hướng nghiên cứu khác phân tích toàn diện ảnh hưởng của những biến thể gen *TMPRSS2* đã biết liên quan đến đặc điểm chức năng của protein này. Một nghiên cứu công phu đã đánh giá ảnh hưởng của các biến thể gen *TMPRSS2* đến chức năng và cấu trúc của protein

Bảng 1. Một số biến thể gen *ACE2* và *TMPRSS2* liên quan đến các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân Covid-19.

Gen	Biến thể gen	Tần số allele kiểu đại	TLTK
Tăng tính miễn cảm			
<i>ACE2</i>	rs73635825 g.15618980A>G, p.Ser19Pro	Phân Lan: A=1; Mỹ gốc Phi: A=1; Nhật Bản: A=1; Trung Quốc (Hán): A=1; Việt Nam (Kinh): A=1	*
<i>ACE2</i>	rs778030746 g.15618974T>C, p.Ile21Val	Châu Âu: T=0,9999; Mỹ gốc Phi: T=1; Đông Á: T=1; Nam Á: T=1	#
<i>ACE2</i>	rs756231991 g.15618968C>T, p.Glu23Lys	Châu Âu: C=0,9999; Mỹ gốc Phi: C=1; Đông Á: C=1; Nam Á: C=1	# [15]
<i>ACE2</i>	rs4646116 g.15618958T>C, p.Lys26Arg	Châu Âu: T=0,9881; Mỹ gốc Phi: T=0,9998; Đông Á: T=1; Nam Á: T=1	#
Bảo vệ			
<i>ACE2</i>	rs201076681 g.61568669G>A, p.Glu37Lys	Châu Âu: G=0,9996; Mỹ gốc Phi: G=0,9990; Đông Á: G=0,9999; Nam Á: G=0,9986	#
Biểu hiện mạnh protein			
<i>TMPRSS2</i>	Nhóm đơn bội: rs2070788 g.42844988G>A; rs9974589 g.42842123A>C; rs7364038 g.39489623C>T	Phân Lan: G=0,4495; Mỹ gốc Phi: G=0,3229; Nhật Bản: G=0,2981; Trung Quốc (Hán): G=0,2767; Việt Nam (Kinh): G=0,4293	* [22]
<i>TMPRSS2</i>	rs35074065 g.42833520delC	Phân Lan: AC=0,6162; Mỹ gốc Phi: AC=0,8361; Nhật Bản: AC=0,9952; Trung Quốc (Hán): AC=0,9951; Việt Nam (Kinh): AC=0,9848	* [21]
<i>TMPRSS2</i>	rs12329760 g.42852497C>T p.Val160Met	Phân Lan: C=0,6364; Mỹ gốc Phi: C=0,6885; Nhật Bản: C=0,6058; Trung Quốc (Hán): C=0,5874; Việt Nam (Kinh): C=0,6768	* [24, 25]

TLTK: tài liệu tham khảo; *: tần số allele tham khảo từ cơ sở dữ liệu 1000 genome; #: cơ sở dữ liệu gnomAD.

này được tiến hành sử dụng các công cụ *in silico* như Ensembl, Gtex, ExPASy 2, KEGG, Polyphen-2, PROVEN, HSF, SIFT [23]. Trong số 11.184 biến thể gen thu được từ cơ sở dữ liệu dbSNP, chỉ có 92 biến thể có sự khác biệt về tần số giữa quần thể người châu Á so với các quần thể khác trên thế giới. Và cũng chỉ có 21 trong số này có tiềm năng ảnh hưởng đến chức năng và cấu trúc của protein *TMPRSS2* thông qua làm biến đổi sự gấp cuộn, chế biến protein sau dịch mã cũng như cơ chế cắt nối tự nhiên của mRNA và chức năng của miRNA. Ví dụ như biến thể rs12329760 được dự đoán sẽ hình thành nên vị trí hoạt động mới trong cấu trúc của protein. Biến thể rs12627374 lại có thể ảnh hưởng toàn diện đến một phổ rộng của các miRNA [23]. Chính biến thể gen rs12329760 cũng đã được dự đoán bằng mô hình nghiên cứu động học và mô phỏng cho thấy có khả năng làm giảm độ bền của protein *TMPRSS2* [24]. Mới đây, biến thể gen rs1239760 cũng đã được đánh giá là có thể liên quan đến tải lượng virus ở bệnh nhân Covid-19. Trong đó, người bệnh có kiểu gen CC (p.Val160) dường như có tải lượng virus cao hơn so với các bệnh nhân còn lại. Đây cũng là kiểu gen có tỷ lệ tử vong cao hơn trong số các bệnh nhân nguy kịch [25]. Tuy nhiên, không có mối liên quan giữa biến thể rs12329760 với sự tiến triển nặng của các bệnh nhân trong nhóm mẫu nghiên cứu [25]. Lý do được các tác giả lý giải là một số yếu tố khác cũng có thể góp phần vào tình trạng nặng của bệnh nhân như tuổi, giới tính và bệnh nền.

Đối với gen *ADAM17*, hiện nay chỉ có 3 biến thể gen cho thấy sự khác nhau giữa các quần thể người châu Á và châu Âu trong mối liên quan với đột quy (rs1524668) [26] và sốc nhiễm trùng (rs12692386) [27]. Đáng chú ý là các biến thể gen này đều nằm ở vùng điều hòa biểu hiện gen *ADAM17*, như vậy nhiều khả năng các biến thể gen ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của *ADAM17* cũng góp phần vào việc điều chỉnh mật độ của thụ thể *ACE2* [10].

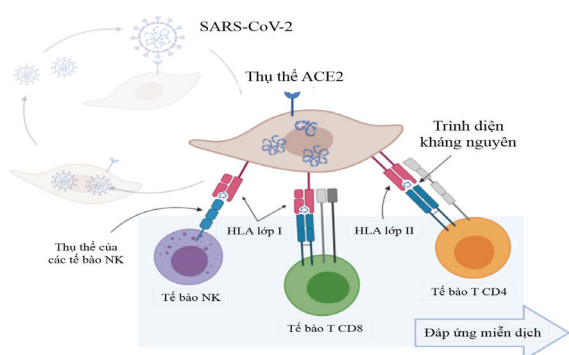
5. Nhóm gen liên quan đến các phản ứng miễn dịch tự nhiên ở người

Hiểu biết về cách thức tương tác giữa virus và protein của người cũng như các cơ chế miễn trong quá trình lây nhiễm đóng vai trò quan trọng trong việc xác định những gen đích liên quan tới tính miễn cảm cũng như mức độ tiến triển của bệnh nhân Covid-19. Bên cạnh những gen mã hóa cho các protein liên quan đến quá trình nhập bào của virus như đã trình bày ở phần trước, một số gen khác liên quan đến hệ thống miễn dịch của cơ thể người cũng là những mục tiêu nghiên cứu quan trọng cần xét đến.

5.1. Hệ thống trình diện kháng nguyên bạch cầu người (*Human leukocyte antigens - HLA*)

Hệ thống miễn dịch ở người vô cùng phức tạp, cơ chế ngăn chặn virus/vi khuẩn hiệu quả giúp bảo vệ cơ thể thường được thực hiện bởi các tế bào hoặc cytokine trung gian liên quan đến các đáp ứng miễn dịch tự nhiên và đáp ứng miễn dịch thu được. Hệ thống HLA bao gồm các protein mã hóa bởi các gen thuộc phức hệ phù hợp tổ chức mô (Major histocompatibility complex - MHC), vốn rất đa hình trong hệ gen người. Sự khác biệt trong các gen *HLA* dẫn tới những đáp ứng miễn dịch khác biệt ở những người bị nhiễm mầm bệnh [28, 29]. Ví dụ, như các trường hợp nhiễm virus mạn

tính thường là do các tế bào T CD8+ và T CD4+ gặp khó khăn trong việc nhận biết các kháng nguyên HLA lớp I và II trên bề mặt tế bào hoặc do các phân tử HLA có mức độ biểu hiện yếu [30]. Cũng vì vai trò then chốt của HLA trong đáp ứng miễn dịch với các kháng nguyên mà các nhà khoa học cho rằng, sự đa hình của locus *HLA* ở người có thể giải thích được một phần sự khác biệt trong tính miễn cảm với SARS-CoV-2 giữa các quần thể người khác nhau. Liên quan tới vấn đề này, nhóm nghiên cứu tại Đại học California San Francisco (Mỹ) đã hợp tác với Chương trình Quốc gia Hiến tặng Tủy xương (National Marrow Donor Program) cùng khởi động thu thập thông tin của hơn 3,5 triệu người đăng ký hiến tủy đã có sẵn dữ liệu kiểu gen *HLA* để tìm hiểu thêm vai trò của biến đổi gen *HLA* trong bệnh Covid-19. Cơ chế trình diện kháng nguyên thực hiện bởi các phân tử HLA được biểu diễn ở hình 4.



Hình 4. Sơ đồ trình diện kháng nguyên bởi các phân tử HLA trên bề mặt tế bào [31]. Sau khi được tổng hợp, các HLA thu nhận các mảnh peptide của kháng nguyên trong không gian nội bào. Sau đó, các phân tử HLA di chuyển ra bề mặt tế bào và trình diện các kháng nguyên này cho các tế bào của hệ thống miễn dịch bao gồm tế bào sát thủ tự nhiên (Natural killer cells - NK), tế bào T CD4+ và T CD8+.

Liên quan tới tính miễn cảm với SARS-CoV-2 ở người, nghiên cứu phân bố của các allele *HLA* lớp I và II ở 86 bệnh nhân Covid-19 người Hán (thuộc tỉnh Chiết Giang, Trung Quốc) nhận thấy, có 2 allele *HLA-C*07:29* và *HLA-B*15:27* xuất hiện với tần số cao hơn ở nhóm bệnh nhân so với nhóm đối chứng [31]. Một số allele khác bao gồm *HLA-C*7:29*, *HLA-C*08:01G*, *HLA-B*15:27* và *HLA-D*4:06* cũng được phát hiện phân bố ở nhóm bệnh nhân cao hơn nhóm đối chứng. Đối với quần thể người Italia, các allele *HLA-DRB1*15:01*, *HLA-DQB1*06:02* và *HLA-B*27:07* được báo cáo có liên quan đến tính miễn cảm với SARS-CoV-2 [32].

Đối với nguy cơ tiến triển Covid-19 nặng, nghiên cứu trên người Trung Quốc cho thấy, các allele liên quan bao gồm *HLA-A*11:01*, *HLA-B*51:01* và *HLA-C*14:02* [33]. Mặt khác, nghiên cứu trên 72 bệnh nhân Covid-19 người Tây Ban Nha lại cho thấy sự hiện diện của 3 allele *HLA* (*HLA-A*11*, *HLA-C*01* và *HLA-DQB1*04*) có liên quan với tỷ lệ tử vong cao [34]. Trong khi đó, ở nhóm bệnh nhân Italia thì tình trạng tử vong liên quan tới sự hiện diện của allele *HLA-DRB1*08* do allele này được dự đoán kết hợp với các mảnh peptide của SARS-CoV-2 với ái lực yếu [35]. Nghiên cứu tại các bệnh viện phía đông bắc nước Anh trên 49 bệnh nhân nguy kịch và 69 người bệnh không có triệu chứng

với Covid-19 cho thấy, allele *HLA-DRB1*04:01* xuất hiện với tần số thấp hơn ở nhóm nguy kịch (5,1%) so với nhóm không có triệu chứng (16,7%). Biến thể *HLA-DRB1*04:01* cũng là yếu tố liên quan tới những triệu chứng ít nghiêm trọng của Covid-19 [36]. Tiến sang khu vực Nam Á, nghiên cứu trên 95 bệnh nhân thuộc các nước Pakistan, Ấn Độ và Bangladesh cho thấy, allele *HLA-B*51* có tần số ở nhóm bệnh nhân tử vong cao hơn so với nhóm bệnh nhân nhẹ [37]. Như vậy có thể thấy, ảnh hưởng của đa hình gen *HLA* đối với diễn biến nặng của bệnh nhân Covid-19 có thể phụ thuộc vào nguồn gốc chủng tộc.

Áp dụng các phương pháp dự đoán chức năng *in silico* cho thấy, allele *HLA-B*46:01* là một yếu tố nguy cơ tiến triển bệnh nặng do có ái lực liên kết thấp với các mảnh peptide của SARS-CoV-2. Ngược lại, allele *HLA-B*15:03* lại có xu hướng đóng vai trò bảo vệ cơ thể vì có khả năng trình diện tốt các mảnh peptide bảo thủ của SARS-CoV-2 cho hệ miễn dịch. Đối với allele *HLA-A*02:02*, kết quả dự đoán khả năng trình diện kháng nguyên chưa nhất quán, một số nhóm nghiên cứu dự đoán nó có khả năng trình diện kháng nguyên của SARS-CoV-2 cao [38, 39], trong khi nhóm khác lại chứng minh kết quả ngược lại [40]. Tất nhiên, những kết quả đối lập trong các nghiên cứu dựa trên *in silico* cần phải được xem xét thận trọng cho tới khi mối liên hệ thực sự được chứng minh bằng các nghiên cứu lâm sàng. Tổng kết một số biến thể gen mã hóa cho *HLA* lớp I và II liên quan đến nguy cơ mắc bệnh/tử vong được thống kê ở bảng 2.

Bảng 2. Các allele của *HLA* liên quan đến tính miễn cảm với virus SARS-CoV-2 [36].

Allele <i>HLA</i>	Các quần thể mà các allele này xuất hiện phổ biến*
Nguy cơ cao	
<i>HLA-A*25:01</i>	Colombia
<i>HLA-B*46:01</i>	Trung Quốc, Hồng Kông (Trung Quốc), Malaysia, Singapore, Đài Loan (Trung Quốc), Thái Lan, Việt Nam
<i>HLA-C*01:02</i>	Úc, Hồng Kông (Trung Quốc), Colombia, Nhật Bản, Mexico, Malaysia, Hàn Quốc, Đài Loan (Trung Quốc), Venezuela, Việt Nam, Bolivia, Costa Rica, New Zealand.
Nguy cơ thấp	
<i>HLA-A*02:02</i>	Cameroon, Israel
<i>HLA-B*15:03</i>	Guinea Bissau
<i>HLA-C*12:03</i>	Đức, Hy Lạp, Ý, Ba Lan, Tây Ban Nha, Colombia
Tử vong/nguy kịch	
<i>HLA-A*11</i>	Myanmar, Trung Quốc, Thái Lan, Đài Loan (Trung Quốc), Nhật Bản, Mexico, Hàn Quốc, Mông Cổ, Pháp, Iran.
<i>HLA-B*51:01</i>	Ý, Nhật Bản, Trung Quốc, Mỹ, Hy Lạp, Ả Rập Xê Út, Thụy Sĩ, Đức, Croatia,
<i>HLA-C*01</i>	Trung Quốc, Nhật Bản, Brazil, Scotland, Thái Lan, Hàn Quốc, Na Uy, Peru, Việt Nam, Mông Cổ, Myanmar
<i>HLA-C*05</i>	Anh, Pháp, Tây Ban Nha, Wales, Venezuela
<i>HLA-C*14:02</i>	Nhật Bản (Tokyo, Osaka)
<i>HLA-DQB1*04</i>	Mexico, Na Uy, Venezuela, Brazil, Ecuador, Malaysia, Nga
<i>HLA-DRB1*08</i>	Đài Loan (Trung Quốc), Brazil, Mexico, Chile, Sudan, Peru, Argentina, Ấn Độ, Nhật Bản, Venezuela, Colombia.

Các quần thể được ghi nhận với tần số allele >0,01; *: dữ liệu được truy xuất từ cơ sở dữ liệu Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefrequencies.net>); *: nhóm gen mã hóa cho các cytokine.

Bão cytokine là nguyên nhân chủ yếu khiến các bệnh nhân Covid-19 rơi vào nguy kịch. Khi cơ thể bị nhiễm SARS-CoV-2, virus sẽ kích hoạt hàng loạt các tế bào của hệ miễn dịch (đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, các tế bào tua) và dẫn đến hàng loạt các cytokine được giải phóng, trong đó có yếu tố tiền viêm IL-6. Đây là cytokine đóng vai trò trung tâm trong cơn bão cytokine thông qua hiệu ứng kích thích sự nhân lên của các tế bào T và sự biệt hóa của các tế bào B. Nồng độ IL6 cao có thể kích hoạt con đường đông máu và các tế bào nội mạch nhưng lại ức chế chức năng của cơ tim. Ở những trường hợp Covid-19 nguy kịch, lượng IL6 đo được cao gấp 10 lần so với nhóm bệnh nhân còn lại và có liên quan đến tiên lượng xấu của người bệnh [41]. Một số biến thể gen thuộc vùng điều hòa của gen *IL6* như rs1800795 và rs1800796 đã được báo cáo có liên quan đến nồng độ cao của IL6 trong huyết tương và nguy cơ nhiễm trùng đường hô hấp trên [42, 43]. Hơn nữa, 2 biến thể gen này đều có liên quan đến tiến triển của một số rối loạn khác

Bảng 3. Tần số các biến thể của các gen mã hóa cho cytokine có liên quan đến độ nhạy cảm với bệnh truyền nhiễm và tiên lượng của bệnh nhân Covid-19 [37].

Gen	Biến thể gen	Tần số allele kiểu đại*	TLTK
Mẫn cảm với mầm bệnh			
IL1B	rs16944 g.4490T>C	Châu Âu: A=0,3499; châu Phi: A=0,5726; Đông Á: A=0,4692; Nam Á: A=0,6; Mỹ: A=0,55	[45]
IL17A	rs2275913 g.4849G>C	Châu Âu: G=0,6203; châu Phi: G=0,9508; Đông Á: G=0,5069; Nam Á: G=0,62; Mỹ: G=0,784	
IL6	rs2275913 g.4880C>G	Châu Âu: C=0,4155; châu Phi: C=0,0182; Đông Á: C=0,001; Nam Á: C=0,1390; Mỹ: C=0,1840	[46]
TNF	rs1800629 g.4682G>A	Châu Âu: G=0,8658; châu Phi: G=0,8805; Đông Á: G=0,9415; Nam Á: G=9470; Mỹ: G=0,9310	[43, 47]
Huyết khối tĩnh mạch			
IL1B	rs1143633 g.8890G>A	Châu Âu: C=0,666; châu Phi: C=0,8260; Đông Á: C=0,4613; Nam Á: C=0,7480; Mỹ: C=0,7090	[48]
IL1R1	rs3917332 g.102180064A>T	Châu Âu: A=0,1938; châu Phi: A=0,0825; Đông Á: A=0,0724; Nam Á: C=0,1350; Mỹ: A=0,1540	
IL1RN	rs2232354 g.16866T>G	Châu Âu: T=0,7962; châu Phi: T=0,9924; Đông Á: T=0,9534; Nam Á: T=0,79; Mỹ: T=0,831	
Bão cytokine			
IL6	rs1800796 g.4481G>C	Châu Âu: G=0,9523; châu Phi: G=0,8971; Đông Á: G=0,2093; Nam Á: G=0,6050; Mỹ: G=0,7050	[49, 50]
	rs1800797 g.4456A>G	Châu Âu: A=0,4076; châu Phi: A=0,0166; Đông Á: A=0,001; Nam Á: A=0,134; Mỹ: A=0,184	[51]
FCGR2A	rs1801274 g.9541A>G	Châu Âu: A=0,4891; châu Phi: A=0,4743; Đông Á: A=0,7222; Nam Á: A=0,5810; Mỹ: A=0,5490	[52]

TLTK: tài liệu tham khảo; *: tần số các allele thu được từ cơ sở dữ liệu 1000 genome.

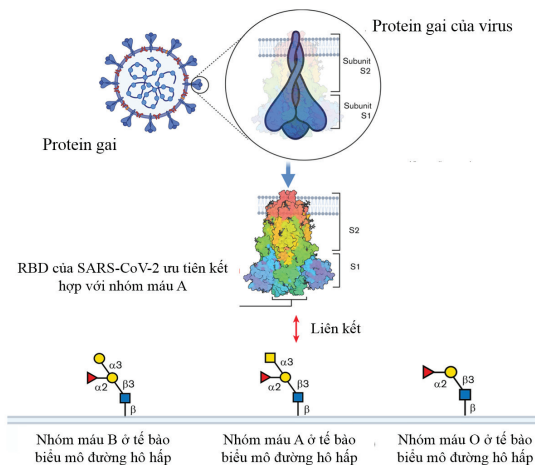
như nhiễm trùng huyết, bệnh mạch vành và tiểu đường. Ngoài ra, còn 7 biến thể gen *IL6* (rs140764737, rs142164099, rs2069849, rs142759801, rs190436077, rs148171375, rs13306435) và 5 biến thể gen *IL6R* (rs2228144, rs2229237, rs2228145, rs28730735, rs143810642) đã được dự đoán ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện và tương tác của các protein này, từ đó có thể phản ánh nguyên nhân bệnh sinh của Covid-19 cũng như những biến chứng gặp phải [44]. Các biến thể gen trong vùng điều hòa biểu hiện của các cytokine khác cũng đã được báo cáo. Ví dụ, các đột biến sai nghĩa ảnh hưởng đến các protein TGF- β và IFN- α , bên cạnh đó còn có các biến thể làm thay đổi quá trình dịch mã của TNF- α , TL-10 và IL-2. Một số các biến thể gen đã được ghi nhận là có liên quan đến tình trạng nhạy cảm với mầm bệnh, bão cytokine và huyết khối tĩnh mạch. Các biến thể gen thuộc nhóm gen mã hóa cho các cytokine và tần số của chúng được thống kê chi tiết ở bảng 3.

Đối với nguy cơ xuất hiện huyết khối tĩnh mạch ở bệnh nhân Covid-19, 18 biến thể trong các gen *IL1B*, *IL1R*, *IL1R1* và *IL1R2* cùng với 25 nhóm đơn bội đã được khảo sát trong một nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân bị huyết khối tĩnh mạch sâu và nhóm đối chứng. Các tác giả nhận thấy, những biến thể gen *IL1B* (rs1143633), *IL1R1* (rs3917332) và *IL1RN* (rs2232354) có quan hệ khác nhau với nguy cơ hình thành huyết khối. Những cá thể có kiểu gen đồng hợp tử với nhóm đơn bội của *IL1RN* (rs3181052, rs419598, rs2232354, rs315952, rs315949) có nguy cơ hình thành huyết khối cao hơn [48]. Tất nhiên, các biến thể gen mã hóa cho các cytokine (*IL2*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *TGFB1* và *IFNG*) có mức độ phổ biến khác nhau giữa các chủng tộc [53]. Ví dụ, biến thể gen *IL2* phân bố khác nhau giữa các quần thể người châu Phi, châu Âu và châu Á. Trong khi đó, các allele biểu hiện mạnh của *IL6* và *IL10* xuất hiện phổ biến hơn ở người châu Phi và châu Á so với người da trắng [53].

5.2. Nhóm gen quy định nhóm máu ABO

Vai trò của các gen quy định nhóm máu ABO đối với mức độ tiến triển và tiên lượng của bệnh Covid-19 đã được báo cáo. Một số nghiên cứu hồi cứu theo thiết kế bệnh/chứng và nghiên cứu GWAS đều đã quan sát thấy những người có nhóm máu A dường như có nguy cơ nhiễm bệnh cao hơn so với các nhóm máu khác. Đặc biệt, người mang nhóm máu O thì ít có nguy cơ mắc bệnh hơn [4, 54, 55]. Như vậy có thể thấy, về khía cạnh nhóm máu, 2 nhóm máu A và O là những yếu tố quan trọng cần lưu ý trong lâm sàng khi tiên lượng cho các bệnh nhân Covid-19. Nhưng một kết quả khác khi nghiên cứu trên 397 bệnh nhân Covid-19 và 500 mẫu đối chứng không nhiễm tại Iran lại cho thấy, người có nhóm máu AB mới thuộc nhóm có nguy cơ nhiễm virus cao hơn các nhóm máu còn lại [56]. Phân tích trên 95 bệnh nhân Covid-19 tại Canada cho thấy, những bệnh nhân nặng mang nhóm máu A hoặc AB có nguy cơ cao phải can thiệp thở máy và thời gian điều trị tích cực cũng kéo dài hơn những bệnh nhân mang nhóm máu O hoặc B [57]. Về mặt cơ chế, mối liên hệ giữa virus SARS-CoV-2 và locus gen mã hóa cho nhóm máu ABO đã được lý giải một phần thông qua sự tương tác trực tiếp giữa virus này với kháng nguyên nhóm máu A biểu hiện trên các tế bào biểu mô đường hô hấp. Cụ thể, vùng RBD của SARS-CoV-2 vốn chịu trách nhiệm với quá trình xâm nhiễm

của nó có trình tự tương đồng với galectin ở người, đây là protein có ái lực cao với các kháng nguyên của nhóm máu. Tương tác giữa RBD với kháng nguyên nhóm máu A biểu hiện ở đường hô hấp chiếm ưu thế hơn so với kháng nguyên của các nhóm máu B và O [58]. Mỗi tương tác này cũng không mạnh trong trường hợp các kháng nguyên nhóm máu biểu hiện ở tế bào hồng cầu [58] (hình 5). Một số giả thuyết đã cho rằng, các kháng nguyên nhóm máu có thể góp phần vào đáp ứng miễn dịch tự nhiên để kháng lại virus [59]. Đồng thời, nhiều kháng nguyên nhóm máu góp phần tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình hấp thu nội bào, truyền tín hiệu hoặc kết dính thông qua các vi tổ chức của màng tế bào. Một số kiểu gen nhất định liên quan đến nhóm máu cũng cho thấy mối liên hệ với kiểu hình có sức đề kháng với bệnh sốt rét, quan sát thấy những kiểu hình này thường chiếm ưu thế ở những quần thể thuộc khu vực mà bệnh sốt rét lưu hành, đây là kết quả của áp lực tiến hóa hình thành nên [59].



Hình 5. Sơ đồ đại diện cho sự ưu tiên tương tác của SARS-CoV-2 với kháng nguyên nhóm máu A trên biểu mô đường hô hấp [57]. Protein gai của SARS-CoV-2 có 2 tiểu phần S1 (kết hợp với thụ thể của tế bào chủ) và S2 (kích hoạt quá trình dung hợp màng khi virus xâm nhiễm). Tam giác màu đỏ: fucose; hình tròn màu vàng: galactose; hình vuông màu vàng: N-Acetylgalactosamine; hình vuông màu xanh lam: N-Acetylglucosamine. RBD: miền liên kết với thụ thể.

6. Diễn biến dịch bệnh Covid-19 tại Việt Nam và những nghiên cứu liên quan

Tính đến giữa tháng 9/2021, Việt Nam đã trải qua 4 đợt dịch lớn với tổng số ca nhiễm ghi nhận là 635.055, trong đó có 398.461 bệnh nhân đã được điều trị khỏi và 15.936 ca tử vong trên toàn quốc. Dịch bệnh đã lan rộng ra 60/63 tỉnh, thành phố, trong đó TP Hồ Chí Minh là nơi chịu ảnh hưởng nặng nề nhất với tổng số ca nhiễm là 310.307 và 6.312 bệnh nhân tử vong, tại Hà Nội cũng đã ghi nhận 4.331 ca nhiễm và 47 ca tử vong (số liệu cập nhật ngày 15/9/2021) [1].

Ngay đợt dịch đầu tiên khi chủng SARS-CoV-2 xâm nhập vào nước ta, đã có báo cáo về đặc điểm lâm sàng của 16 bệnh nhân Covid-19 đầu tiên của Việt Nam cũng như cách xử lý của

Chính phủ đối với dịch bệnh [60]. Ngoài ra, Việt Nam đang nghiên cứu phát triển 3 ứng viên vắc-xin ngừa Covid-19 là Nanocovax, Covivac và Self Amplifying mRNA ARCT-154 Covivac. Về điều trị, từ tháng 4/2020, đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford (Oxford University Clinical Research Unit - OUCRU) tại TP Hồ Chí Minh đang triển khai sử dụng thử nghiệm thuốc Chloroquine trong điều trị nội trú cho các bệnh nhân Covid-19. Thử nghiệm đã bước vào pha 2 với sự phối hợp của các đơn vị: Bệnh viện Chợ Rẫy, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương và Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới TP Hồ Chí Minh. Trong năm 2021, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã công bố kết quả nghiên cứu thuốc ức chế virus SARS-CoV-2 có nguồn gốc thảo dược và đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học quốc gia, Bộ Y tế chấp thuận nghiên cứu lâm sàng trên người bệnh Covid-19.

Hướng nghiên cứu vai trò của hệ gen người đối với tính nhạy cảm và mức độ diễn biến bệnh của Covid-19 đã và đang được triển khai tại một số cơ sở nghiên cứu như: Viện Nghiên cứu Hệ gen, Trường Đại học Y Hà Nội và Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương. Kết quả khảo sát đặc điểm đa hình gen *TMPRSS2* mã hóa enzyme tham gia vào cơ chế xâm nhiễm vào tế bào người của SARS-CoV-2 trên quần thể người Việt Nam lần đầu tiên được báo cáo [61]. Các nghiên cứu chi tiết trên hệ gen bệnh nhân Covid-19 và các đối tượng tiếp xúc trực tiếp nguồn bệnh đang được tiến hành.

7. Những triển vọng và thách thức trong nghiên cứu đặc điểm hệ gen vật chủ liên quan đến tình trạng của bệnh nhân Covid-19

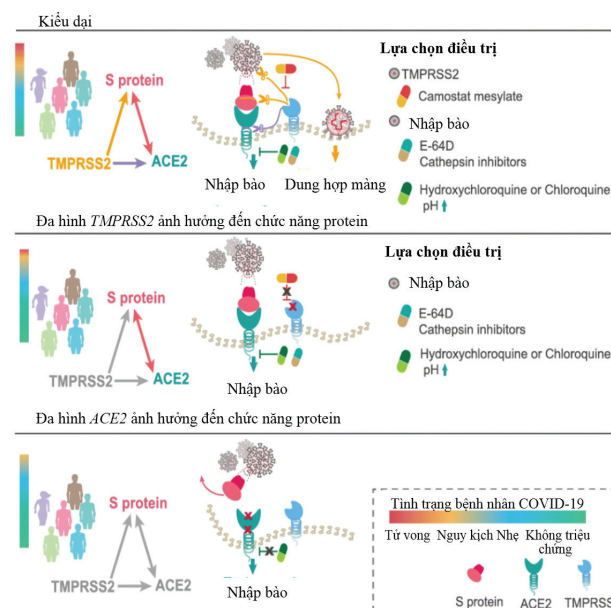
7.1. Triển vọng trong y học cá thể hóa

Với khả năng của nền y học hiện nay, chưa có thuốc điều trị đặc hiệu cho bệnh nhân Covid-19. Một số loại thuốc thay thế khác như melatonin, hydroxychloroquine, chloroquine, remdesivir đều đang trong giai đoạn khảo sát để đánh giá an toàn và hiệu quả khi điều trị. Một số biến thể của gen *ACE2* phát hiện ở người châu Phi và người Mỹ như p.Met383Thr hay p.Pro389His và p.Asp427Tyr có thể ảnh hưởng đến hiệu quả lâm sàng của hydroxychloroquine hoặc chloroquine. Điều này có thể giải thích cho việc điều trị với hydroxychloroquine không thực sự làm giảm tỷ lệ tử vong của bệnh nhân Covid-19 tại New York, Mỹ [62]. Ngoài ra, đã có báo cáo trường hợp bệnh nhân thiếu hụt G6PD mắc Covid-19 xuất hiện tình trạng tan máu nghiêm trọng hơn khi điều trị với hydroxychloroquine [63], đây là kiểu hình thường gặp ở quần thể người ở châu Phi, khu vực Địa Trung Hải, Trung Đông, Tây Á. Bên cạnh đó, đặc điểm hệ gen dược học bao gồm các gen mã hóa cho các enzyme chuyển hóa thuốc, các thụ thể, các protein vận chuyển và đích tác dụng của thuốc cũng đã được nghiên cứu rất rộng rãi. Đa hình điểm của hệ gen dược học có thể làm thay đổi hiệu quả cũng như an toàn sử dụng thuốc ở mỗi cá thể. Trong bối cảnh hiện nay, một số loại thuốc đã được các nhà khoa học đưa vào nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị Covid-19. Trong quá trình sử dụng các loại thuốc này, sự khác biệt của hệ gen dược học liên quan đến tình trạng đáp ứng thuốc khác nhau đã được báo cáo. Ví dụ như: nồng độ hydroxychloroquine được xác định cao hơn ở

những người mang allele làm mất/giảm hoạt tính enzyme CYP2D6 (*4, *10) [64], đặc điểm dược động học của azithromycin bị ảnh hưởng bởi hoạt tính của P-glycoprotein vận chuyển thuốc - được mã hóa bởi gen *ABCB1* [65]. Ngoài ra, remdesivir là cơ chất của các enzyme chuyển hóa thuốc như CYP2C8, CYP2D6, CYP3A4 và còn là cơ chất của protein vận chuyển ABCB1 [66]. Do vậy, về lý thuyết thì những biến thể của các gen mã hóa cho nhóm enzyme/protein nêu trên có thể gây biến động đến dược động học của thuốc này. Những thông tin trên cho thấy tầm quan trọng của hướng nghiên cứu sâu hơn về di truyền dược học tích hợp các dữ liệu về đáp ứng thuốc và thông tin di truyền của bệnh nhân Covid-19 là rất cần thiết, từ đó dự đoán hiệu quả điều trị đồng thời đưa ra chiến lược sử dụng thuốc tối ưu.

Liên quan đến phương thức xâm nhiễm của SARS-CoV-2, các nhà khoa học đã đưa ra 2 cơ chế mà virus này sử dụng để xâm nhập vào tế bào chủ: nhập bào (thông qua liên kết giữa protein gai và thụ thể *ACE2*) và dung hợp màng của virus với tế bào chủ (sau khi *TMPRSS2* thủy phân protein gai) [67]. Dựa trên lý thuyết và những bằng chứng về đặc điểm di truyền của mỗi cá nhân liên quan đến những enzyme và con đường tín hiệu quan trọng đối với sự xâm nhập của SARS-CoV-2, có 3 giả thuyết về phác đồ điều trị cho bệnh nhân Covid-19 đã được đưa ra [68]. Thứ nhất, đối với cơ chế xâm nhập của virus thông qua nhập bào. Bên cạnh cơ chế kháng virus thông qua tăng pH của các endosome và gây ức chế quá trình dung hợp của màng tế bào (thuốc hydroxychloroquine và chloroquine) thì một liệu pháp khác nhắm đến có thể là sử dụng chất ức chế *TMPRSS2* (camostat mesylate - đã được Nhật Bản sử dụng). Chất ức chế *TMPRSS2* có tác dụng làm cản trở quá trình dung hợp giữa vỏ virus và màng tế bào của vật chủ khi cấu hình của protein gai thay đổi. Lý thuyết này đưa ra gợi ý về mặt lựa chọn trong điều trị, đó là những thuốc gây tăng pH của các endosome như hydroxychloroquine/chloroquine sẽ có hiệu quả trên những bệnh nhân mang biến thể gen gây thiếu hụt *TMPRSS2*, ngược lại hiệu quả khi dùng các loại thuốc này sẽ không cao đối với bệnh nhân có allele *TMPRSS2* kiểu đại. Như vậy, quần thể người châu Âu và châu Phi sẽ nhạy cảm hơn khi điều trị với hydroxychloroquine/chloroquine do họ mang những biến thể dạng thay thế hoặc làm xuất hiện mã kết thúc sớm của *TMPRSS2*. Thứ hai, với những bệnh nhân không mang đột biến nào của cả *ACE2* và *TMPRSS2* thì việc sử dụng kết hợp camostat mesylate với hydroxychloroquine/chloroquine có thể sẽ đem lại hiệu quả điều trị khả quan hơn. Lý do là vì dùng 2 loại thuốc này đã cùng lúc ức chế 2 con đường xâm nhập của virus là nhập bào và dung hợp màng. Thứ ba, với những bệnh nhân mang đột biến gây suy giảm chức năng của thụ thể *ACE2* thì việc sử dụng thuốc ức chế 2 con đường xâm nhập nêu trên là không cần thiết. Có thể suy luận rằng người châu Âu với những biến thể gen làm thay thế các amino acid tại các vị trí quan trọng như p.Arg708Trp, p.Arg710Cys, p.Arg710His và p.Arg716Cys của *ACE2* sẽ có triệu chứng nhẹ hơn sau khi bị nhiễm virus do đã bị mất những vị trí cần được nhận biết bởi *TMPRSS2*. Những bệnh nhân này có thể tự hồi phục thể trạng và khỏi bệnh trong thời

gian ngắn (hình 6). Tuy nhiên, cả 3 mô hình dự đoán điều trị theo phương án cá thể hóa được thảo luận nêu trên vẫn cần phải kiểm chứng bằng những thử nghiệm ngẫu nhiên có đối chứng trước khi được áp dụng trong thực hành lâm sàng.



Hình 6. Mô hình đề xuất về các liệu pháp điều trị kết hợp 2 nhóm thuốc ức chế protease và ức chế *TMPRSS2* cho bệnh nhân Covid-19 theo hướng cá thể hóa [68]. Có 3 đề xuất về lựa chọn giải pháp điều trị cho bệnh nhân Covid-19: i) Với những bệnh nhân không mang đột biến ở các gen mã hóa cho *ACE2* và *TMPRSS2* thì kết hợp hydroxychloroquine (hoặc chloroquine, E-64D) với camostat có thể đem lại hiệu quả lâm sàng tốt; ii) Những bệnh nhân mang biến thể gây ảnh hưởng có hại đến chức năng *TMPRSS2* thì áp dụng điều trị với nhóm thuốc ức chế protease; iii) Những bệnh nhân mang biến thể ảnh hưởng đến chức năng thụ thể *ACE2* có thể tự hồi phục trong thời gian ngắn.

Về khía cạnh đáp ứng miễn dịch của cơ thể người khi nhiễm virus SARS-CoV-2, hiểu biết về biến thể gen của *HLA* và các gen mã hóa cho các cytokine sẽ hỗ trợ cho việc phát hiện các dấu ấn di truyền có liên quan đến tình trạng bệnh nhân, đồng thời cũng là cơ sở trong việc thiết kế hay chọn lựa phác đồ điều trị cho từng cá nhân. Đây là một phần rất quan trọng trong quản lý điều trị bệnh nhân Covid-19, vì cụ thể trong cơ chế miễn dịch liên quan đến bảo cytokine thì việc kiểm soát sớm bảo này sẽ giúp cải thiện được diễn biến nặng của căn bệnh [69]. Bên cạnh đó, sự khác biệt di truyền của hệ gen miễn dịch giữa các cá nhân/quần thể người khác nhau cũng có thể dẫn đến khả năng tạo miễn dịch khác nhau trong tình huống được tiêm vắc-xin. Bởi sự không đồng nhất trong đáp ứng miễn dịch mà một vắc-xin có thể bảo vệ các cá nhân được tiêm chủng ở các mức độ khác nhau. Hai nghiên cứu của Viện Công nghệ Massachusetts (Mỹ) sử dụng học máy hỗ trợ cho mô hình dự đoán *in silico* đã đưa ra dự đoán rằng, các vắc-xin được phát triển bởi Moderna, Pfizer, AstraZeneca có thể không bảo vệ những quần thể người có nguồn gốc di truyền không phải da trắng (châu Phi, châu Á) như mong đợi [70]. Dường như đây là hệ quả của việc

thiếu hụt trong chế phẩm vắc-xin để kích hoạt phản ứng miễn dịch với cùng mức độ ở tất cả các quần thể người. Với cơ sở dữ liệu hệ gen nói chung và hệ gen miễn dịch nói riêng của các quần thể, chiến lược tiêm chủng Covid-19 đang đứng trước một cơ hội mới nhằm khai thác, nghiên cứu và ứng dụng đặc điểm di truyền của hệ gen miễn dịch trong y học cá thể hóa.

Một trong những thách thức liên quan đến điều trị bệnh nhân Covid-19 theo hướng cá thể hóa đó là khám phá tác động chính xác vào cơ chế nhân lên của SARS-CoV-2. Một số nghiên cứu gần đây đã xác định được những yếu tố quan trọng trong tế bào chủ cần thiết cho sự tổng hợp virus mới. Ví dụ, sử dụng hệ thống knock-out CRISPR-Cas9 trên mô hình tế bào HeLa biểu hiện mạnh *ACE2*, các nhà khoa học đã sàng lọc 178 gen và phát hiện việc loại bỏ gen *B4GALT7* và *IL10RB* thực sự làm giảm sự nhân lên của SARS-CoV-2 [71]. Một protein khu trú ở mạng lưới nội chất là TMEM41B cũng đã được chứng minh là nhân tố quan trọng đối với quá trình nhân bản của một số virus Corona ở giai đoạn sớm của xâm nhiễm sau khi virus tiếp cận với thụ thể tế bào chủ [72]. Trong khi đó, sàng lọc 300 yếu tố được kích hoạt bởi Interferon loại I đã phát hiện phức hệ tạo bởi RNF20/RNF40 có khả năng ức chế sự nhân lên của virus này, đây được coi là yếu tố hạn chế sự sinh sôi của virus này ở các tế bào cơ thể chủ [73].

7.2. Thách thức trong tương lai

Có thể thấy, kể từ khi Covid-19 trở thành đại dịch, các nhà khoa học từ khắp nơi trên thế giới đã nỗ lực nghiên cứu và cung cấp lượng lớn thông tin về các biến thể di truyền đáng chú ý liên quan đến sự nhạy cảm với virus SARS-CoV-2 và những bệnh cảnh lâm sàng nặng của các bệnh nhân. Tổ chức Sáng kiến di truyền vật chủ Covid-19 vẫn luôn cập nhật thường xuyên, chia sẻ thông tin và dữ liệu của các nhóm nghiên cứu từ nhiều quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên, trong số những dữ liệu được công bố gần đây, vẫn còn một số vấn đề đáng chú ý cần được thảo luận thêm. Cụ thể, nhiều thiết kế nghiên cứu trong vòng hơn 1 năm trở lại đây sử dụng các mẫu bệnh nhân Covid-19 và mẫu đối chứng là người khỏe mạnh chưa rõ lịch sử phơi nhiễm, như vậy kết quả phân tích tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình đáp ứng với virus chưa thực sự thuyết phục. Bên cạnh đó, những kết luận về mối liên hệ giữa một số biến thể di truyền với kiểu hình ở bệnh nhân Covid-19 trong những nghiên cứu gần đây đều là kết quả của các phân tích thống kê. Tuy nhiên, dữ liệu thống kê đôi khi chỉ phản ánh mối liên hệ giữa các đặc điểm nghiên cứu chứ không đưa ra được những cơ chế cụ thể, cũng như chuỗi liên quan giữa nguyên nhân và hậu quả. Như vậy, chưa thể chắc chắn về mối quan hệ nhân quả giữa kiểu gen ứng viên với kiểu hình lâm sàng ở bệnh nhân [74]. Trong các nghiên cứu y sinh học, việc khám phá ra nguyên nhân di truyền của một kiểu hình nào đó cần được chứng minh chặt chẽ bởi nhiều cơ chế ở các cấp độ phân tử, tế bào và cơ thể. Trong tình huống này, đặc điểm hệ gen của mỗi cá thể cần phải lý giải được các cơ chế tiềm ẩn gây nên đặc điểm lâm sàng nghiêm trọng đã ghi nhận, việc này đòi hỏi các nghiên cứu chuyên sâu về hóa sinh và miễn dịch [74]. Ngoài ra, thể mạnh của các nghiên cứu như GWAS là khảo sát được lượng rất lớn các biến thể gen đã biết và phổ biến thuộc vùng

mã hóa hoặc toàn bộ hệ gen, nhưng lại bỏ sót những biến thể di truyền hiếm và mới. Bởi vậy, việc khai thác đặc điểm hệ gen của các cá nhân không bệnh nền và trẻ tuổi nhưng biểu hiện bệnh cảnh lâm sàng đặc biệt rất có thể sẽ phát hiện được vai trò của những biến thể gen hiếm và mới đã bị bỏ sót khi nghiên cứu trên lượng mẫu lớn.

8. Kết luận

Việc giải mã các biến thể gen ở mức độ cá thể một mặt cung cấp thông tin tổng thể về những biến thể gen có liên quan đến tính miễn cảm/nguy cơ bệnh nặng, mặt khác sẽ có giá trị trong việc đánh giá những nguy cơ đối với bệnh nhân Covid-19. Bức tranh về phổ biến thể gen nêu trên là những thông tin quý giá đối với nền y học của mỗi quốc gia trong giai đoạn phòng chống dịch Covid-19, khi mà vẫn chưa có phác đồ điều trị hay vắc-xin hiệu quả đối với bệnh dịch này. Mặt khác, những phát hiện mới về biến thể gen đóng vai trò then chốt trong một con đường tín hiệu nào đó liên quan đến cơ chế bệnh sinh gây ra bởi SARS-CoV-2 đều là nền tảng quan trọng cho những nghiên cứu sâu về mặt cấu trúc/chức năng của protein được mã hóa. Từ đó, tính miễn cảm với virus SARS-CoV-2 hay những diễn biến khác biệt giữa các bệnh nhân Covid-19 có thể được làm sáng tỏ từ nguyên nhân di truyền. Ở khía cạnh điều trị và phát triển thuốc, cần quan tâm đến những biến thể gen có khả năng gây biến động con đường tín hiệu nội sinh và vận dụng để xây dựng chiến lược điều trị hiệu quả và đặc hiệu trong tương lai. Cũng cần lưu ý rằng, những nghiên cứu về mối tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình trên bệnh nhân Covid-19 cho đến nay vẫn chưa có kết quả thống nhất. Do vậy, rất cần những nghiên cứu tiếp tục triển khai bao quát trên nhiều quần thể người khác nhau và tập trung truy tìm cơ chế thực sự của những biến thể được cho là có nguy cơ trong tiến triển của căn bệnh này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ thông qua đề tài KH&CN cấp quốc gia “Nghiên cứu đặc điểm hệ gen người Việt Nam liên quan đến lây nhiễm và diễn biến của bệnh nhân Covid-19”, mã số ĐTĐLCN.49/20. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] <https://www.covid19hg.org>, accessed 19 August 2021.
- [2] <https://www.covidhge.com>, accessed 10 August 2021.
- [3] P.M. Visscher, M.A. Brown, M.I. McCarthy (2012), “Five years of GWAS discovery”, *Am. J. Hum. Genet.*, **90**(1), pp.7-24.
- [4] D. Ellinghaus (2020), “Genomewide association study of severe COVID-19 with respiratory failure”, *N. Engl. J. Med.*, **383**(16), pp.1522-1534.
- [5] COVID-19 Host Genetics Initiative (2021), “Mapping the human genetic architecture of COVID-19”, *Nature*, **600**, pp.472-477.
- [6] H. Namkoong, R. Edahiro, K. Fukunaga, et al. (2021), “Japan COVID-19 task force: a nation-wide consortium to elucidate host genetics of COVID-19 pandemic in Japan”, *medRxiv*, DOI: 10.1101/2021.05.17.21256513.

- [7] A.V. Khera, M. Chaffin, K.G. Aragam, et al. (2018), "Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations", *Nat. Genet.*, **50**(9), pp.1219-1224.
- [8] N.S.A. Husn, E.E. Kenny (2019), "Personalized medicine and the power of electronic health records", *Cell*, **177**(1), pp.58-69.
- [9] A. Heurich, H.H. Winkler, S. Gierer, et al. (2014), "TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein", *J. Virol.*, **88**(2), pp.1293-1307.
- [10] P. Brest, S. Refae, B. Mograbi, et al. (2020), "Host polymorphisms may impact SARS-CoV-2 infectivity", *Trends Genet.*, **36**(11), pp.813-815.
- [11] W. Li, et al. (2005), "Receptor and viral determinants of SARS coronavirus adaptation to human ACE2", *The EMBO J.*, **24**(8), pp.1634-1643.
- [12] D. Gemmati, B. Bramanti, M.L. Serino, et al. (2020), "COVID-19 and individual genetic susceptibility/receptivity: role of ACE1/ACE2 genes, immunity, inflammation and coagulation. might the double X-chromosome in females be protective against SARS-CoV-2 compared to the single X-chromosome in males?", *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(10), DOI: 10.3390/ijms21103474.
- [13] Y. Cao, L. Li, Z. Feng, et al. (2020), "Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations", *Cell Discov.*, **6**, DOI: 10.1038/s41421-020-0147-1.
- [14] J. Chen, Q. Jiang, X. Xia, et al. (2020), "Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation", *Aging Cell*, **19**(7), DOI: 10.1111/acer.13168.
- [15] K. Suryamohan, D. Diwanji, E.W. Stawiski, et al. (2021), "Human ACE2 receptor polymorphisms and altered susceptibility to SARS-CoV-2", *Commun. Biol.*, **4**, DOI: 10.1038/s42003-021-02030-3.
- [16] E. Procko (2020), "The sequence of human ACE2 is suboptimal for binding the S spike protein of SARS coronavirus 2", *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2020.03.16.994236.
- [17] M. Calcagnile, P. Forgez, A. Iannel, et al. (2020), "ACE2 polymorphisms and individuals susceptibility to SARS-CoV-2 infection: Insights from an *in silico* study", *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2020.04.23.057042.
- [18] H. Lanjanian, M.M. Jazi, M. Hedayati, et al. (2021), "SARS-CoV-2 infection susceptibility influenced by ACE2 genetic polymorphisms: Insights from Tehran CardioMetabolic genetic study", *Sci. Rep.*, **11**(1), DOI: 10.1038/s41598-020-80325-x.
- [19] M. Hoffmann, H.K. Weber, S. Schroeder, et al. (2020), "SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor", *Cell*, **181**(2), pp.271-280, DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052
- [20] C. Bhattacharyya, C. Das, A. Ghosh, et al. (2020), "Global spread of SARS-CoV-2 subtype with spike protein mutation D614G is shaped by human genomic variations that regulate expression of TMPRSS2 and MX1 genes", *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2020.05.04.075911.
- [21] R. Russo, I. Andolfo, V.A. Lasorsa, et al. (2020), "Genetic analysis of the coronavirus SARSCoV-2 host protease TMPRSS2 in different populations", *Front. Genet.*, **11**, DOI: 10.3389/fgene.2020.00872.
- [22] R. Asselta, E.M. Paraboschi, A. Mantovani, et al. (2020), "ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy", *Aging (Albany NY)*, **12**(11), pp.10087-10098, DOI: 10.18632/aging.103415.
- [23] A. Paniri, M.M. Hosseini, H.A. Niaki (2021), "First comprehensive computational analysis of functional consequences of TMPRSS2 SNPs in susceptibility to SARS-CoV-2 among different populations", *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**(10), pp.3576-3593.
- [24] R. Vishnubhotla, N. Vankadari, V. Ketavarapu, et al. (2020), "Genetic variants in TMPRSS2 and structure of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and TMPRSS2 complex", *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2020.06.30.179663.
- [25] L. Wulandari, B. Hamidah, C. Pakpaha, et al. (2021), "Initial study on TMPRSS2 p.Val160Met genetic variant in COVID-19 patients", *Hum. Genomics*, **15**(1), DOI: 10.1186/s40246-021-00330-7.
- [26] Y. Li, L.L. Cui, Q.Q. Li, et al. (2014), "Association between ADAM17 promoter polymorphisms and ischemic stroke in a Chinese population", *J. Atheroscler. Thromb.*, **21**(8), pp.878-893, DOI: 10.5551/jat.22400.
- [27] Y. Shao, J. He, F. Chen, et al. (2016), "Association study between promoter polymorphisms of ADAM17 and progression of sepsis", *Cell Physiol. Biochem.*, **39**(4), pp.1247-1261, DOI: 10.1159/000447830.
- [28] A. Iwasaki, N.D. Grubaugh (2020), "Why does Japan have so few cases of COVID-19?", *EMBO Mol. Med.*, **12**(5), DOI: 10.15252/emmm.202012481.
- [29] L.M. Zahn (2020), "HLA genetics and COVID-19", *Science*, **368**(6493), DOI: 10.1126/JVI.00510-20.
- [30] J. Gao, C. Zhu, Z. Zhu, et al. (2019), "The human leukocyte antigen and genetic susceptibility in human diseases", *Journal of Bio-X Research*, **2**(3), pp.112-120.
- [31] <https://hollenbachlab.ucsf.edu>, accessed 5 January 2021.
- [32] W. Wang, W. Zhang, J. Zhang, et al. (2020), "Distribution of HLA allele frequencies in 82 Chinese individuals with coronavirus disease-2019 (COVID-19)", *HLA*, **96**(2), pp.194-196, DOI: 10.1111/tan.13941.
- [33] A. Novelli, M. Andreani, M. Biancolella, et al. (2020), "HLA allele frequencies and susceptibility to COVID-19 in a group of 99 Italian patients", *HLA*, **96**(5), pp.610-614, DOI: 10.1111/tan.14047.
- [34] F. Wang, S. Huang, R. Gao, et al. (2020), "Initial whole-genome sequencing and analysis of the host genetic contribution to COVID-19 severity and susceptibility", *Cell Discov.*, **6**(1), DOI: 10.1038/s41421-020-00231-4.
- [35] L. Lorente, M.M. Martín, A. Franco, et al. (2021), "HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19", *Med. Intensiva*, **45**(2), pp.96-103, DOI: 10.1016/j.medin.2020.08.004.
- [36] A. Amoroso, P. Magistroni, F. Vespasiano, et al. (2021), "HLA and AB0 polymorphisms may influence SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity", *Transplantation*, **105**(1), pp.193- 200, DOI: 10.1097/TP.0000000000003507.
- [37] D.J. Langton, S.C. Bourke, B.A. Lie, et al. (2021), "The influence of HLA genotype on the severity of COVID-19 infection", *HLA*, **98**(1), pp.14-22, DOI: 10.1111/tan.14284.
- [38] F.M.A. Naemi, S.A. Adwani, H.A. Khatabi, et al. (2021), "Association between the HLA genotype and the severity of COVID-19 infection among South Asians", *J. Med. Virol.*, **93**(7), pp.4430-4437, DOI: 10.1002/jmv.27003.
- [39] C.A.M.L. Porta, S. Zapperi (2020), "Estimating the binding of SARSCoV-2 peptides to HLA class I in human subpopulations using artificial neural networks", *Cell Systems*, **11**(4), pp.412-417.
- [40] A. Nguyen, J.K. David, S.K. Maden, et al. (2020), "Human leukocyte antigen susceptibility map for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2", *J. Virol.*, **94**(13), DOI: 10.1128/JVI.00510-20.

- [41] Y. Tomita, T. Ikeda, R. Sato, T. Sakagami (2020), "Association between HLA gene polymorphisms and mortality of COVID-19: An in silico analysis", *Immun. Inflamm. Dis.*, **8**(4), pp.684-694.
- [42] X. Chen, B. Zhao, Y. Qu, et al. (2020), "Detectable serum severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 level in critically ill patients with coronavirus disease 2019", *Clin. Infect. Dis.*, **71**(8), pp.1937-1942, DOI: 10.1093/cid/ciaa449
- [43] K. Revai, J.A. Patel, J.J. Grady, et al. (2009), "Association between cytokine gene polymorphisms and risk for upper respiratory tract infection and acute otitis media", *Clin. Infect. Dis.*, **49**(2), pp.257-261, DOI: 10.1086/599833.
- [44] W.J. Doyle, M.L. Casselbrant, H.S.L. Korotky, et al. (2010), "The interleukin 6 -174 C/C genotype predicts greater rhinovirus illness", *J. Infect. Dis.*, **201**(2), pp.199-206, DOI: 10.1086/649559.
- [45] M. Keshavarz, H. Namdari, M. Farahmand, et al. (2019), "Association of polymorphisms in inflammatory cytokines encoding genes with severe cases of influenza A/H1N1 and B in an Iranian population", *Virology Journal*, **16**(1), DOI: 10.1186/s12985-019-1187-8.
- [46] F. Zehsaz, N. Farhangi, A. Monfaredan, et al. (2015), "IL-10 G-1082A gene polymorphism and susceptibility to upper respiratory tract infection among endurance athletes", *J. Sports Med. Phys. Fitness*, **55**(1-2), pp.128-134.
- [47] J.A. Patel, S. Nair, K. Revai, et al. (2006), "Association of proinflammatory cytokine gene polymorphisms with susceptibility to otitis media", *Pediatrics*, **118**(6), pp.2273-2279, DOI: 10.1542/peds.2006-0764.
- [48] R. Minkelen, M.C.H. Visser, J. Jeanine, et al. (2007), "Haplotypes of IL1B, IL1RN, IL1R1, and IL1R2 and the risk of venous thrombosis", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**(6), pp.1486-1491, DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.140384.
- [49] D.J. Brull, H.E. Montgomery, J. Sanders, et al. (2001), "Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**(9), pp.1458-1463.
- [50] S.C. Sanderson, M. Kumari, E.J. Brunner, et al. (2009), "Association between IL6 gene variants-174G>C and -572G>C and serum IL-6 levels: interactions with social position in the Whitehall II cohort", *Atherosclerosis*, **204**(2), pp.459-464, DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.019
- [51] C.F. Terry, V. Loukaci, F.R. Green (2000), "Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation", *J. Biol. Chem.*, **275**(24), pp.18138-18144.
- [52] J. Zuniga, I.B. Roldán, Y. Zhao, et al. (2012), "Genetic variants associated with severe pneumonia in A/H1N1 influenza infection", *Eur. Respir. J.*, **39**(3), pp.604-610, DOI: 10.1183/09031936.00020611.
- [53] S.C. Hoffmann, E.M. Stanley, E. Darrin, et al. (2002), "Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution", *Am. J. Transplant.*, **2**(6), pp.560-567, DOI: 10.1034/j.1600-6143.2002.20611.x.
- [54] Y. Wu, Z. Feng, P. Li, Q. Yu (2020), "Relationship between ABO blood group distribution and clinical characteristics in patients with COVID-19", *Clin. Chim. Acta.*, **509**, pp.220-223.
- [55] E.M. Diaz, J.L. Lopis, R. Parra, et al. (2021), "Relationship between the ABO blood group and COVID-19 susceptibility, severity and mortality in two cohorts of patients", *Blood Transfus.*, **19**(1), pp.54-63.
- [56] A. Abdollahi, M.M. Aliabadi, V. Mehrtash, et al. (2020), "The novel coronavirus SARS-CoV-2 vulnerability association with ABO/Rh blood types", *Iran J. Pathol.*, **15**(3), pp.156-160.
- [57] R.L. Hoiland, N.A. Fergusson, A.R. Mitra, et al. (2020), "The association of ABO blood group with indices of disease severity and multiorgan dysfunction in COVID-19", *Blood Adv.*, **4**(20), pp.4981-4989, DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002623.
- [58] S.C. Wu, C.M. Arthur, J. Wang, et al. (2021), "The SARS-CoV-2 receptor-binding domain preferentially recognizes blood group A", *Blood Adv.*, **5**(5), pp.1305-1309, DOI: 10.1182/bloodadvances.2020003259.
- [59] L. Cooling (2015), "Blood groups in infection and host susceptibility", *Clin. Microbiol. Rev.*, **28**(3), pp.801-870.
- [60] N.H. Nguyen, T.V. Nguyen, A.Q. Nguyen, et al. (2020), "The first cohort of the COVID-19 patients in Vietnam and the national response to the pandemic", *Int. J. Med. Sci.*, **17**(16), pp.2449-2453, DOI: 10.7150/ijms.45449.
- [61] D.T. Nguyen, H.V. Nguyen, A.Q. Nguyen, et al. (2021), "Polymorphism of the *TMPRSS2* gene relating to COVID-19 susceptibility in Vietnamese population", *Academia Journal of Biology*, **43**(1), pp.119-128.
- [62] E.S. Rosenberg, E.M. Dufort, U. Tomoko, et al. (2020), "Association of treatment with hydroxychloroquine or azithromycin with in-hospital mortality in patients with COVID-19 in New York State", *JAMA*, **323**(24), pp.2493-2502, DOI: 10.1001/jama.2020.8630.
- [63] E. Maillart, S. Leemans, H.V. Noten, et al. (2020), "A case report of serious haemolysis in a glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient COVID-19 patient receiving hydroxychloroquine", *Infect. Dis. (Lond)*, **52**(9), pp.659-661, DOI: 10.1080/23744235.2020.1774644.
- [64] J.Y. Lee, N. Vinayagamoorthy, K. Han, et al. (2016), "Association of polymorphisms of cytochrome P450 2D6 with blood hydroxychloroquine levels in patients with systemic lupus erythematosus", *Arthritis. Rheumatol.*, **68**(1), pp.184-190, DOI: 10.1002/art.39402.
- [65] X.J. He, L.M. Zhao, F. Qiu, et al. (2009), "Influence of *ABCB1* gene polymorphisms on the pharmacokinetics of azithromycin among healthy Chinese Han ethnic subjects", *Pharmacol. Rep.*, **61**(5), pp.843-850.
- [66] The U.S. Food and Drug Administration (2021), *Fact Sheet for Health Care Providers: Emergency Use Authorization (EUA) of Remdesivir (GS-5734™)*, 36pp.
- [67] I.S. Mahmoud, Y.B. Jarrar, W. Alshaer, et al. (2020), "SARS-CoV-2 entry in host cells-multiple targets for treatment and prevention", *Biochimie*, **175**, pp.93-98, DOI: 10.1016/j.biochi.2020.05.012.
- [68] Y. Hou, J. Zhao, W. Martin, et al. (2020), "New insights into genetic susceptibility of COVID-19: An ACE2 and *TMPRSS2* polymorphism analysis", *BMC Med.*, **18**(1), DOI: 10.1186/s12916-020-01673-z.
- [69] B. Hu, S. Huang, L. Yin (2021), "The cytokine storm and COVID-19", *Journal of Medical Virology*, **93**(1), pp.250-256.
- [70] B.N.V. Fernandez, J. Duconge, A.M. Espino, et al. (2021), "Personalized health and the coronavirus vaccines - Do individual genetics matter?", *Bioessays*, **43**(9), DOI: 10.1002/bies.202100087.
- [71] A. Synowiec, M. Jedrysik, W. Branicki, et al. (2021), "Identification of cellular factors required for SARS-CoV-2 replication", *Cells*, **10**(11), DOI: 10.3390/cells10113159.
- [72] J.D. Trimarco, B.E. Heaton, R.R. Chaparian, et al. (2021), "TMEM41B is a host factor required for the replication of diverse coronaviruses including SARS-CoV-2", *PLOS Pathog.*, **17**(5), DOI: 10.1371/journal.ppat.1009599.
- [73] S. Zhang, J. Wang, G. Cheng (2021), "Protease cleavage of RNF20 facilitates coronavirus replication via stabilization of SREBP1", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **118**(37), DOI: 10.1073/pnas.2107108118.
- [74] J.L. Casanova, H.C. Su (2020), "A global effort to define the human genetics of protective immunity to SARS-CoV-2 infection", *Cell*, **181**(6), pp.1194-1199.

Độc lực và ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên sự phát triển của *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá rô phi và biến đổi mô bệnh học trên cá nhiễm bệnh

Đoàn Thị Ninh^{1,2}, Vũ Đức Mạnh¹, Nguyễn Thị Hương Giang³, Đặng Thị Lệ², Trương Đình Hoài^{1*}

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, phường Đình Bảng, TP Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam

³Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 10/9/2021; ngày chuyển phản biện 15/9/2021; ngày nhận phản biện 13/10/2021; ngày chấp nhận đăng 18/10/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá độc lực, ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên sinh trưởng của *Aeromonas hydrophila* và biến đổi mô bệnh học trên cá rô phi. Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá nghi nhiễm thu từ các ao/lồng nuôi ở một số tỉnh miền Bắc sau khi được định danh bằng phương pháp sinh hóa, PCR và phân tích trình tự gen đặc hiệu *16S rRNA*, House keeping (gen nội chuẩn - *gyrB*) được sử dụng để cảm nhiễm cho cá rô phi và đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên sự phát triển của chúng. Kết quả cho thấy, liều gây chết 50% (LD_{50}) cá thí nghiệm của *A. hydrophila* trung bình là $4,6 \times 10^5$ CFU/cá, cá cảm nhiễm thể hiện các dấu hiệu bệnh giống khi mắc bệnh tự nhiên (xuất huyết gốc vây, da, hậu môn, xuất huyết và tổn thương các nội quan như: gan, thận, lách, ruột). Các đặc điểm bệnh lý vi thể gồm mang tăng sinh, xuất huyết, mô nội quan như gan, thận, lách xung huyết, xuất huyết và thoái hóa, não xâm nhiễm vi khuẩn gây bệnh. Các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá rô phi có sức kháng rất mạnh với yếu tố bất lợi trong môi trường nuôi, chúng có thể tồn tại và phát triển ở khoảng nhiệt rộng (15-45°C), độ mặn 0-60‰, pH 5-10. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học nhằm xây dựng chiến lược và hỗ trợ công tác phòng chống dịch bệnh do *A. hydrophila* cho cá rô phi nói riêng và các loài cá nước ngọt nói chung.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila*, độc lực, mô bệnh học, rô phi, yếu tố môi trường.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Cá rô phi (*Oreochromis* spp.) là đối tượng ăn tạp, có khả năng chống chịu tốt với điều kiện mật độ nuôi cao, khoảng biến động rộng các yếu tố môi trường; dễ nuôi, chi phí nuôi thấp, đặc biệt thịt cá rô phi có màu trắng, ít xương dăm, phù hợp cho chế biến xuất khẩu và được thị trường ưa chuộng [1]. Theo báo cáo của FAO năm 2018, cá rô phi là đối tượng được nuôi rộng rãi ở khoảng 135 nước trên thế giới [2]. Tại Việt Nam, với lợi thế lớn về diện tích mặt nước, cá rô phi được định hướng phát triển thành loài nuôi chủ lực, ưu tiên mở rộng diện tích sản xuất, tạo thành các vùng nguyên liệu lớn như nuôi lồng ở các hồ chứa, lưu vực sông và phát triển nuôi thâm canh trong ao ở vùng đồng bằng để phục vụ chế biến và xuất khẩu. Mục tiêu đến năm 2030, diện tích vùng nuôi cá rô phi đạt 40.000 ha và 1,8 triệu m³ lồng với sản lượng đạt 400.000 tấn [3].

Vi khuẩn *Aeromonas* spp. phân bố ở nhiều hệ sinh thái khác nhau, thường được tìm thấy trong môi trường thủy sinh, nước ngọt, lợ, mặn, trong nước thải sinh hoạt, nước tưới thủy nông và các dạng thủy vực khác [4-6]. Nhiều loài vi khuẩn *Aeromonas* là tác nhân gây bệnh trên các đối tượng nuôi thủy sản [7]. Trong đó, *A. hydrophila* được xác định là tác nhân vi khuẩn thường gặp, gây thiệt hại kinh tế lớn cho ngành nuôi thủy sản, đặc biệt là với các mô hình nuôi thâm canh mật độ cao. Cá nhiễm bệnh thường có triệu chứng xuất huyết da, gốc vây và nội tạng, gây rối loạn chuyển hóa và nếu không có biện pháp phòng trị kịp thời tỷ lệ chết có thể ở mức

rất cao [8]. Trên thế giới, vi khuẩn *A. hydrophila* đã được báo cáo gây bùng phát bệnh trên cá rô phi ở nhiều nước như Iraq [9], Thái Lan [10], Ai Cập [11], Malaysia [12], Brazil [13], Trung Quốc [14].

Độc lực, tổn thương bệnh lý và tác động của các yếu tố môi trường lên sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn này là những thông tin quan trọng, là cơ sở khoa học cho việc xây dựng các phương pháp phòng và kiểm soát bệnh, tuy nhiên tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu chuyên sâu về các đặc tính của *A. hydrophila* gây bệnh trên cá rô phi. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, đánh giá độc lực của *A. hydrophila*, biến đổi mô bệnh học của cá nhiễm bệnh và ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy lên sự phát triển của vi khuẩn này. Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học để nâng cao hiệu quả phòng trị bệnh do *A. hydrophila* gây ra trên cá rô phi nói riêng và các loài cá nước ngọt nói chung.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Cá rô phi nghi nhiễm *A. hydrophila* (n=65) được thu ở một số vùng nuôi của 5 tỉnh Hải Dương (n=16), Bắc Ninh (n=12), Hòa Bình (n=18), Yên Bái (n=10) và Hà Nam (n=9) dùng để phân lập vi khuẩn gây bệnh. Vật liệu nghiên cứu chủ yếu bao gồm: cá rô phi khỏe mạnh cỡ 25-30 g mua từ Trại sản xuất giống ở Bắc Ninh để phục

*Tác giả liên hệ: Email: tdhoai@vnua.edu.vn

Examination of virulence and the effects of environmental conditions on the growth of *Aeromonas hydrophila* in farmed tilapia and histopathological changes in infected fish

Thi Ninh Doan^{1,2}, Duc Manh Vu¹,
Thi Huong Giang Nguyen³, Thi Lua Dang²,
Dinh Hoai Truong^{1*}

¹Faculty of Fisheries, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

²Research Institute for Aquaculture No. 1,
Dinh Bang Ward, Tu Son City, Bac Ninh Province, Vietnam

³Faculty Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 10 September 2021; revised 13 October 2021; accepted 18 October 2021

Abstract:

The study aims to examine the pathogenicity, the effects of environmental conditions on the growth of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, and histopathological changes in infected fish. *A. hydrophila* isolates, which were recovered from diseased tilapia samples collected at farming cages/ponds in several northern Vietnam provinces, were identified by biochemical tests, PCR confirmation, and sequencing of 16S rRNA and housekeeping genes (*gyrB*). Three representative strains after identification were subjected to evaluate the pathogenicity via challenge experiments using the intraperitoneal injection method and to determine the impacts of environmental factors on their growth. The present study showed an average LD₅₀ value (lethal dose 50%) of *A. hydrophila* to tilapia at 4.6×10^5 CFU/fish, the infected fish in the challenge tests presented the clinical and gross lesions similar to the natural diseased fish, including haemorrhaging at the base of fins, skin, anal opening and in visceral organs, especially in liver and intestine. Histopathological examination of the diseased fish showed the hyperplasia of epithelial cells and haemorrhage of the gill filaments. The tissues of the liver, kidney, and spleen exhibited the lesion of haemorrhage, congestion, and degeneration, while the brain tissue appeared the colonisation by the bacteria. The *A. hydrophila* strains from tilapia showed a high tolerance to environmental conditions with the capacity to survive and multiply at a temperature of 15–45°C, a salinity of 0–60‰ and a pH of 5–10. The present results provide useful information to establish the strategies in prevention of *A. hydrophila* infection in tilapia and other freshwater fish.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, environmental condition, histopathology, tilapia, virulence.

Classification number: 4.5

vụ thí nghiệm cảm nhiễm; môi trường Tryptic soya broth, Tryptic soya agar (TSB và TSA, Merck), Rimler short (RS, HiMedia) phục vụ nuôi cấy, phân lập vi khuẩn. Bộ thuốc nhuộm vi khuẩn gram (Merck), kit chiết tách DNA thương mại Insta Gene Matrix (Bio-Rad), GoTaq PCR green (Promega) và các hóa chất, máy móc, thiết bị trong phòng thí nghiệm phục vụ trong kỹ thuật PCR; hệ thống bể thí nghiệm và một số trang thiết bị, dụng cụ cần thiết khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu, nuôi cấy, phân lập vi khuẩn: Cá nghi nhiễm *A. hydrophila* (xuất huyết da, gốc vây, mòn vây) thu từ các ao nuôi đang bị bệnh được phân tích đặc điểm lâm sàng và bệnh tích đại thể. Vi khuẩn từ thận cá bệnh được ria cấy trên môi trường TSA và nuôi cấy ở 28°C trong 24 giờ. Các mẫu vi khuẩn có hình dạng khuẩn lạc tròn, rìa đều, màu vàng bơ chiếm ưu thế được lựa chọn và tiến hành phân lập, nuôi cấy lặp lại 3 lần để thu chủng thuần. Các chủng được tiếp tục sàng lọc qua bước nuôi cấy trên môi trường RS, là môi trường chọn lọc *A. hydrophila*. Vi khuẩn được lưu giữ trong glycerol ở -80°C để sử dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp định danh vi khuẩn bằng phản ứng sinh hóa: Tổng số 45 chủng vi khuẩn phát triển tốt trên môi trường RS được lựa chọn ngẫu nhiên để đưa vào thử sinh hóa. Hình dạng vi khuẩn được quan sát sau nhuộm gram dưới kính hiển vi (100x), tính di động của vi khuẩn được soi tươi dưới kính hiển vi (100x); các phép thử catalase, oxidase và O/129 được thực hiện theo Abbott và cs (2003) [4]. Một số đặc tính sinh hóa khác được đánh giá bằng bộ kit API 20E theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Những chủng có kết quả thử sinh hóa trùng với chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC7966 được lựa chọn để đưa vào các bước định danh tiếp theo.

Phương pháp tách chiết DNA và giám định vi khuẩn gây bệnh bằng sinh học phân tử:

- Tách chiết DNA: Những chủng vi khuẩn sơ bộ định danh là *A. hydrophila* qua phản ứng sinh hóa được sử dụng để tách chiết DNA. DNA của vi khuẩn được tách chiết bằng bộ kit InstaGene (Bio-Rad, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA vi khuẩn sau khi tách được lưu giữ trong điều kiện âm sâu (-20°C) phục vụ giám định vi khuẩn bằng PCR.

- Sàng lọc vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR: DNA của một số chủng vi khuẩn đại diện (n=5) đã được định danh sơ bộ bằng phản ứng sinh hóa được lựa chọn và tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR sử dụng primers đặc hiệu cho giống vi khuẩn *Aeromonas* và loài *A. hydrophila* (bảng 1). Hỗn dịch cho 1 phản ứng PCR có thể tích tổng 20 µl, bao gồm 10 µl GoTaq green Master Mix (Promega), 1,5 µl mỗi primer xuôi và ngược, 3 µl mẫu DNA, 4 µl nước tách DNA. Hỗn dịch được đưa vào máy luân nhiệt để khuếch đại cho quá trình khếch đại DNA theo chu trình nhiệt như sau: tiền biến tính ở 95°C trong 4 phút; 35 chu kỳ lặp lại với biến tính ở 95°C trong 30s, gắn mồi ở 58°C trong 30s, kéo dài ở 72°C trong 60s; giai đoạn kéo dài sau cùng ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được phân tích trên máy điện di sử dụng bản gel chứa 1% agarose nhuộm bằng dung dịch Redsafe (Intron, Hàn Quốc). Hình ảnh điện di bản gel được chụp bằng hệ thống Gel imager (Bio-Rad, Mỹ).

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng để giải trình tự và giám định vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR.

Gen	Primers	Trình tự DNA (5'→3')	Kích cỡ sản phẩm (bp)	Nguồn
<i>16S rRNA</i> Universal bacteria ⁽¹⁾	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1500	[15]
	1525R	ACGGTACCTTGTACGACTT		
<i>gyrB</i> ⁽¹⁾	gyrB 3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1110	[16]
	gyrB 14R	TTGTCCGGGTGTACTCGTC		
<i>16S rRNA</i> ⁽²⁾	Aero16S-F	CTACTTTTGCCGCGAGCGG	953	[17]
	Aero16S-R	TGATCCCCGAAGCACTCCC		
<i>AeroH</i> ⁽²⁾	AeroH-F	GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA	625	[18]
	AeroH-R	CGTGCTGGCAACAAGGACAG		

(¹): primers sử dụng cho giải trình tự gen; (²): primers sử dụng cho quá trình giám định bằng PCR.

- Giải trình tự gen *16S rRNA*, House Keeping *gyrB* và xây dựng cây phả hệ: một số chủng vi khuẩn đại diện (n=3) có kết quả dương tính với cả 2 gen giống *Aeromonas* và loài *A. hydrophila* sau khi sàng lọc bằng PCR được gửi đi giải trình tự gen *16S rRNA* và *gyrB* tại Viện Gen và Công nghệ Sinh học (Biotec), Thái Lan. Trình tự các cặp mồi *16S rRNA* chung của vi khuẩn (27F/1525R, ~1500 bp) [15] và *gyrB* (*gyrB* 3F/*gyrB* 14R, 1110 bp) [16] được trình bày ở bảng 1.

Trình tự gen của các chủng vi khuẩn thu được được đối chiếu và so sánh mức độ tương đồng với trình tự của các chủng vi khuẩn chuẩn cùng giống *Aeromonas* và cùng loài chủng *A. hydrophila* ATCC7966 trên ngân hàng gen bằng Blast N algorithm. Tiến hành xây dựng cây phả hệ theo phương pháp Neighbor-joining [19] trên phần mềm Mega10 [20].

Đánh giá độc lực của vi khuẩn thông qua thí nghiệm cảm nhiễm: Cá rô phi giống được nuôi thuần 1 tuần trong bể thể tích 500 l để làm quen với các điều kiện thí nghiệm. Các thông số môi trường được đảm bảo để không ảnh hưởng đến sức khỏe của cá trong thời gian nuôi thuần hóa. Cá được kiểm tra và xét nghiệm để đảm bảo khỏe mạnh trước khi tiến hành thí nghiệm. Ba chủng *A. hydrophila* giám định thành công được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy UV-Vis ở bước sóng 600 nm (OD_{600}) và phương pháp đếm trên đĩa thạch. Tiến hành điều chỉnh và pha loãng vi khuẩn bằng dung dịch PBS (Phosphate buffered saline) tạo thành dãy nồng độ 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 và 1×10^4 CFU/ml để sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm.

Với mỗi chủng vi khuẩn, 270 cá khỏe mạnh được sử dụng để tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm, cá được bố trí vào các bể thể tích 100 l, mỗi bể 15 con. Cá cảm nhiễm được tiêm với lượng 0,1 ml dịch khuẩn tương ứng với các mức nồng độ vi khuẩn để tạo ra dãy nồng độ tiêm 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 CFU/cá và 1 lô đối chứng được tiêm tương tự bằng PBS. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Cá được cho ăn bằng thức ăn công nghiệp và đảm bảo các điều kiện môi trường trong khoảng phù hợp cho cá sinh trưởng, như nhiệt độ 25-30°C, pH 7-8, DO > 5 mg/l, TAN < 1 mg/l. Cá sau tiêm được theo dõi trong 14 ngày, hàng ngày quan sát và ghi chép số lượng cá chết. Các mẫu cá mới chết hoặc sắp chết được sử dụng

để tái phân lập và định danh lại tác nhân gây bệnh và thu mẫu để đánh giá biến đổi mô học. Dựa vào số tỷ lệ cá chết, liều gây chết 50% cá thí nghiệm (LD_{50}) được tính theo công thức của L.J. Reed và cs (1938) [21] như sau:

$$LD_{50} = 10^{(a-x)}$$

trong đó a là nồng độ (số lũy thừa) mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (trên 50%); x được tính theo công thức: $x = (P_a - 50) / (P_u - P_a)$, với P_a , P_u là tỷ lệ cận trên và cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

Phương pháp làm tiêu bản mô học và xác định biến đổi mô học: Tổng số 15 mẫu cá sắp chết và có dấu hiệu xuất huyết nặng trong quá trình cảm nhiễm và 2 mẫu cá khỏe mạnh ở lô đối chứng được sử dụng để thu mẫu mô mang, lách, thận, gan, ruột và não. Các mẫu mô được cố định trong buffer formalin 10%, sau đó được đúc parafin, cắt thành các tiêu bản có độ dày < 5 μ m, nhuộm bằng thuốc hematoxylin và eosin (H&E) theo quy trình nghiên cứu mô bệnh học được mô tả bởi [22, 23]. Các biến đổi bệnh lý vi thể trên các tiêu bản được đánh giá bằng kính hiển vi với các độ phóng đại khác nhau (x10, x40, x100).

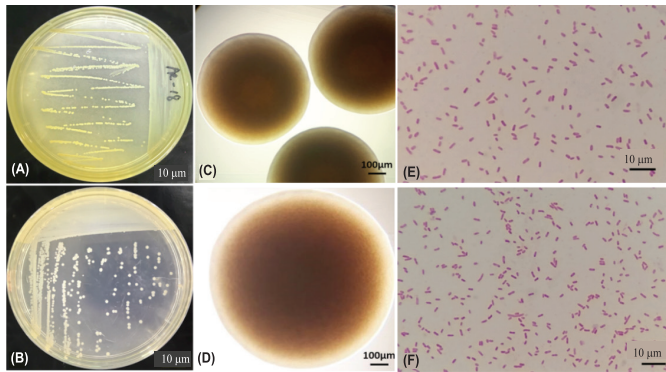
Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, độ muối và pH lên sinh trưởng của vi khuẩn: Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy bao gồm nhiệt độ, độ muối và pH lên quá trình sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá đối với 3 chủng vi khuẩn đã sử dụng để cảm nhiễm. Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, tiến hành nuôi cấy vi khuẩn ở các khoảng nhiệt độ 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40 và 45°C sử dụng thiết bị nuôi cấy có điều chỉnh nhiệt độ. Với độ mặn, bổ sung NaCl vào môi trường nuôi cấy để đạt được các mức độ mặn thử nghiệm 0, 20, 40, 50, 55, 60 và 65‰. Đối với pH, môi trường nuôi được điều chỉnh bằng NaOH 1 M và HCl 1 M để đạt được các ngưỡng pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9,5 và 10. Mỗi yếu tố thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Các mức môi trường thí nghiệm được lựa chọn và thiết lập dựa trên các thử nghiệm sơ bộ của nhóm nghiên cứu (số liệu không trình bày) và kết quả công bố của S. Palumbo và cs (1985) [24]. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường tăng sinh TSB với các mức nhiệt độ, độ muối và pH đã thiết kế và theo dõi sinh trưởng thông qua giá trị đo mật độ quang OD_{600} sau 24 giờ nuôi cấy. Đối với các lô thử nghiệm độ mặn và pH, vi khuẩn được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ phù hợp là 28°C.

Phương pháp phân tích số liệu: Số liệu tỷ lệ chết theo ngày của cá ở các lô cảm nhiễm được phân tích thống kê mô tả lấy giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (SD). Kết quả đo mật độ quang OD_{600} của dịch khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy được đánh giá bằng phân tích thống kê, kết hợp với so sánh giữa các nghiệm thức bằng phân tích ANOVA, sử dụng phép so sánh Turkey Post-Hoc trên phần mềm SPSS20 và Excel 2013.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn *A. hydrophila*

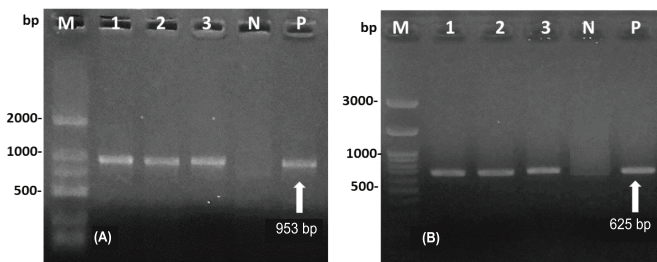
Quá trình nuôi cấy và phân lập vi khuẩn từ cá rô phi nghi nhiễm *A. hydrophila* thu ở các ao nuôi tại Hải Dương, Hà Nam, Hòa Bình, Bắc Ninh, Yên Bái thu được 45 chủng thuần trên môi trường RS với khuẩn lạc có hình tròn, rìa bằng hơi lồi, màu vàng nhạt, đường kính 1,2-1,5 mm, vi khuẩn bắt màu gram âm, hình que ngắn, tròn 2 đầu, kích cỡ 1,5-2,5 μ m (hình 1).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và hình dạng vi khuẩn *A. hydrophila* khi nuôi cấy trên môi trường RS (A, C, E) và trên TSA (B, D, F) sau 24 giờ ở nhiệt độ 28°C.

Tất cả 45 chủng phát triển trên môi trường RS được đưa vào thử một số đặc tính sinh hóa, kết quả thu được 22/45 chủng có các đặc tính sinh hóa trùng với chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC7966 như có khả năng di động, dương tính với các phép thử oxidase, catalase, sinh citrate, indol, H₂S và âm tính với các phép thử sinh urea, inositol, sorbitol được định danh sơ bộ là *A. hydrophila* (bảng 2). Như vậy, 23 chủng phát triển trên môi trường RS còn lại không có các đặc tính sinh hóa tương đồng với vi khuẩn *A. hydrophila*. Trong những năm gần đây, các loài *Aeromonas* ngày càng được định danh chi tiết thành các nhóm dưới loài, do vậy nhiều loài *Aeromonas* sp. có thể phát triển trên môi trường RS và cùng có chung một số đặc tính sinh hóa nhất định nhưng thuộc loài khác nhau, chính vì vậy việc định danh loài trọng nhóm vi khuẩn *Aeromonas* được khuyến cáo bổ sung sàng lọc bằng kỹ thuật PCR trước khi giải trình tự và phân tích cây phả hệ các gen *16S rRNA* và *gyrB* so với chủng chuẩn [4, 25].

Từ 22 chủng định danh sơ bộ là *A. hydrophila* qua các đặc điểm sinh hóa, 5 chủng vi khuẩn đại diện đã được lựa chọn ngẫu nhiên để tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR và thu được 3 chủng có kết quả dương tính với cả 2 cặp môi sử dụng để định danh giống *Aeromonas* (hình 2A) và gen loài *A. hydrophila* (hình 2B).

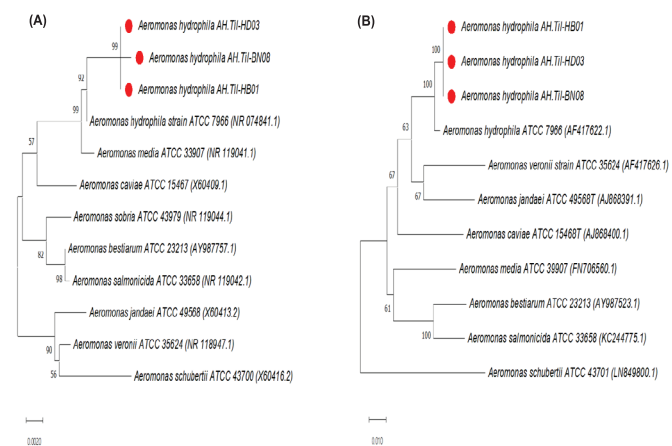


Hình 2. Kết quả sàng lọc bằng PCR một số chủng vi khuẩn sử dụng 2 cặp môi đặc hiệu cho giống *Aeromonas* (953 bp, A) và đặc hiệu cho loài vi khuẩn *A. hydrophila* (625 bp, B). M: marker; giếng 1-3: 3/5 chủng vi khuẩn dương tính; N: đối chứng âm (nước muối sinh lý); P: đối chứng dương - chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC7966.

Kết quả phân tích tương đồng về trình tự gen và lập cây phả hệ cho thấy, gen *16S rRNA* và *gyrB* của 3 chủng vi khuẩn đại diện sau sàng lọc bằng sinh hóa và PCR đều có sự tương đồng cao với gen *16S rRNA* và *gyrB* chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC7966, tỷ lệ tương đồng của gen *16S rRNA* là 99,48-99,61% và *gyrB* là 99,1-99,2% (hình 3).

Bảng 2. Đặc điểm hình thái, sinh hóa các chủng vi khuẩn sơ bộ định danh là *A. hydrophila* phân lập từ cá rô phi.

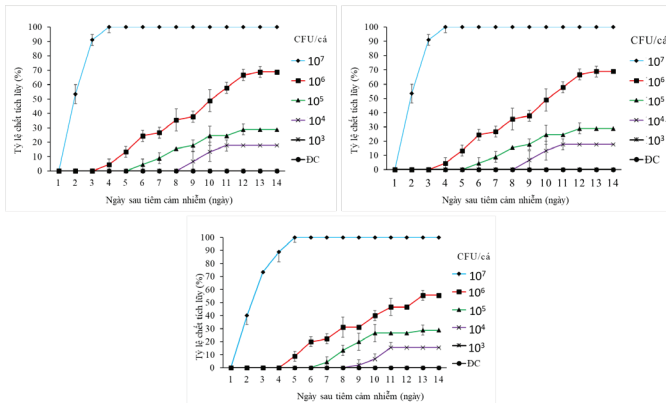
Đặc điểm sinh hóa	Các chủng nghi <i>A. hydrophila</i> phân lập được (n=22)	<i>A. hydrophila</i> ATCC7966
Gram	-	-
Hình dạng	Que ngắn	Que ngắn
Di động	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
O/129 test	-	-
β-galactosidase (ONPG)	+	+
Arginine dihydrolase (ADH)	+	+
Lysine decarboxylase (LDC)	+	-
Ornithine decarboxylase (ODC)	-	-
Citrate utilisation (CIT)	+	+
H ₂ S production (H ₂ S)	+	+
Urease (URE)	-	-
Indole production (IND)	+	+
Voges-Proskauer (VP)	+	+
Gelatinase (GEL)	+	+
Acid production		
Glucose (GLU)	+	+
Mannitol (MAN)	+	+
Inositol (INO)	-	-
Sorbitol (SOR)	-	-
Rhamnose (RHA)	Dao động	Dao động
Melibiose	-	-
Sucrose (SAC)	+	+
Amygdalin	-	-
Arabinose (ARA)	+	-



Hình 3. Kết quả phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự gen *16S rRNA* (A) và *gyrB* (B) của 3 chủng đại diện được lựa chọn sau khi sàng lọc bằng sinh hóa và PCR so với các loài *Aeromonas* khác từ dữ liệu Genbank sử dụng phương pháp Neighbour-joining, bootstraps 1000 lần lặp.

3.2. Kết quả đánh giá độc lực của vi khuẩn *A. hydrophila* thông qua cảm nhiễm

Thử nghiệm cảm nhiễm được thực hiện trên 3 chủng vi khuẩn AH.Til-HB01, AH.Til-HD03 và AH.Til-BN08 đã được định danh thành công bằng sinh hóa, PCR và giải trình tự gen. Kết quả thí nghiệm cho thấy, xu hướng gây chết cá thí nghiệm khi cảm nhiễm bằng 3 chủng vi khuẩn diễn ra ở các nồng độ tiêm tương đối giống nhau. Ở nồng độ tiêm cao nhất (10^7 CFU/cá), cá chết nhanh sau khi tiêm, tỷ lệ chết dao động từ 40,0 đến 72,2% ngay sau 24 giờ tiêm và chết hoàn toàn sau 3-4 ngày tiêm mà không xuất hiện dấu hiệu bệnh tích rõ ràng. Ở nồng độ tiêm thấp hơn (10^6 CFU/cá), cá chết chậm hơn, bắt đầu chết sau 4-5 ngày tiêm và tăng dần đến mức 55,6-68,9% sau 14 ngày gây nhiễm. Ở nồng độ tiêm 10^5 và 10^4 CFU/cá, tỷ lệ chết tương ứng chỉ ở mức 28,9-35,6% và 15,6-17,8% trong khi không có cá chết trong lô tiêm liều 10^3 CFU/cá và lô đối chứng tiêm PBS. Giá trị LD_{50} của 3 chủng tiêm gây nhiễm AH.Til-HB01, AH.Til-HD03 và AH.Til-BN08 tương ứng ở mức $4,5 \times 10^5$, $3,4 \times 10^5$ và $6,2 \times 10^5$ CFU/cá, trung bình đạt $4,6 \times 10^5$ CFU/cá (hình 4).



Hình 4. Biến động tỷ lệ cá rô phi chết sau cảm nhiễm bằng 3 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* là A-AH.Til-HB01, B-AH.Til-HD03, C-AH.Til-BN08.

Các lô thí nghiệm với liều tiêm 10^4 - 10^6 CFU/cá xuất hiện dấu hiệu lâm sàng và bệnh tích tương đồng với cá nhiễm bệnh ngoài tự nhiên như xuất huyết gốc vây, xương nắp mang, xuất huyết cục bộ trên da. Nhiều mẫu cá nhiễm bệnh có dấu hiệu sưng, trướng bụng do tăng sinh dịch trong ổ bụng. Bệnh tích đại thể như xuất huyết nội tạng đặc biệt ở gan, ruột hay hiện tượng sưng, tăng kích cỡ nội tạng như gan, mật là các đặc điểm hoàn toàn tương đồng với cá bị nhiễm bệnh *A. hydrophila* thu từ ao/lồng nuôi. Kết quả nuôi cấy, giám định lại bằng PCR một số chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu cá chết trong quá trình cảm nhiễm đều cho kết quả vi khuẩn *A. hydrophila*.

Như vậy, nghiên cứu đặc tính độc lực khẳng định cá rô phi mẫn cảm với vi khuẩn *A. hydrophila* khi được cảm nhiễm qua con đường tiêm và tỷ lệ chết của cá phụ thuộc vào nồng độ tiêm. Trong nghiên cứu, giá trị LD_{50} trung bình xác định được ở mức $4,6 \times 10^5$ CFU/cá, cao hơn so với kết quả nghiên cứu của N.A. Pauzi và cs (2020) [12] thử nghiệm trên cá điêu hồng ($1,1 \times 10^4$ CFU/cá). Sự khác biệt về liều gây chết LD_{50} có thể do sự khác biệt về đặc tính độc lực giữa các chủng vi khuẩn, tuổi của cá thí nghiệm và các yếu tố gây stress ảnh hưởng trong quá trình thí nghiệm và chăm sóc cá [26]. Tuy nhiên, đối với *A. hydrophila*, liều gây chết $4,6 \times 10^5$ CFU/cá cũng được coi



Hình 5. Dấu hiệu lâm sàng và triệu chứng bệnh tích trên cá nhiễm *A. hydrophila* tự nhiên (A1, A2, B1, B2) và từ cá cảm nhiễm (C1, C2, D1, D2) với biểu hiện xuất huyết gốc vây, xương nắp mang, hậu môn, xuất huyết nội quan như gan, ruột (mũi tên đỏ).

là khá cao khi so sánh với một số nghiên cứu trên ký chủ khác như cá quả là 1×10^8 CFU/cá [27] và cá sặc là $4,53 \times 10^6$ CFU/cá [28]. Hiện tượng cá rô phi thí nghiệm chết nhanh khi sử dụng liều tiêm có nồng độ vi khuẩn cao quan sát được trong nghiên cứu có thể do hàm lượng cao của một số loại độc tố do vi khuẩn tiết ra gây độc, gây chết cấp tính khi chưa thể hiện rõ dấu hiệu lâm sàng của bệnh. Hiện tượng cá cảm nhiễm chết cấp tính cũng đã được báo cáo ở một số nghiên cứu trước đây khi sử dụng liều gây nhiễm ở mật độ vi khuẩn cao [26, 29]. Kết quả cảm nhiễm trong nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy sử dụng liều tiêm nồng độ thấp (10^4 - 10^6 CFU/cá), cá thí nghiệm sẽ xuất hiện triệu chứng và bệnh tích xuất huyết điển hình của bệnh.

3.3. Đặc điểm mô bệnh học của cá nhiễm *A. hydrophila*

Kết quả đánh giá các tổn thương bệnh lý vi thể từ mẫu mô mang, gan, thận, lách, ruột và não của 15 mẫu cá cảm nhiễm *A. hydrophila* ở các nồng độ tiêm 10^4 - 10^6 CFU/cá được thể hiện ở bảng 3.

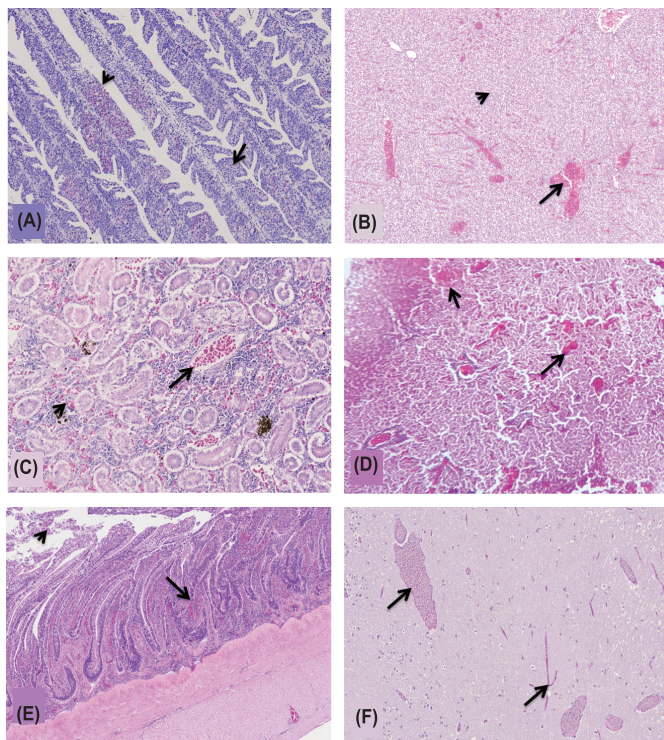
Bảng 3. Bệnh tích vi thể của cá rô phi cảm nhiễm với *A. hydrophila* (n=15*).

Cơ quan	Biến đổi bệnh lý vi thể				
	Xung huyết	Xuất huyết	Tụ huyết	Tăng sinh	Thoái hóa
Mang	15	15	-	13	8
Gan	15	15	13	-	6
Lách	-	-	10	-	-
Thận	-	9	6	-	5
Ruột	15	15	13	8	6
Não	12	3	-	-	-

*: tổng 45 tiêu bản với mỗi cơ quan đánh giá ở 3 tiêu bản ở 3 vị trí khác nhau; (-): không xuất hiện.

Kết quả kiểm tra tiêu bản mô học cho thấy, biến đổi chủ yếu trên mô mang cá nhiễm *A. hydrophila*, bao gồm xung huyết, xuất huyết và tăng sinh tế bào biểu mô mang và tế bào nhày, dẫn đến các tia mang thứ cấp dính, vón vào nhau (hình 6A). Hiện tượng này làm giảm diện tích tiếp xúc giữa các tia mang và môi trường nước, giảm khả năng trao đổi khí giữa cơ thể và môi trường nước bên ngoài, dẫn đến cá thiếu oxy, cá bệnh thường bơi lơ lờ và ngáp khí. Mô gan cá nhiễm bệnh có hiện tượng xung huyết và xuất huyết khá nghiêm trọng, ngoài ra một số mẫu có kèm theo hiện tượng thoái hóa dạng không bào (hình 6B). Thận cá xuất huyết, tụ huyết và một số cá bắt đầu có hiện tượng thoái hóa nhu mô thận (hình 6C). Lách là cơ quan tạo máu chính của cá, khi cá nhiễm *A. hydrophila* thường có lách sưng to và tụ máu (hình 6D). Ruột là nơi có biểu hiện rõ nhất, thành ruột xuất huyết nặng, một số mẫu thành ruột mỏng nhưng một số có hiện tượng tăng sinh biểu mô (hình 6E). Não cá có sự thâm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh, hiện tượng xung huyết não cũng thường được bắt gặp trên các mẫu cá nhiễm *A. hydrophila* (hình 6F).

Hiện tượng xuất huyết các cơ quan là dấu hiệu thường gặp khi cá bị nhiễm *A. hydrophila* và được cho là do phản ứng gây viêm cấp tính của ký chủ với mầm bệnh. Vi khuẩn *Aeromonas* có khả năng sản sinh ra nhiều dạng độc tố và chất tiết ngoại bào, đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm và gây bệnh trên ký chủ [30]. Khả năng tiết các enzyme gây tan máu là đặc trưng ở giống vi khuẩn *Aeromonas*, trong đó có *A. hydrophila* với 3 dạng đã được xác định [31]. Aerolysin là protein làm thay đổi khả năng thẩm thấu của tế bào máu khi được gắn lên các vị trí glycoprotein đặc hiệu trên màng

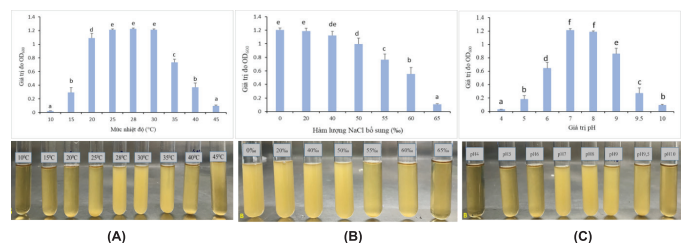


Hình 6. Biếm đồ mô bệnh học của cá rô phi cảm nhiễm *A. hydrophila*. (A) Mang tăng sinh, xuất huyết; (B) Gan xuất huyết, thoái hóa không bào; (C) Thận xuất huyết, tụ huyết; (D) Lách tụ máu; (E) Ruột xuất huyết, tăng sinh biểu mô; (F) Não thâm nhiễm nhiều vi khuẩn gây bệnh, xung huyết.

tế bào, thúc đẩy phân rã tế bào do mất cân bằng áp suất thẩm thấu [32]. Hai dạng khác bao gồm β -hemolysin, yếu tố gây dung huyết hồng cầu hoàn toàn và α -hemolysin gây dung huyết hồng cầu từng phần [33]. Các gen mã hóa cho các protein gây tan huyết đã được xác định có mặt trong hầu hết các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập trên cá nheo mỹ và cá hồi nhiễm bệnh [34, 35]. Khi vi khuẩn tiết ra cá sản phẩm độc tố này sẽ gây phá vỡ các mao mạch nhỏ, quá trình nhân lên của vi khuẩn càng nhiều theo diễn biến của bệnh, tình trạng xuất huyết sẽ thể hiện rõ hơn, tạo thành các khối viêm trên da, cá dần thiếu máu, bỏ ăn, bơi lơ lờ và nhiễm trùng huyết [36].

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ, độ mặn và pH lên sinh trưởng của vi khuẩn *A. hydrophila*

Vi khuẩn *A. hydrophila* thể hiện khả năng sống sót và phát triển tốt ở dải nhiệt độ khá rộng (hình 7A). Vi khuẩn phát triển tốt nhất ở khoảng nhiệt độ 25-30°C. Khi nằm ngoài khoảng nhiệt độ tối ưu này, vi khuẩn có xu hướng phát triển chậm hơn rõ rệt ($p < 0,05$). Mức nhiệt độ $< 10^\circ\text{C}$ và $> 45^\circ\text{C}$, vi khuẩn hầu như không phát triển. Đối với độ mặn, vi khuẩn *A. hydrophila* có khả năng phát triển tốt và sống sót được trong khoảng độ mặn rộng ở nhiệt độ nuôi cấy 28°C. Khi được nuôi cấy trong môi trường tăng sinh bổ sung NaCl ở nồng độ 0, 20 và 40‰, vi khuẩn đều phát triển tốt và đạt mật độ tương đương nhau với các giá trị đo OD_{600} tương ứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Khi tiếp tục tăng độ mặn, khả năng sinh trưởng của vi khuẩn suy giảm, tuy nhiên vi khuẩn vẫn thể hiện khả năng nhân lên chậm ở độ mặn 60‰ và tồn tại mà không phát triển ở độ mặn 65‰ (hình 7B). Đối với pH, vi khuẩn *A. hydrophila* phát triển tốt ở khoảng pH 6-9 và tối ưu ở môi trường có pH 7-8 khi nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C. Tuy nhiên, khi pH tăng lên đến 9,5 thì giá trị OD_{600} giảm xuống rất thấp ($\text{OD}_{600} = 0,267$). Ở mức pH 4 và 10, vi khuẩn vẫn tồn tại và nhân lên nhưng với mức độ rất kém (hình 7C).



Hình 7. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ (A), độ mặn (B) và pH (C) của môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng, phát triển của *A. hydrophila* gây bệnh ở cá rô phi.

Trong nghiên cứu này, mức độ sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn *A. hydrophila* tương đương nhau ở khoảng nhiệt độ 25-30°C và có sự suy giảm ở nhiệt độ 20°C, tương đồng với kết quả báo cáo ở một số nghiên cứu trước đó [19, 24]. Nhóm nghiên cứu S. Palumbo và cs (1985) [24] ghi nhận mức nhiệt 10°C vi khuẩn *A. hydrophila* vẫn tồn tại nhưng phát triển yếu sau 24 giờ nuôi cấy, tuy nhiên ở 12°C, vi khuẩn có thể phát triển và nhân lên sau 72-96 giờ nuôi cấy. Điều này cho thấy, vi khuẩn *A. hydrophila* có khả năng chống chịu và thích nghi tốt khi các điều kiện môi trường nuôi thay đổi. Ngoài ra, các điều kiện môi trường phù hợp cho sinh

trường và phát triển của động vật thủy sản nói chung và cá rô phi nói riêng (nhiệt độ 25-30°C, pH 6-8) cũng là khoảng môi trường phù hợp cho quá trình nhân lên của loài tác nhân gây bệnh này. Khi nhiệt độ tăng cao sẽ là điều kiện cho mầm bệnh phát triển và gây bệnh, do vậy sát trùng định kỳ trong quá trình nuôi là một trong những giải pháp để quản lý mật độ vi khuẩn và ngăn ngừa bệnh xảy ra, đặc biệt là thời điểm giao mùa vụ xuân hè.

4. Kết luận

Liều gây chết 50% của vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá rô phi phân lập ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam là khá cao, trung bình LD₅₀ là 4,6×10⁵ CFU/cá. Vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra các tổn thương bệnh lý vi thể đặc trưng là xuất huyết ở mang và hầu hết các nội quan, đặc biệt là gan và ruột. Vi khuẩn *A. hydrophila* có sức kháng cao với các yếu tố môi trường, khả năng tồn tại ở các điều kiện bất lợi về nhiệt độ (15-45°C), pH (5-10) và độ mặn (0-60‰). Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin và cơ sở khoa học để xây dựng các giải pháp phòng chống dịch bệnh do *A. hydrophila* trên cá rô phi nói riêng và các loài cá nước ngọt nói chung.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ từ Chương trình Aus4Skills cho các cựu lưu học sinh từ Chính phủ Úc. Đồng thời, tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các nhóm sinh viên, học viên cao học Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, các chủ trang trại nuôi cá ở Hải Dương, Bắc Ninh, Hòa Bình, Yên Bái và Hà Nam đã tạo điều kiện trong quá trình điều tra, thu mẫu phục vụ nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] W. Surachetpong, S.R.K. Roy, P. Nicholson (2020), "Tilapia Lake virus: The story so far", *Journal of Fish Diseases*, **43**(10), pp.1115-1132, DOI: 10.1111/jfd.13237.

[2] FAO (2018), *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018*, Meeting the Sustainable Development Goals.

[3] MARD (2019), *Decision to Approve the Plan of Tilapia Farming Development by 2020, Driven by 2030*.

[4] S.L. Abbott, W.K.W. Cheung, J.M. Janda (2003), "The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes", *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(6), pp.2348-2357, DOI: 10.1128/jcm.41.6.2348-2357.2003.

[5] A. Ali (1996), "*Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources", *Med. Microbiol. Lett.*, **5**, pp.156-165.

[6] P. Monfort, B. Baleux (1990), "Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond", *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(7), pp.1999-2006.

[7] R.B. Hidalgo, A. Alperi, N. Bujan, et al. (2010), "Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish", *Systematic and Applied Microbiology*, **33**(3), pp.149-153, DOI: 10.1016/j.syapm.2010.02.002.

[8] A. Laith, M. Najiah (2014), "*Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *clarias gariepinus* (Burchell)", *Journal of Aquaculture Research and Development*, **5**(2), DOI: 10.4172/2155-9546.1000215.

[9] S.A.A. Yahya, F. Ameen, K.S.A. Niaeem, et al. (2018), "Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*", *Saudi Journal of Biological Sciences*, **25**(1), pp.182-185, DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.10.019.

[10] P. Nicholson, N. Mon-on, P. Jaemwimol, et al. (2020), "Coinfection of tilapia lake virus and *Aeromonas hydrophila* synergistically increased mortality and worsened the disease severity in tilapia (*Oreochromis spp.*)", *Aquaculture*, **520**, pp.734-746, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734746.

[11] H.M.A. Latif, A.F. Khafaga (2020), "Natural co-infection of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* with *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus cichlidarum* experiencing high mortality during summer", *Aquaculture Research*, **51**(5), pp.1880-1892.

[12] N.A. Pauzi, N. Mohamad, M.A. Sayuti, et al. (2020), "Antibiotic susceptibility and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*) in Malaysia", *Veterinary World*, **13**(10), pp.2166-2171.

[13] A.E. Ashram (2002), "On *Aeromonas hydrophila* infection among cultured tilapias: A biological, histopathological and management study", *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, **6**(3), pp.181-202.

[14] J. Li, X.D. Ni, Y.J. Liu, et al. (2011), "Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish", *Journal of Applied Microbiology*, **110**(3), pp.823-830, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.04944.x.

[15] W.G. Weisburg, S.M. Bams, D.A. Pelletier, et al. (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**(2), pp.697-703, DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.

[16] M. Yanez, V. Catalan, D. Apraiz, et al. (2003), "Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**(3), pp.875-883, DOI: 10.1099/ijs.0.02443-0.

[17] C. Lee, J.C. Cho, S.H. Lee, et al. (2002), "Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm", *Appl. Microbiol.*, **93**, pp.976-985, DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01775.x.

[18] M.E. Nielsen, L. Hei, A.S. Schmidt, et al. (2001), "Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China?", *Dis. Aquat. Organ.*, **46**, pp.23-29.

[19] N. Saitou, M. Nei (1987), "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees", *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), pp.406-425.

[20] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, et al. (2018), "MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Molecular Biology and Evolution*, **35**(6), pp.1547-1549.

[21] L.J. Reed, H. Muench (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints", *American Journal of Epidemiology*, **27**(3), pp.493-497.

[22] T.D. Hoai, N.V. Son, N.T. Hoai, et al. (2014), "Histopathological characteristics of tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus* sp. farming in some Northern provinces of Vietnam", *Journal of Science and Development*, **12**(3), pp.360-371 (in Vietnamese).

[23] T.D. Hoai, H.M. Tung, N.V. Son, et al. (2015), "Research on histopathological characteristics of grass carp gills", *Journal of Science and Development*, **13**(1), pp.38-48.

[24] S. Palumbo, D.R. Morgan, R.L. Buchanan, et al. (1985), "Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*", *Journal of Food Science*, **50**(5), pp.1417-1421, DOI: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb10490.x.

[25] J.M. Janda, S.L. Abbott (2010), "The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection", *Clinical Microbiology Reviews*, **23**(1), pp.35-73.

[26] H.T. Dong, C. Techatanakitarnan, P. Jindakittikul, et al. (2017), "*Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)", *Journal of Fish Diseases*, **40**(10), pp.1395-1403, DOI: 10.1111/jfd.12617.

[27] V. Samayanpaulraj, V. Velu, R. Uthandakalaipandian (2019), "Determination of lethal dose of *Aeromonas hydrophila* Ah17 strain in snake head fish *Channa striata*", *Microbial Pathogenesis*, **127**, pp.7-11.

[28] K. Rahayu, D. Daruti, M. Stella (2018), "Study on characterisation, pathogenicity and histopathology of disease caused by *Aeromonas hydrophila* in gourami (*Osphronemus gouramy*)", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **137**(1), pp.1-9.

[29] H.T. Dong, V.V. Nguyen, H.D. Le, et al. (2015), "Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms", *Aquaculture*, **448**, pp.427-435, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.027.

[30] R.B. Hidalgo, M. Figueras (2013), "*Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease", *Journal of Fish Diseases*, **36**(4), pp.371-388.

[31] J.M. Pemberton, S.P. Kidd, R. Schmidt (1997), "Secreted enzymes of *Aeromonas*", *FEMS Microbiology Letters*, **152**(1), pp.1-10.

[32] S.P. Howard, J.T. Buckley (1985), "Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing", *Journal of Bacteriology*, **163**(1), pp.336-340.

[33] C. Xia, Z.H. Ma, M.H. Rahman, et al. (2004), "PCR cloning and identification of the β-haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China", *Aquaculture*, **229**(1-4), pp.45-53, DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00398-3.

[34] M. Nawaz, S.A. Khan, A.A. Khan, et al. (2010), "Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish", *Food Microbiology*, **27**(3), pp.327-331, DOI: 10.1016/j.fm.2009.11.007.

[35] I.Y. Nam, K.S. Joh (2007), "Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR", *Journal of Microbiology*, **45**(4), pp.297-304.

[36] P.T. Woo, D.W. Bruno (2011), *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, CABI.

Nghiên cứu chất lượng nước và bệnh trong nuôi tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) áp dụng công nghệ Nanobubble

Nguyễn Hữu Nghĩa*, Nguyễn Đức Bình, Phạm Thái Giang, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Nguyễn, Nguyễn Thị Hạnh, Phan Trọng Bình, Vũ Thị Kiều Loan, Phan Thị Vân

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

Ngày nhận bài 7/2/2022; ngày chuyển phân biện 10/2/2022; ngày nhận phân biện 11/3/2022; ngày chấp nhận đăng 17/3/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu đánh giá sự biến động các chỉ tiêu chất lượng nước, vi sinh, biến đổi mô mang và tăng trưởng của tôm trong mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) áp dụng công nghệ Nanobubble. Thí nghiệm được thực hiện trong 9 bể nuôi thương phẩm có thể tích 25-35 m³ với 3 nghiệm thức Nanobubble oxy (O₂-NB), Nanobubble ozone (O₃-NB) và đối chứng (ĐC) được lặp lại 3 lần. O₂-NB và O₃-NB được cung cấp cho các bể nuôi 1 giờ/ngày trong suốt thời gian nuôi từ khi thả giống đến khi thu hoạch. Tôm được thả với mật độ 300 con/m³, được áp dụng chế độ chăm sóc và quản lý môi trường như cho ăn, thay nước, sục khí, siphon và xử lý vi sinh giống nhau. Kết quả cho thấy, các chỉ tiêu pH, oxy hòa tan (DO), thế oxy hóa khử (ORP) chịu tác động của các nghiệm thức O₂-NB và O₃-NB. Mật độ *Vibrio* tổng số trong nước trung bình của nhóm O₂-NB cao gấp 1,41 lần so với nhóm ĐC và cao gấp 1,51 lần so với nhóm O₃-NB. Mô mang tôm bị biến đổi ở nhiều cấp độ khác nhau, tuy nhiên không làm giảm tỷ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức. Trọng lượng tôm lúc thu hoạch của các nghiệm thức ĐC, O₂-NB và O₃-NB lần lượt là 11,50±2,29, 11,48±2,66 và 13,87±1,65 g/con. Kết quả nghiên cứu cho thấy, O₃-NB có tác dụng làm tăng DO, giảm mật độ *Vibrio* tổng số trong nước và tăng tốc độ sinh trưởng của tôm so với ĐC và O₂-NB. Thời lượng chạy máy có thể giảm để hạn chế mức độ ảnh hưởng đến mang tôm.

Từ khóa: chất lượng nước, mô mang tôm, Nanobubble, tôm thẻ, *Vibrio* tổng số.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Công nghệ Nanobubble đã được áp dụng trong nuôi trồng thủy sản nhằm nâng cao hàm lượng DO trong nước. Nanobubble là những bóng khí nhỏ với đường kính nhỏ hơn 200 nm [1, 2] có thể tồn tại trong cột nước hàng tuần [3, 4]. Các nghiên cứu cho rằng, hiện tượng Nanobubble tồn tại lâu trong nước gắn liền với tính chất vật lý của những bóng khí nhỏ có giá trị zeta (điện thế bề mặt của bóng khí) cao, giữ cho các bóng khí nhỏ không nhập vào nhau để tạo thành bóng khí to hơn [5-7]. Mặc dù đã có những hiểu biết nhất định về tính chất lý hóa của Nanobubble nhưng các giải thích về tính chất tồn tại lâu trong nước của Nanobubble chưa thực sự rõ ràng [8].

Những nghiên cứu trước đây cho thấy, công nghệ Nanobubble ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản đã làm tăng tốc độ sinh trưởng của các loài nuôi như cá thơm (*Plecoglossus altivelis*), hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*), koi (*Cyprinus carpio*) và tráp đỏ (*Pagrus major*) [9-11]. O₂-NB cũng được cho là tối ưu quá trình hấp thụ DO của tôm thẻ chân trắng [12].

DO trong nước đóng vai trò quan trọng trong chuyển hóa nitrite và amoni thành nitrate, phân hủy nitrogen, carbon dioxide, hydrogen sulfide (H₂S) [13, 14]. Hàm lượng oxy cao làm tăng tốc độ trao đổi chất, tôm ăn nhiều hơn và phát triển nhanh hơn [9]. Khác với oxy, ozone có đặc tính oxy hóa mạnh hơn nhiều, ozone thu hút các phần

từ mang điện tích âm và tạo ra các gốc oxy tự do làm phá vỡ tính thấm thấu của màng tế bào vi khuẩn [15-17]. Trong nước, ozone được chuyển thành oxy và do đó nó vừa làm tăng lượng oxy vừa khử trùng nước [18]. Trong các hệ thống nuôi thủy sản tuần hoàn (RAS), ozone hóa ở mức độ vừa phải có thể thúc đẩy quá trình nitrate hóa sinh học. Điều này có thể được thực hiện qua trung gian của sự gia tăng oxy thúc đẩy các quần thể vi khuẩn chuyển hóa nitơ. Yếu tố hạn chế đối với việc sử dụng ozone trong nước mặn là độc tính đối với cá [19]. Mức độ hiệu quả xử lý nước nuôi bằng liệu pháp ozone phụ thuộc vào nồng độ, thời gian tiếp xúc, số lượng mầm bệnh và hàm lượng chất hữu cơ. Nồng độ ozone càng cao, nguy cơ gây ảnh hưởng đến với các loài nuôi càng cao [20].

Mặc dù oxy rất quan trọng đối với động vật thủy sản, nhưng khi hàm lượng DO vượt quá mức bão hòa thì có thể bị ảnh hưởng tiêu cực. C.E. Boyd và cs (1992) [21] cho rằng, hiện tượng tôm/cá chết tăng khi hàm lượng oxy vượt 20 mg/l và/hoặc tỷ lệ hòa tan vượt 300%. D.E. Weitkamp và cs (1980) [22] ghi nhận các bóng khí được quan sát thấy trong mang của cá sắp chết cũng như giữa các tia vây và dưới vây khi nồng độ DO trên 300%. Nhiều loài cá biển chết khi nồng độ DO trên 250% ở vịnh Galveston [22]. Cá chép đá khi còn nhỏ thích sống trong nước siêu bão hòa dưới 115%, tuy nhiên chúng thể hiện phản ứng tránh khi độ bão hòa khí trong nước vượt

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

Investigating water quality and disease in white leg shrimp (*Penaeus vannamei*) culture applying Nanobubble technology

Huu Nghia Nguyen*, Duc Binh Nguyen,
Thai Giang Pham, Thi Minh Nguyet Nguyen,
Thi Nguyen Nguyen, Thi Hanh Nguyen,
Trong Binh Phan, Thi Kieu Loan Vu, Thi Van Phan

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

Received 7 February 2022; revised 11 March 2022; accepted 17 March 2022

Abstract:

This study evaluates the variation of water quality, microbiology, gill morphology and shrimp growth of the intensive white leg shrimp (*Penaeus vannamei*) applying Nanobubble technology. The experiment consisted of 9 commercial concrete tanks with a volume of 25-35 m³ divided into 3 treatments of oxygen Nanobubble (O₂-NB), ozone Nanobubble (O₃-NB), and control (CTRL), 3 tanks for each treatment. O₂-NB and O₃-NB were provided to the tanks for 1 hour/day during the culture period from stocking to harvest. Shrimps were stocked at a density of 300 shrimp/m³ and applied with the same care and environmental management protocol such as feeding, water change, aeration, siphon, and microbiological treatment. The results showed that the pH, DO, and ORP parameters are affected by the O₂-NB and O₃-NB treatments. The average concentration of total *Vibrio* in the water of the O₂-NB group was 1.41 times higher than that of the control group, and 1.51 times higher than that of the O₃-NB group. The gill tissue of the shrimp was affected and changed to different degrees but did not reduce the survival rate of the shrimp in the experimental treatments. The harvest weight of shrimp of the control, O₂-NB, and O₃-NB treatments were 11.50±2.29, 11.48±2.66, and 13.87±1.65 g/shrimp, respectively. Research results exhibited that O₃-NB treatment increased DO, reduced total *Vibrio* in water and increased growth rate compare to the control and O₂-NB treatments. Reducing Nanobubble generator running time should be considered to minimise the impact on shrimp gills.

Keywords: Nanobubble, shrimp gill morphology, total *Vibrio*, water quality, white leg shrimp.

Classification number: 4.5

quá 135% [23]. Mặc dù vậy, J. Colt (1986) [24] cho rằng, siêu bão hòa của một khí đơn lẻ như oxy có thể không tạo ra chấn thương bóng khí. Chấn thương bóng khí gây ra tắc mạch máu, ngăn cản sự di chuyển của máu có oxy và có thể dẫn đến động vật thủy sản bị chết [25, 26].

Sử dụng công nghệ Nanobubble trong nuôi trồng thủy sản có thể làm tăng nguy cơ siêu bão hòa và bệnh bóng khí ở cá và giáp xác. Nghiên cứu gần đây cho rằng, không có thay đổi hình thái tế bào mang rõ rệt và không có tỷ lệ tử vong ở cá rô phi giống khi tiếp xúc với O₃-NB trong 10 phút sau 2 ngày xử lý [27]. Tuy nhiên, 2 hoặc 3 lần xử lý liên tiếp trong cùng một ngày đã dẫn đến một số tổn thương đối với các sợi mang [27]. Những tổn thương này cũng có thể là do tác động của khí ozone chứ không phải do nồng độ oxy cao trong các bể chứa, nhưng các tác giả chưa tách biệt rõ giữa 2 nguyên nhân tiềm ẩn gây tổn thương. Theo chúng tôi, ảnh hưởng của các mức DO khác nhau đến hình thái mang tôm vẫn chưa được hiểu rõ và cần được làm rõ [27-30].

Nghiên cứu này đánh giá sự biến động của các chỉ tiêu môi trường nước, mật độ vi khuẩn trong nước, thành phần vi khuẩn trong tôm, biến đổi mô mang và sinh trưởng tôm tại mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng áp dụng O₂-NB và O₃-NB.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Cơ sở vật chất, thiết bị thực hiện thí nghiệm

Thí nghiệm được triển khai tại cơ sở nuôi tôm thương phẩm của ông Hoàng Văn Tin, xã Quỳnh Bảng, huyện Quỳnh Lưu, tỉnh Nghệ An từ tháng 9 đến tháng 12/2020. Chín bể nuôi tôm thương phẩm với thể tích 25-35 m³ đã được lựa chọn để thực hiện nghiên cứu. Thí nghiệm sử dụng máy tạo Nanobubble model aQua+ 190M. Máy có công suất 2,5 hp (1,9 KW) với lượng nước bơm ra là 4.000 l/giờ và tạo ra Nanobubble với kích thước trung bình 168,9±73,8 nm, mật độ 1,04x10⁹±2,6x10⁸ hạt/ml [31]. Máy sử dụng khí đầu vào là oxy để tạo O₂-NB và ozone để tạo O₃-NB. Để tạo được oxy cung cấp đầu vào cho máy Nanobubble, chúng tôi sử dụng máy tạo oxy model Yuwell 7F-10 (Yuwell, Trung Quốc) công suất 5 lít/phút. Máy tạo oxy cũng được sử dụng để cung cấp oxy đầu vào cho máy tạo ozone. Để tạo ozone, chúng tôi sử dụng máy tạo ozone model OMZ-20S (OzoneMaxx, Việt Nam) công suất 20 g ozone/giờ.

2.2. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được thiết kế với 3 nghiệm thức: O₂-NB, O₃-NB và ĐC, mỗi nghiệm thức bao gồm 3 bể, trong đó các bể O₂-NB và O₃-NB có thể tích 25 m³, các bể ĐC có thể tích 35 m³. Tôm được thả với mật độ trung bình 300 con/m³, cỡ tôm giống thả giai đoạn P30 với trọng lượng trung bình 0,69±0,23 mg/con. Thời gian chạy máy cung cấp O₂-NB và O₃-NB cho các bể thuộc nghiệm thức O₂-NB và O₃-NB được thực hiện 1 tiếng/ngày/bể. Ngoài ra, tất cả các bể đều được sục khí 24/24. Độ mặn trung bình của các bể trong thời gian nuôi duy trì ở mức 20‰. Chế độ chăm sóc, cho ăn, sục khí, siphon, bón vi sinh, thay nước được thực hiện giống nhau giữa các nghiệm thức.

2.3. Đánh giá chỉ tiêu môi trường nước

Những chỉ tiêu chất lượng nước được theo dõi bao gồm: nhiệt độ, pH, DO, thế ORP, độ kiềm, nitrite NO_2 , H_2S , NH_3 , nhu cầu oxy hóa học (COD), nhu cầu oxy sinh hóa (BOD_5), ozone. Trong đó, 4 thông số đầu được đo hàng ngày trước và sau khi chạy máy. Những chỉ tiêu còn lại được đo hàng tuần. Các chỉ tiêu nhiệt độ, oxy, pH, ORP được đo bằng máy Pro1020 Dissolved Oxygen và pH/ORP Instrument (YSI, Mỹ). Các chỉ tiêu độ kiềm, NO_2 , H_2S , NH_3 , COD, BOD_5 , ozone được thu mẫu và phân tích trong phòng thí nghiệm của Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản miền Bắc, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1 theo các phương pháp tương ứng SMEWW 2302B:2011, SMEWW 4500- NO_2 B:2011, SMEWW 4500- S_2 -D:2011, SMEWW 4500- NH_3 F:2011, SMEWW 5220-COD, SMEWW 5210-BOD, SMEWW 4500- O_3 [32].

2.4. Định lượng Vibrio tổng số trong nước

Vibrio tổng số trong mẫu nước của các bể thí nghiệm được định lượng theo N.B. Buller (2004) [33].

2.5. Xác định thành phần vi khuẩn trong tôm

Phân lập, định danh vi khuẩn trong tôm được xác định bằng phương pháp nuôi cấy trên đĩa thạch và test Kit API-20E.

2.6. Đánh giá biến đổi mô

Các mẫu mang tôm được chuẩn bị theo phương pháp của D.V. Lightner (1996) [34]. Mang được phân loại theo 5 mức độ biến đổi chính: 1) Tế bào tơ mang bình thường; 2) Tế bào tơ mang kết dính; 3) Nhân tế bào tơ mang kết đặc lại; 4) Cung mang teo nhỏ; và 5) Cung mang hoại tử. Mỗi mức độ biến đổi chính lại được phân loại thành 3 mức độ phụ: nhiều, trung bình, ít. Do mỗi mẫu tôm có thể xuất hiện cùng lúc nhiều dấu hiệu biến đổi, trong mỗi dấu hiệu biến đổi lại có các mức độ khác nhau, vì thế để đánh giá được mức độ biến đổi của từng mẫu chúng tôi nhân số điểm mức độ biến đổi chính (1-5) với mức độ biến đổi phụ (1-3) sau đó cộng để có tổng điểm của từng mẫu tôm theo công thức:

$$\text{Tổng điểm} = \sum xy$$

trong đó x là mức độ biến đổi chính có giá trị 1-5; y là mức độ biến đổi phụ có giá trị 1-3.

Phân tích hồi quy sẽ được áp dụng đối với tổng điểm của từng mẫu tôm để so sánh sự khác biệt về mức độ biến đổi giữa các nghiệm thức. Ngoài ra, dựa vào tổng điểm chúng tôi chia thành 5 mức độ biến đổi: bình thường, nhẹ, trung bình, nặng, rất nặng với số mẫu xấp xỉ như nhau.

2.7. Tăng trưởng

Tôm giống được lấy mẫu và cân từng con bằng cân phân tích (PA214, Ohaus, Mỹ) sau khi loại bỏ nước trên thân tôm bằng giấy thấm. Tôm thu hoạch cũng được lấy mẫu và cân như mô tả ở trên. Trọng lượng trung bình của tôm trong mỗi bể khi kết thúc nghiên cứu được so sánh giữa các nghiệm thức.

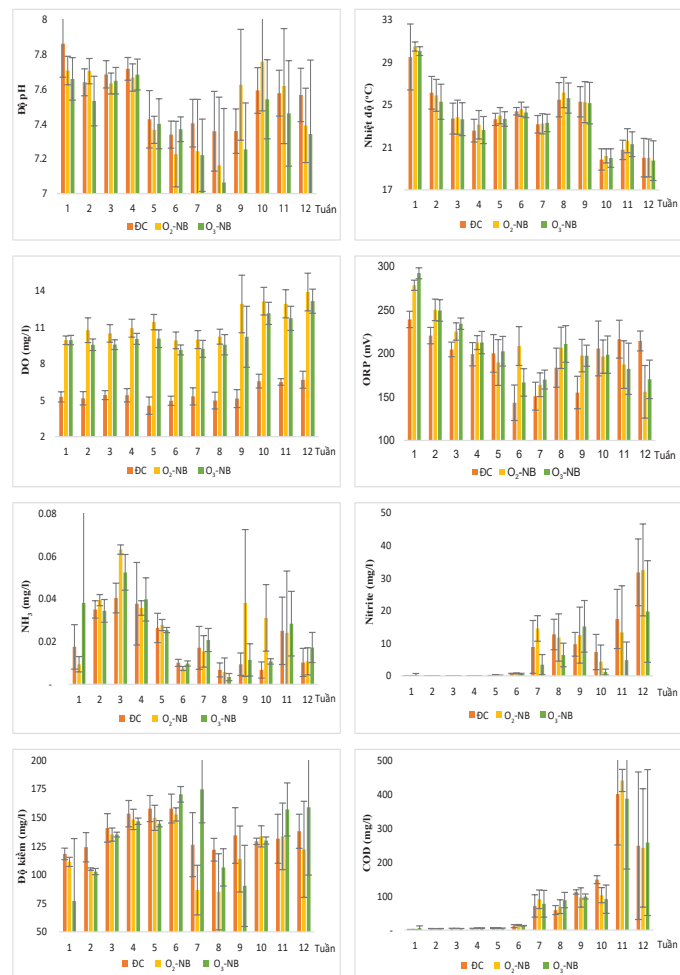
2.8. ử lý số liệu và phân tích thống kê

Số liệu về chỉ tiêu môi trường nước, mật độ vi khuẩn trong nước, thành phần vi khuẩn trong tôm, mức độ biến đổi mô, tăng trưởng và năng suất được phân tích và so sánh giữa các nhóm bằng mô hình hồi quy. Biểu diễn trực quan và phân tích mối tương quan giữa các biến bằng phân tích thành phần chính (PCA). Dữ liệu được xử lý, phân tích bằng phần mềm Excel (Microsoft Office 365) và XLSTAT (Addinsoft, 2020). Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa.

3. Kết quả

3.1. Chỉ tiêu môi trường nước

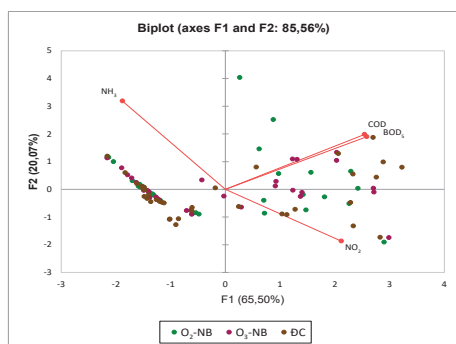
Nhiệt độ trung bình của nhóm ĐC, O_2 -NB, O_3 -NB lần lượt là $24,12 \pm 0,19$, $23,83 \pm 0,19$ và $23,80 \pm 0,19^\circ\text{C}$. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nhiệt độ giữa các nhóm ($p=0,41$). Độ pH của các nghiệm thức nằm trong khoảng 7,05-7,86 và cùng có xu hướng giảm từ tuần thứ 5 đến thứ 8, sau đó cùng tăng lên từ tuần thứ 9. DO trung bình trước khi chạy máy của nhóm ĐC, O_2 -NB, O_3 -NB lần lượt là $5,46 \pm 0,85$, $5,67 \pm 0,84$ và $5,27 \pm 0,76$ mg/l. Có sự khác biệt về giá trị DO giữa nghiệm thức ĐC với O_3 -NB ($p=0,01$), ĐC với O_2 -NB ($p=0,005$), O_2 -NB với O_3 -NB ($p<0,0001$). Giá trị DO của



Hình 1. Biến động các chỉ tiêu môi trường nước pH, nhiệt độ, DO, ORP, NH_3 , NO_2 , độ kiềm và COD của các nghiệm thức ĐC, O_2 -NB và O_3 -NB.

nhóm O₂-NB và O₃-NB sau khi chạy máy lần lượt là 11,29±1,71 và 10,27±1,50 mg/l. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị DO giữa nhóm ĐC với nhóm O₂-NB và O₃-NB sau khi chạy máy (p<0,001). ORP của nhóm ĐC và O₂-NB, O₃-NB trước khi chạy máy lần lượt là 193,26±34,67, 180,48±36,00 và 184,45±33,56 mV. Có sự khác biệt về giá trị ORP của nhóm ĐC với O₂-NB (p<0,0001) và ĐC với O₃-NB (p=0,006). Sau khi chạy máy, giá trị ORP của nhóm O₂-NB và O₃-NB lần lượt là 203,29±38,65 và 207,77±38,73 mV. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa giá trị ORP của nhóm ĐC với O₂-NB (p=0,004) và giữa ĐC với O₃-NB (p<0,001). Giá trị ORP của các nhóm có xu hướng biến động giống nhau, cao nhất ở thời điểm mới thả tôm, sau đó giảm dần, thấp nhất ở tuần thứ 6 và 7. Độ kiềm trung bình của nhóm ĐC, O₂-NB, O₃-NB lần lượt là 134,83±19,96, 124,77±32,76 và 139,52±39,00 mg/l. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về độ kiềm giữa các nhóm (p=0,136). Độ kiềm có xu hướng tăng dần từ tuần thứ 1 đến thứ 6, giảm nhiều ở tuần thứ 8 và 9 (O₂-NB và O₃-NB), sau đó tăng dần ở các tuần cuối (hình 1).

NH₃ trung bình của nhóm ĐC, O₂-NB, O₃-NB lần lượt là 0,019±0,015, 0,026±0,022, 0,023±0,015 mg/l. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị NH₃ giữa các nhóm (p=0,214). Giá trị NH₃ ở các nhóm có xu hướng biến động giống nhau, tăng cao ở tuần thứ 3, giảm xuống thấp nhất ở tuần thứ 8, sau đó tăng nhẹ ở các tuần tiếp theo. NO₂ trung bình của nhóm ĐC, O₂-NB, O₃-NB lần lượt là 8,59±12,23, 9,35±13,17 và 5,94±10,28 mg/l. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị NO₂ giữa các nhóm (p=0,457). Giá trị NO₂ biến động lớn, thấp ở 6 tuần đầu, sau đó tăng nhanh từ tuần thứ 7 và cao nhất ở tuần 12 (32,48±14,09 mg/l ở nghiệm thức O₂-NB). COD trung bình của nhóm ĐC, O₂-NB, O₃-NB lần lượt là 94,25±151,10, 110,96±149,93 và 107,39±161,89 mg/l. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị COD giữa các nhóm (p=0,883). Giá trị COD biến động lớn, tăng mạnh từ tuần thứ 7 và cao nhất ở tuần 11 (408,89±72,70 mg/l) (hình 1). Kết quả phân tích PCA cho thấy có mối tương quan cao giữa COD và BOD₅ (r=0,924), COD và NO₂ (r=0,462), COD và NH₃ (r=-0,402), NO₂ và NH₃ (r=-0,483), NO₂ và BOD₅ (r=0,523) (hình 2).

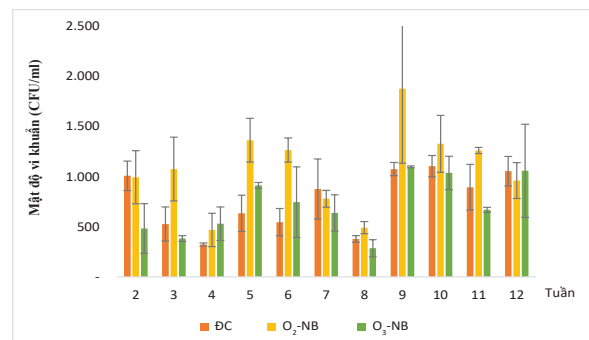


Hình 2. Thành phần chính 1 và 2 các biến NH₃, NO₂, COD và BOD₅ của các nghiệm thức ĐC, O₂-NB và O₃-NB.

Nhu cầu BOD₅ trung bình của nhóm ĐC, O₂-NB, O₃-NB lần lượt là 18,19±20,90, 19,65±17,37, 19,58±17,90 mg/l. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị BOD₅ giữa các nhóm (p=0,940). H₂S trung bình của nhóm ĐC, O₂-NB, O₃-NB lần lượt là 0,007±0,007, 0,007±0,006 và 0,005±0,004 mg/l. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị H₂S giữa các nhóm (p=0,175). Ozone trung bình sau khi chạy máy của nhóm O₃-NB là 0,13±0,08 mg/l (không thể hiện trên đồ thị).

3.2. Mật độ *Vibrio* tổng số trong nước

Mật độ vi khuẩn *Vibrio* tổng số trung bình của nhóm ĐC là 765±139, O₂-NB 1,077±225 và O₃-NB là 712±160 CFU/ml. Mật độ *Vibrio* tổng số trung bình của nhóm O₂-NB cao gấp 1,41 lần so với nhóm ĐC (p=0,035) và 1,51 lần so với nhóm O₃-NB (p=0,032). Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm ĐC và O₃-NB (hình 3).



Hình 3. Mật độ *Vibrio* tổng số trong nước của các nghiệm thức ĐC, O₂-NB và O₃-NB.

3.3. Thành phần vi khuẩn trong tôm

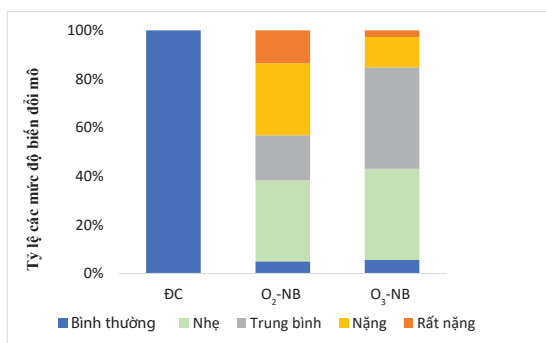
Nghiệm thức ĐC ghi nhận sự xuất hiện của 4 loài vi khuẩn trong tôm với tỷ lệ nhiễm là 11/45 mẫu. Nghiệm thức O₂-NB phát hiện 6 loài vi khuẩn với tỷ lệ nhiễm là 16/45 mẫu. Nghiệm thức O₃-NB phát hiện 7 loài vi khuẩn với tỷ lệ nhiễm là 12/45 mẫu. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ nhiễm vi khuẩn trong tôm giữa các nghiệm thức (p=0,64) (bảng 1).

Bảng 1. Thành phần và tỷ lệ nhiễm vi khuẩn trong tôm của các nghiệm thức ĐC, O₂-NB và O₃-NB trong 3 đợt thu mẫu tháng 10, 11 và 12/2020.

Vi khuẩn	ĐC			O ₂ -NB			O ₃ -NB		
	T10	T11	T12	T10	T11	T12	T10	T11	T12
<i>V. alginolyticus</i>	1	2		4		1	1		
<i>V. diabolis</i>									1
<i>V. fluvialis</i>	1	2		1	1		2		
<i>V. mimicus</i>				2		1		2	
<i>V. mytili</i>	3	1		3			2	1	
<i>V. splendidus</i>	1						2		
<i>V. parahaemolyticus</i>				2					
<i>V. vulnificus</i>				1			1		
Tổng	11/45 mẫu			16/45 mẫu			12/45 mẫu		

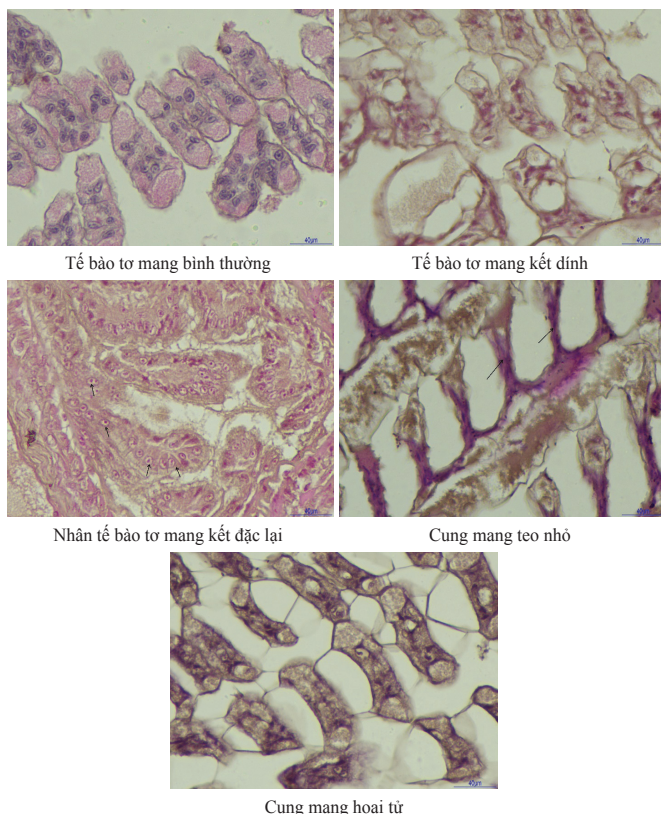
3.4. Biến đổi mô mang tôm

Không có biến đổi mô mang tôm ở nghiệm thức ĐC. Điểm số biến đổi mô mang tôm ở mức độ “rất nặng” được ghi nhận 14% ở nghiệm thức O₂-NB nhưng chỉ ghi nhận 3% ở O₃-NB. Mức độ biến đổi “nặng” được ghi nhận 30% ở nghiệm thức O₂-NB và 13% ở O₃-NB (hình 4). Tổng số điểm dựa trên sự xuất hiện tương đối về mức độ biến đổi mô khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa ĐC với O₂-NB và O₃-NB và giữa O₂-NB với O₃-NB ($p < 0,0001$).



Hình 4. Tỷ lệ các mức độ biến đổi mô của các nghiệm thức ĐC, O₂-NB và O₃-NB.

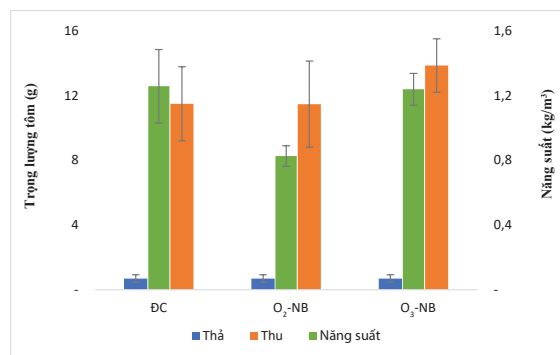
Các mức độ biến đổi chính mô mang tôm gồm: 1) Tế bào tơ mang bình thường, 2) Tế bào tơ mang kết dính, 3) Nhân tế bào tơ mang kết đặc lại, 4) Cung mang teo nhỏ, và 5) Cung mang hoại tử (hình 5).



Hình 5. Các mức độ biến đổi mang tôm.

3.5. Tăng trưởng

Trọng lượng trung bình của tôm lúc thả ở cả 3 nghiệm thức là $0,69 \pm 0,23$ g/con. Trọng lượng trung bình của tôm lúc thu hoạch ở nghiệm thức ĐC, O₂-NB, O₃-NB lần lượt là $11,50 \pm 2,29$, $11,48 \pm 2,66$ và $13,87 \pm 1,65$ g/con. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về trọng lượng tôm thu hoạch giữa nghiệm thức ĐC, O₂-NB đối với nghiệm thức O₃-NB ($p = 0,008$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức ĐC và O₂-NB ($p = 0,983$) (hình 6).



Hình 6. Trọng lượng lúc thả giống, thu hoạch và năng suất của các nghiệm thức ĐC, O₂-NB và O₃-NB.

4. Bàn luận

4.1. Chỉ tiêu môi trường nước

Độ pH giảm thấp nhất ở giai đoạn từ tuần thứ 5 đến thứ 8 có thể do ảnh hưởng của sự phân giải chất hữu cơ tích tụ trong nước. Nhiệt độ ở các bể O₂-NB và O₃-NB thấp hơn so với ĐC có thể do thể tích nước của bể. Các bể ĐC có thể tích lớn hơn và giữ nhiệt tốt hơn cho mùa đông. Nhiệt độ cao hơn làm tăng kích thước bóng khí [35, 36], do đó làm giảm thời gian tồn tại của chúng trong nước [37, 38]. Giá trị DO sau khi chạy máy tăng cao trong các nghiệm thức O₂-NB và O₃-NB, kết quả tương đồng với công bố của L. Wang và cs (2018) [39], có ảnh hưởng đến hình thái mang tôm như đã mô tả và bàn luận ở trên. Điều quan trọng đối với các trang trại nuôi thương phẩm là phải giữ cho nồng độ DO ở mức thấp hơn ngưỡng bão hòa. ORP tăng khoảng 20 mV (lên trên 200 mV) sau khi chạy máy đối với các nghiệm thức O₂-NB và O₃-NB. Giá trị ORP trong khoảng 150-250 mV có thể thúc đẩy quá trình nitrate hóa, kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn [40, 41], trên 350 mV bắt đầu tiêu diệt vi khuẩn [28, 42]. Chúng ta cần lưu ý, hàm lượng ozone tăng cao hơn khi sục khí ozone trực tiếp so với phương pháp Nanobubble, hàm lượng ozone cao có thể có tác động tiêu cực đến các loài nuôi và công nhân vận hành trang trại. Lợi thế của Nanobubble là làm giảm tác động của ozone. Trong nước, các giá trị của ozone và ORP tỷ lệ thuận với nhau [41, 43] nên chúng tôi có thể xác nhận độ chính xác của phép đo bằng cách so sánh các giá trị của chúng tại cùng một thời điểm đã chọn. Giá trị ORP giảm mạnh ở các tuần thứ 5 và 6 phần nhiều do hàm lượng hữu cơ trong

bề tăng cao nhất. Các giá trị NH_3 , NO_2 , COD, BOD_5 đều thể hiện mức độ ô nhiễm hữu cơ trong nước và chúng có mối tương quan chặt chẽ. Mặc dù không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị của các chỉ tiêu này giữa các nghiệm thức nhưng chúng tôi đánh giá việc xử lý đã có những tác động nhất định đối với tôm nuôi và thành phần vi sinh vật trong nước. Các thông số khác như độ kiềm, H_2S không bị ảnh hưởng nhiều bởi O_2 -NB và O_3 -NB.

4.2. Mật độ *Vibrio* tổng số trong nước

Với thời lượng chạy máy 1 giờ/ngày, có thể O_2 -NB đã tạo ra môi trường thuận lợi hơn cho vi khuẩn *Vibrio* phát triển so với O_3 -NB và ĐC, vì tính oxy hóa của oxy chưa đủ cao để diệt vi khuẩn như ozone. Chúng tôi cũng đã gặp hiện tượng tương tự ở các nghiệm cứu trong phòng thí nghiệm. *Vibrio* là một chi của vi khuẩn gram âm, bệnh vi khuẩn trên tôm chủ yếu là từ nhóm *Vibrio*. Trong môi trường nước ao, các loài vi khuẩn *Vibrio* tồn tại tự do trong nước hoặc trên các hạt lơ lửng. Có ít nhất 14 loài *Vibrio* gây bệnh cho tôm [44]. Theo dõi các thành phần và mật độ vi khuẩn có thể có khả năng ngăn chặn sự bùng phát bệnh do *Vibrio* [45]. Các thử nghiệm gây nhiễm cho thấy, *V. parahaemolyticus* có khả năng gây bệnh cao đối với tôm thẻ chân trắng *P. vannamei* [46]. *Vibrio* rất khó diệt vì chúng thích nghi tốt với các điều kiện môi trường khác nhau và có thể chuyển sang trạng thái không hoạt động khi gặp các điều kiện bất lợi. Những phương pháp để ngăn ngừa và kiểm soát *Vibrio* thân thiện hơn trong nuôi tôm bao gồm an toàn sinh học, thuốc kích hoạt miễn dịch, men vi sinh và chất diệt vi sinh vật. Theo A. Ganesh (2010) [47], mật độ *Vibrio* trong nuôi trồng thủy sản nên ở mức thấp hơn 10^3 CFU/ml.

4.3. Thành phần vi khuẩn trong tôm

Kết quả phân tích số liệu cho thấy, nghiệm thức O_2 -NB có tỷ lệ tôm nhiễm vi khuẩn cao nhất. Tuy nhiên, do sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm không có ý nghĩa thống kê vì thế chúng tôi cho rằng cần có nghiên cứu sâu và cụ thể hơn về vấn đề này.

4.4. Biến đổi mô mang tôm

Kết quả nghiên cứu cho thấy, áp dụng Nanobubble liên tục hàng ngày có thể dẫn đến biến đổi mang. Điều này phù hợp với nghiên cứu gần đây của C. Jhunkeaw và cs (2020) [27], đó là không có hiện tượng cá chết và biến đổi hình thái mô ở cá rô phi khi xử lý O_3 -NB sau 48 giờ. Tuy nhiên, nếu tiếp tục xử lý liên tục một số ngày bằng O_3 -NB thì có thể dẫn đến tổn thương mang nhẹ. Mức oxy cao trong giai đoạn chạy máy cũng có thể là nguyên nhân ảnh hưởng xấu đến cấu trúc mang của tôm [21, 22] và cá [48]. Chất lượng nước kém cũng có thể ảnh hưởng đến cấu trúc mang, vì các hợp chất nitơ có thể dẫn đến phù nề biểu mô, thâm nhiễm và hoại tử ở tôm [49]. Mặc dù vậy, tôm ở các bể vẫn sinh trưởng và phát triển (kém hơn ở nghiệm thức O_2 -NB và tốt hơn ở O_3 -NB so với ĐC). Vì thế chúng tôi cho rằng, O_3 -NB mặc dù có gây biến đổi mang tôm, nhưng ít hơn O_2 -NB và vẫn có tác dụng tốt cho tôm phát triển. Theo chúng tôi, thời gian chạy máy nên giảm xuống để giảm tác động đến mang tôm.

4.5. Tăng trưởng

Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, việc sử dụng O_3 -NB có tác động tích cực đến tăng trưởng. O_3 -NB không chỉ cung cấp oxy cho tôm, tăng cường trao đổi chất, thúc đẩy tăng trưởng [9], chuyển hóa NH_3 , NO_2 [13], mà còn khống chế mật độ vi khuẩn *Vibrio* trong nước. O_3 -NB thể hiện tính hiệu quả kinh tế cao hơn thông qua cỡ tôm thu hoạch lớn hơn và năng suất tương đương. Nghiệm thức này có thể áp dụng vào các trang trại thương mại. Trong trường hợp chưa có thiết bị, muốn sục trực tiếp khí ozone thì phải áp dụng liều thấp và thận trọng. O_2 -NB với liều trình 1 giờ/ngày/bể cho hiệu quả thấp, tạo môi trường thuận lợi cho vi khuẩn *Vibrio* phát triển, vì thế cần được nghiên cứu thêm.

5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, O_2 -NB và O_3 -NB đã cung cấp lượng DO vượt trội so với sục khí bình thường. Tuy nhiên, giá trị DO không duy trì cao trong cả ngày, tại thời điểm trước khi chạy máy, giá trị DO của các bể quay về mức trên 5 mg/l. Do nuôi thâm canh mật độ cao nên từ tuần thứ 5 trở đi, nước ở các bể bắt đầu ô nhiễm hữu cơ, hàm lượng NO_2 , COD, BOD_5 tăng cao. Các nghiệm thức O_2 -NB và O_3 -NB chưa thể hiện rõ tác dụng làm giảm ô nhiễm hữu cơ trong nước. Mật độ *Vibrio* tổng số trung bình của nhóm O_2 -NB cao gấp 1,41 lần so với nhóm ĐC và cao gấp 1,51 lần so với O_3 -NB. Áp dụng Nanobubble liên tục hàng ngày dẫn đến biến đổi mang ở nhiều cấp độ, mức độ biến đổi ở nghiệm thức O_2 -NB nhiều hơn O_3 -NB. Trọng lượng trung bình tôm lúc thu hoạch của các nghiệm thức ĐC, O_2 -NB, O_3 -NB lần lượt là $11,50 \pm 2,29$, $11,48 \pm 2,66$ và $13,87 \pm 1,65$ g/con. O_3 -NB đã cho thấy khả năng tăng cường hàm lượng DO trong nước, khống chế mật độ *Vibrio* tổng số và tăng cường sinh trưởng cho tôm. Thời gian chạy máy có thể giảm để hạn chế các tác động đến mang tôm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Agarwal, W.J. Ng, Y. Liu (2011), "Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment", *Chemosphere*, **84**, pp.1175-1180. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.05.054.
- [2] M. Chaplin (2019), "Nanobubbles (ultrafine bubbles)", <http://www1.lsbu.ac.uk/water/nanobubble.html>, accessed 2 March 2020.
- [3] R. Parmar (2013), "Microbubble generation and microbubble-aided transport process intensification - A state-of-the-art report", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **64**, pp.79-97, DOI: 10.1016/j.cep.2012.12.002.
- [4] A. Azevedo, R. Etchepare, S. Calgaroto, et al. (2016), "Aqueous dispersions of Nanobubbles: generation, properties and features", *Minerals Engineering*, **94**, pp.29-37, DOI: 10.1016/j.mineng.2016.05.001.
- [5] J. Weijs, D. Lohse (2013), "Why surface Nanobubbles live for hours", *Physical Review Letters*, **110**, DOI: 10.1103/PhysRevLett.110.054501.
- [6] C. Sjogreen, D.A.L. Tellez (2018), "Experimental study of nanobubbles in salt solutions", *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales*, **42**, DOI: 10.18257/raccefy.543.
- [7] B. Kirby (2010), *Micro - And Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*.
- [8] A.J. Atkinson, O.G. Apul, O. Schneider, et al. (2019), "Nanobubble technologies offer opportunities to improve water treatment", *Accounts of Chemical Research*, **52**(5), pp.1196-1205, DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00606.

- [9] K. Ebina, K. Shi, M. Hirao, et al. (2013), "Oxygen and air Nanobubble water solution promote the growth of plants, fishes, and mice", *PLOS ONE*, **8**(6), DOI: 10.1371/5.2022 journal.pone.0065339.
- [10] H.K. Saputra, K. Nirmala, E. Supriyono, et al. (2018), "Micro/nano bubble technology: Characteristics and implications biology performance of Koi Cyprinus carpio in recirculation aquaculture system (RAS)", *Omni-Akuatika*, **14**(2), pp.29-36.
- [11] H. Stander (2018), "Nanobubble technology in aquaculture production systems", <https://agriabout.com/nanobubble-technology-in-aquacultureproduction-systems>, accessed 21 January 2019.
- [12] D.P. Galang, A.K. Ashari, L. Sulmawati, et al. (2019), "The oxygen content and dissolved oxygen consumption level of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the nanobubble cultivation system", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **236**, DOI: 10.1088/1755-1315/236/1/012014.
- [13] J.A. Hargreaves (1998), "Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds 1", *Aquaculture*, **166**, pp.181-212, DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00298-1.
- [14] <http://www.leilangkj.com/en/show.asp?id=73>, accessed 2 August 2019.
- [15] D.A. Gurung, O. Dahl, K. Jansson (2016), "The fundamental phenomena of Nanobubbles and their behavior in wastewater treatment technologies", *Geosystem Engineering*, **19**, pp.1-10, DOI: 10.1080/12269328.2016.1153987.
- [16] T. Temesgen, T.T. Bui, M. Han, et al. (2017), "Micro and Nanobubble technologies as a new horizon for water treatment techniques: a review", *Advances in Colloid and Interface Science*, **246**, pp.40-51, DOI: 10.1016/j.cis.2017.06.011.
- [17] K. Ikehata, Y. Li (2018), "Ozone-based processes", *Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment*, Academic Press, pp.115-134.
- [18] Nanobubble Technoligise (2018), <https://www.nanobubble.com.au/applications/aquaculture/>, accessed 15 June 2019.
- [19] J.P. Schroeder, S.F. Klatt, M. Schlachter, et al. (2015), "Impact of ozonation and residual ozoneproduced oxidants on the nitrification performance of moving-bed biofilters from marine recirculating aquaculture systems", *Aquacultural Engineering*, **65**, pp.27-36, DOI: 10.1016/j.aquaeng.2014.10.008.
- [20] A.A. Gonçalves, G. Gagnon (2011), "Ozone application in recirculating aquaculture system: an overview", *Ozone: Science & Engineering*, **33**, pp.345- 367, DOI: 10.1080/01919512.2011.604595.
- [21] C.E. Boyd, A.W. Fast (1992), *Chapter 23 - Pond Monitoring and Management (Marine Shrimp Culture)*, Elsevier.
- [22] D.E. Weitkamp, M. Katz (1980), "A review of dissolved gas supersaturation literature", *Transactions of The American Fisheries Society*, **109**(6), pp.659-702, DOI: 10.1577/1548-8659(1980)109<659:ARODGS>2.0.CO;2.
- [23] X. Huang, K. Li, J. Du, et al. (2010), "Effects of gas supersaturation on lethality and avoidance responses in juvenile rock carp (*Procypris rabaudi* Tchang)", *Journal of Zhejiang University Science B*, **11**, pp.806-811.
- [24] J. Colt (1986), "Gas supersaturation - Impact on the design and operation of aquatic systems", *Aquacultural Engineering*, **5**(1), pp.49-85.
- [25] D.S. Lutz (1993), *Gas Supersaturation and Gas Bubble Trauma in Fish Downstream from a Moderately-Sized Reservoir (Civil and Construction Engineering Interdepartmental Major: Water Resources)*, Iowa State University.
- [26] British Columbia (2020), *Water Quality Guidelines for Dissolved Gas Supersaturation*, <https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/environment/air-land-water/water/waterquality/water-quality-guidelines/approved-wqgs/totalgas-tech.pdf>, accessed 15 February 2021.
- [27] C. Jhunkeaw, N. Khongcharoen, N. Rungrueng, et al. (2020), "Ozone Nanobubble treatment in freshwater effectively reduced pathogenic fish bacteria and is safe for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Aquaculture*, **534**, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.736286.
- [28] N.H. Nghia, P.T. Van, P.T. Giang, et al. (2021), "Control of *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strain) and improvement of water quality using nanobubble technology", *Aquaculture Research*, **52**, pp.2727-2739, DOI: 10.1111/are.15124.
- [29] K. Imaizumi, S. Tinwongger, H. Kondo (2018), "Disinfection of an EMS/AHPND strain of *Vibrio parahaemolyticus* using ozone nanobubbles", *Journal of Fish Diseases*, **41**(4), pp.725-727, DOI: 10.1111/jfd.12783.
- [30] M. Seki, T. Ishikawa, H. Terada, et al. (2017), "Microbicidal effects of stored aqueous ozone solution generated by nano-bubble technology", *In Vivo (Athens, Greece)*, **31**(4), pp.579-583.
- [31] AquaPro Solutions (2019), *aQua+0.75M Technical Specification*.
- [32] R. Baird, L. Bridgewater (2017), *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association.
- [33] N.B. Buller (2004), *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*, CABI.
- [34] D.V. Lightner (1996), *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*, World Aquaculture Society.
- [35] J. Meegoda, S.A. Hewage (2018), "Stability of Nanobubbles", *Environmental Engineering Science*, **35**, DOI: 10.1089/ees.2018.0203.
- [36] M. Thompson, R. Doerner, N. Ohno, et al. (2017), "Measuring temperature effects on nanobubble growth in tungsten with grazing incidence small angle X-ray scattering", *Nuclear Materials and Energy*, **12**, pp.1294-1297, DOI: 10.1016/j.nme.2016.11.025.
- [37] A. Serizawa (2017), *Fundamentals and Applications of Micro/Nano Bubbles*, International Symposium on Application of High voltage, Plasmas & Micro/Nano Bubbles to Agriculture and Aquaculture (ISHPMNB 2017).
- [38] B.M. Smirnov, R.S. Berry (2015), "Growth of bubbles in liquid", *Chemistry Central Journal*, **9**, DOI: 10.1186/s13065-015-0127-y.
- [39] L. Wang, X. Miao, J. Ali, et al. (2018), "Quantification of oxygen nanobubbles in particulate matters and potential applications in remediation of anaerobic environment", *ACS Omega*, **3**(9), pp.10624-10630, DOI: 10.1021/acsomega.8b00784.
- [40] ysi (2018), www.ysi.com, accessed 16 November 2018.
- [41] Cefas (2010), *Ozone - Potential Application in Depuration Systems in The UK*.
- [42] Anses (2012), *Characteristics and Sources of Vibrio Parahaemolyticus Main Microbiological Characteristics*, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety.
- [43] N.H. Nghia, L.C. Cuong, T.V. Dieu, et al. (2018), "Ozonation process and water disinfection", *Vietnam Journal of Chemistry*, **56**(6), pp.717-720, DOI: 10.1002/vjch.201800076.
- [44] <file:///C:/Users/Admin/Documents/Zalo%20Received%20Files/VibriosisinAquaculture.pdf>.
- [45] Y.R. Alfiansah, C. Hassenrück, A. Kunzmann, et al. (2018), "Bacterial abundance and community composition in pond water from shrimp aquaculture systems with different stocking densities", *Frontiers in Microbiology*, **9**, DOI: 10.3389/fmicb.2018.02457.
- [46] S.A. Mastan, S.K. Begum (2016), "Vibriosis in farm reared white shrimp, *litopenaeus vannamei* in andhra pradesh-natural occurrence and artificial challenge", *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, **4**, DOI: 10.3126/ijasbt.v4i2.15126.
- [47] A. Ganesh, S. Das, K. Chandrasekar, et al. (2010), "Monitoring of total Heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. in an aquaculture pond", *Current Research Journal of Biological Sciences*, **2**(1), pp.48-52.
- [48] V. Tzaneva, S. Bailey, S.F. Perry (2011), "The interactive effects of hypoxemia, hyperoxia, and temperature on the gill morphology of goldfish (*Carassius auratus*)", *American Journal of Physiology*, **300**, pp.1344-1351, DOI: 10.1152/ajpregu.00530.2010.
- [49] M. Fregoso, M.S.M. Covarrubias, M.A.F. Nava, et al. (2017), "Histological alterations in gills of shrimp *Litopenaeus vannamei* in low-salinity waters under different stocking densities: potential relationship with nitrogen compounds", *Aquaculture Research*, **48**, pp.5854-5863, DOI: 10.1111/are.13408.

Đánh giá đáp ứng miễn dịch của các gia đình cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mũ và xác định các chỉ thị miễn dịch phục vụ chọn giống

Trần Thị Phương Dung^{1,2*}, Nguyễn Văn Sáng³, Võ Hồng Phụng³,
Trần Hữu Phúc³, Huỳnh Thị Trúc Quân², Nguyễn Hữu Thịnh²

¹Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh, 280 An Dương Vương, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, 116 Nguyễn Đình Chiểu, phường Đa Kao, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/9/2021; ngày chuyển phản biện 9/9/2021; ngày nhận phản biện 11/10/2021; ngày chấp nhận đăng 15/10/2021

Tóm tắt:

Chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch bao gồm tổng hồng cầu (THC), tổng bạch cầu (TBC), số lượng bạch cầu trung tính (NEU), đơn nhân (MONO), lympho (LYM), trung tâm đại thực bào (TTĐTB) trong mô gan, thận, lách và hiệu giá kháng thể (HGKT) kháng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mũ cao (KBC) và thấp (KBT) được đánh giá trong nghiên cứu này. Các mẫu cá được thu tại 5 thời điểm: trước thời điểm cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi). Khả năng đáp ứng miễn dịch của nhóm KBC hiệu quả hơn KBT thể hiện qua các chỉ tiêu: (1) Số lượng THC giảm ít hơn trong các giai đoạn cảm nhiễm; (2) Số lượng các TBC, NEU, MONO, LYM tăng nhanh hơn, đặc biệt trong giai đoạn 24-48 hpi; (3) Số lượng TTĐTB ở gan, thận, lách nhóm KBC tăng nhanh đến 48 hpi, trong khi nhóm KBT tăng chậm hơn và chỉ tăng đến giai đoạn 24 hpi; (4) HGKT cao hơn trong tất cả giai đoạn cảm nhiễm. Nghiên cứu đã phát triển mô hình hồi quy logistic đa biến với các chỉ thị miễn dịch là NEU, HGKT và TTĐTB ở gan tại giai đoạn 24-48 hpi nhằm xác định cá thể kháng bệnh gan thận mũ với độ nhạy và đặc hiệu lần lượt là 91,7 và 95,0%.

Từ khóa: cá tra, chọn giống, đáp ứng miễn dịch, *Edwardsiella ictaluri*, kháng bệnh.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những loài cá da trơn nước ngọt có giá trị kinh tế cao được nuôi phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Theo báo cáo của Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (VASEP), sản lượng nuôi trồng cá tra đạt 1,56 triệu tấn và giá trị xuất khẩu đạt 1,5 tỷ USD trong năm 2020 [1]. Tuy nhiên, một trong những khó khăn của nghề nuôi cá tra hiện nay là dịch bệnh gan thận mũ bùng phát hầu như ở mọi kích cỡ cá và nhiều nhất ở cá nuôi dưới 4 tháng tuổi. Các phương pháp phòng và trị bệnh trên cơ sở tăng khả năng kháng bệnh tự nhiên và chọn giống cá kháng bệnh hiện nay là một trong các giải pháp phù hợp cho hướng phát triển bền vững các đối tượng cá nuôi thông qua tăng tỷ lệ sống [2, 3]. Chọn giống kháng bệnh có thể cải thiện được khả năng đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cá [3]. Chương trình chọn giống kháng bệnh gan thận mũ trên cá tra tại Việt Nam đã được nghiên cứu [4]. Trong đó, tính trạng sống/chết khi kết thúc mô hình gây bệnh thực nghiệm là một trong những tiêu chí để xác định mức độ kháng bệnh. Bên cạnh tính trạng sống/chết, một số nghiên cứu đã cho thấy một số yếu tố chỉ thị đáp ứng miễn dịch như nồng độ ceruloplasmin trong huyết thanh cá chép rohu, lysozyme và cortisol trên cá hồi vân là những tính trạng hữu ích phục vụ chọn giống kháng bệnh [5, 6]. Tuy nhiên, các tính trạng miễn dịch để phục vụ chọn giống cần được xem xét mức độ tương quan với khả năng kháng bệnh, để đo lường trên số lượng lớn các gia đình và chi phí thấp [7].

Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mũ ở quần thể cá tra chọn giống thế hệ thứ nhất (G1) trong quá trình cảm nhiễm đối với vi khuẩn *E. ictaluri* đã được công bố [8]. Tuy nhiên, sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu giữa các gia đình cá tra kháng bệnh chưa được đề cập. Nghiên cứu này có mục đích đánh giá sự khác biệt về đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu thông qua so sánh về số lượng THC, TBC, NEU, MONO, TTĐTB ở mô gan, thận, lách, HGKT kháng *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra chọn giống G1. Qua đó, nghiên cứu phát triển các chỉ thị miễn dịch để xác định cá thể thuộc các nhóm kháng bệnh cao hay thấp nhằm kết hợp với tỷ lệ sống/chết trong quá trình cảm nhiễm giúp chọn giống có hiệu quả hơn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Cá thí nghiệm và chủng vi khuẩn dùng cảm nhiễm

Cá tra G1 được sử dụng trong nghiên cứu là quần đàn cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mũ thế hệ thứ nhất được thành lập trong đề tài “Ứng dụng công nghệ sinh học chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mũ” giai đoạn 2019-2020 tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2. Chủng vi khuẩn dùng cho các thí nghiệm cảm nhiễm là *E. ictaluri* Gly09M phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ nuôi tại tỉnh An Giang năm 2009.

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

Evaluation of the immune responses against enteric septicemia and determination of immune markers for selective breeding of pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Thi Phuong Dung Tran^{1,2*}, Van Sang Nguyen³,
Hong Phuong Vo³, Huu Phuc Tran³,
Thi Truc Quan Huynh², Huu Thinh Nguyen²

¹Ho Chi Minh City University of Education,
280 An Duong Vuong Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Nong Lam University - Ho Chi Minh City,
Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, 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

Received 6 September 2021; revised 11 October 2021; accepted 15 October 2021

Abstract:

The immune response of two groups of selective breeding pangasius families: susceptible (or sensitive) (S) and resistant (R) family groups, including red blood cell count (RBC count), white blood cell count (WBC count), neutrophil (NEU), monocyte (MONO), lymphocyte (LYM), and melano-macrophage centers (MMCs) count in liver, kidney and spleen tissue and antibody titers (ABT) against the bacteria *Edwardsiella ictaluri* were evaluated in this research. Fish were sampled at five truncated points after infection with the bacteria *Edwardsiella ictaluri* including before the challenge, 24, 48, 264, and 312 hpi. The immune response of the R group was more effective than that of the S group, showing: (1) RBC decreased less during the challenge; (2) WBC, NEU, MONO, LYM increased more rapidly, especially at the truncated point 24-48 hpi; (3) MMCs in liver, kidney, and spleen of the R group increased faster up to the truncated point 48 hpi while the S group increased more slowly and only up to the truncated point 24 hpi; (4) ABT were higher in all stages of the challenge. The research developed a multivariable logistic regression model with immune markers such as NEU, ABT and MMCs in the liver at the truncated point of 24-48 hpi to identify individuals which were resistant to Enteric Septicemia of Catfish (ESC), with sensitivity and specificity of 91.7, 95.0%, respectively.

Keywords: disease resistance, *Edwardsiella ictaluri*, immune response, *Pangasianodon hypophthalmus*, selection.

Classification number: 4.5

2.2. Thí nghiệm cảm nhiễm *E. ictaluri* 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT

Hai nhóm gia đình cá tra kháng bệnh cao và thấp, gồm 3 gia đình kháng bệnh cao (giá trị EBV tại giai đoạn cá hương, cá giống lần lượt là 0,18, 0,03, -0,05 và 0,07, 0,05, 0,06) và 3 gia đình kháng bệnh thấp (giá trị EBV tại giai đoạn cá hương, cá giống lần lượt là -0,24, -0,26, 0,04 và -0,05, 0,03, -0,03) từ kết quả nghiên cứu của T.T.P. Dung và cs (2021) [9] được sử dụng để phục vụ trong nghiên cứu này. Sau khi xác định và lựa chọn được 2 nhóm cá kháng bệnh, tiến hành đưa các cá thể cá giống của các gia đình này (30 cá thể/gia đình) đến phòng thí nghiệm để thực hiện thí nghiệm nhằm thu thập các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch.

Thí nghiệm cảm nhiễm gia đình cá giống G1: 6 gia đình cá giống G1 có khối lượng trung bình là 25 g được bố trí cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* trong bể nhựa (70×30×30 cm), thể tích nước khi tiến hành thí nghiệm là 25 l theo phương pháp Cohabitant [9]. Tổng 119 cá thể (58 cá thể thuộc gia đình KBC và 61 cá thể thuộc gia đình KBT) được thu mẫu để phân tích qua các thời điểm: ngay trước khi cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 hpi, 1.547 mẫu (THC, TBC, MONO, NEU, LYM, TTĐTB gan, thận và lách), bao gồm 793 mẫu của cá thuộc nhóm gia đình KBC và 754 mẫu cá thuộc nhóm gia đình KBT.

Phương pháp phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch: phương pháp xác định THC được tiến hành theo N.T.T. Lieu và cs (2011) [10], TBC và số lượng từng loại bạch cầu được tiến hành theo C.T. Hrubec và cs (2000) [11], HGKT trong huyết thanh được tiến hành theo phương pháp của M. Thrusfield và cs (2018) [12] và số lượng TTĐTB ở trên mẫu mô gan, thận và lách được xác định theo K.L. Camp và cs (2000) [3].

Sơ sánh đáp ứng miễn dịch 2 nhóm gia đình cá tra G1 và phát triển chỉ thị miễn dịch xác định khả năng kháng bệnh

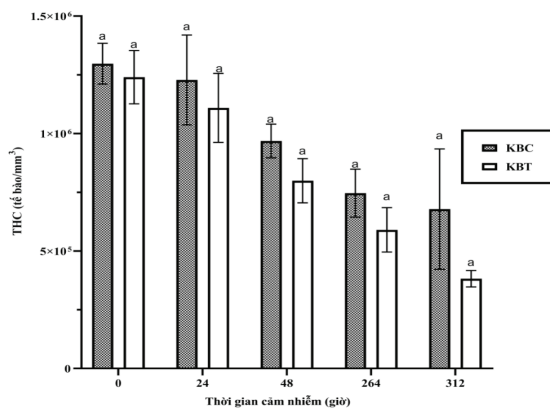
Số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của 2 nhóm gia đình KBC và KBT tại mỗi thời điểm được kiểm tra xác suất của phân phối chuẩn bằng thử nghiệm Skewness và Kurtosis. Kiểm định trung bình t-test 2 nhóm độc lập được sử dụng để so sánh giá trị trung bình của các biến (các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch) tại mỗi thời điểm giữa 2 nhóm. Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SE. Phân tích sự khác biệt về các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch giữa 2 nhóm gia đình kháng bệnh được thực hiện trên SPSS kiểm định sai khác có ý nghĩa ở xác suất $p < 0,05$. Mô hình dự đoán cho việc phân biệt khả năng kháng bệnh được thiết lập từ các số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của 2 nhóm cá. Số liệu mã hóa của cá thuộc gia đình KBC và KBT là 1 và 0. Số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại các thời điểm thu mẫu máu đều là biến liên tục. Xác suất (%) liên quan đến việc xác định các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT được mô phỏng bằng mô hình hồi quy logistic Bayes đa biến với các tính trạng miễn dịch thực hiện trên R 3.5.2 [13]. Phân tích hồi quy logistic đơn biến và đa biến được sử dụng để xác định các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch có ý nghĩa trong việc xác định cá thể thuộc

gia đình KBC hay KBT. Mô hình hồi quy được kiểm định với giá trị AIC (Akaike information criterion), Pseudo R^2 , tính đa cộng tuyến qua hệ số VIF (Variance inflation factor). Ngoài ra, tỷ số ODD (xác suất xác định được cá thể KBC/xác suất xác định được cá thể KBT) của các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch cũng được tính toán trong mô hình. Đánh giá các giá trị để xác định hiệu quả của mô hình phân biệt cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT tối ưu bao gồm: (1) Độ nhạy (Sen - xác suất phân biệt được cá KBC chính xác); (2) Độ đặc hiệu (Spe - xác suất phân biệt được cá KBT chính xác); (3) Biểu đồ ROC có trục tung (y) là độ nhạy và trục hoành (x) là tỷ lệ KBC là giả khi xét nghiệm chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch lại cho kết quả là KBC (1 trừ cho độ đặc hiệu). Diện tích dưới đường biểu diễn ROC (đường nối giữa các điểm có độ nhạy và độ đặc hiệu) gọi là AUC. Mô hình có giá trị AUC cao có thể xác định cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT tốt; (4) Giá trị ngưỡng phân biệt tối ưu là ngưỡng giá trị miễn dịch có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhất. Các mô hình và phân tích mô hình thực hiện trên STATA 14.0 [14].

3. Kết quả và bàn luận

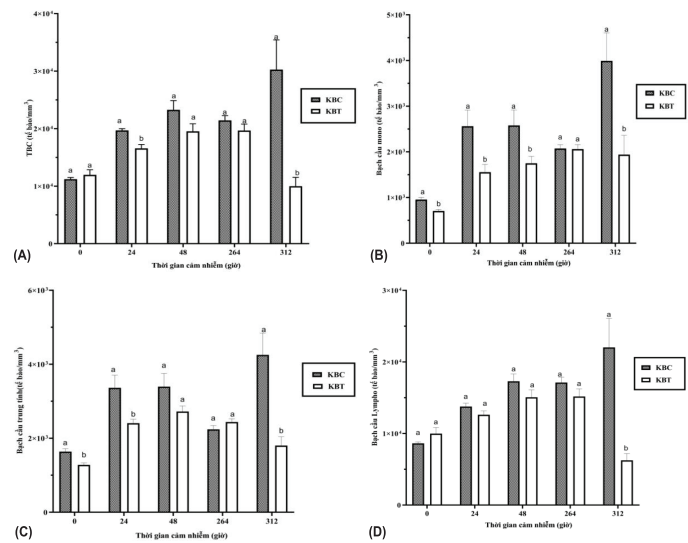
3.1. Kết quả đáp ứng miễn dịch của các gia đình KBC và KBT

Số lượng THC của cả 2 nhóm KBC và KBT đều có xu hướng giảm dần từ trước cảm nhiễm đến 312 hpi được thể hiện ở hình 1. Tuy nhiên, THC nhóm cá KBT giảm nhiều hơn KBC (nhóm KBT giảm nhiều tại 48 hpi, trong khi KBC chỉ giảm nhiều tại 264 hpi). THC nhóm KBC luôn cao hơn KBT tại tất cả các giai đoạn cảm nhiễm nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).



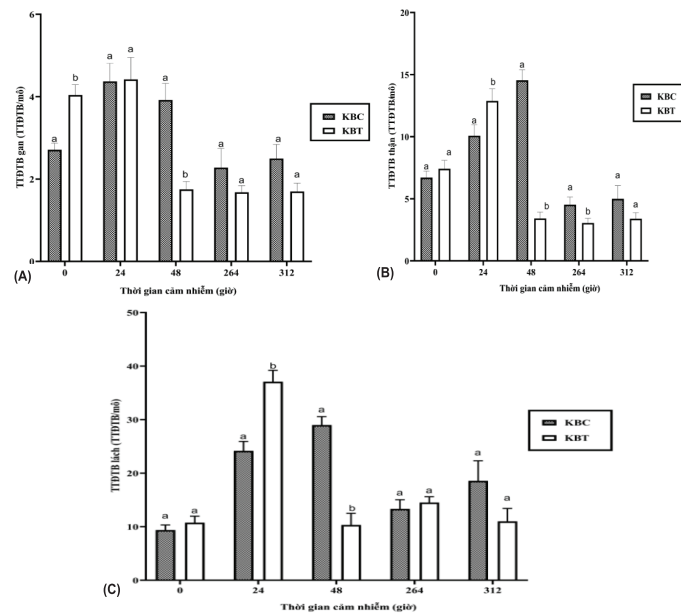
Hình 1. So sánh THC và các loại bạch cầu sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT.

Số lượng TBC, NEU, MONO, LYM của 2 nhóm KBC và KBT có xu hướng tăng từ trước cảm nhiễm đến 48 hpi (hình 2), Cụ thể nhóm KBC lần lượt từ $1,1 \times 10^4$, $1,6 \times 10^3$, $0,9 \times 10^3$, $8,6 \times 10^3$ tế bào/mm³ tăng lên $2,3 \times 10^4$, $3,4 \times 10^3$, $0,6 \times 10^3$, $17,3 \times 10^3$ tế bào/mm³ và nhóm KBT tăng lần lượt từ $1,2 \times 10^3$, $1,3 \times 10^3$, $0,7 \times 10^3$, $9,9 \times 10^3$ tế bào/mm³ lên $1,9 \times 10^4$, $2,7 \times 10^3$, $1,7 \times 10^3$, $15,1 \times 10^3$ tế bào/mm³. Tuy nhiên, TBC, MONO, NEU, LYM của nhóm KBC luôn cao hơn nhóm KBT tại tất cả các giai đoạn cảm nhiễm, đặc biệt, TBC, MONO, NEU của nhóm KBC cao hơn có ý nghĩa thống kê so với KBT tại 24 và 312 hpi ($p<0,05$).



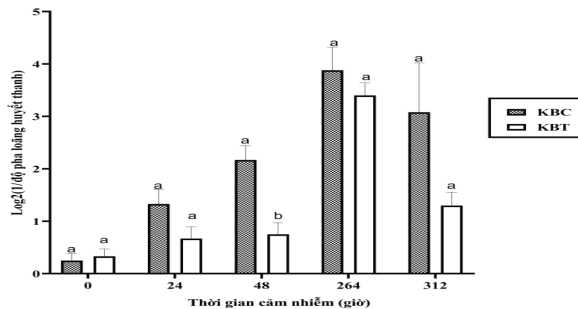
Hình 2. So sánh TBC và các loại bạch cầu sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. (A) Số lượng TBC; (B) các loại MONO; (C) NEU; (D) LYM.

Số lượng TTĐTB ở gan, thận và lách nhóm KBC thấp hơn nhóm KBT từ trước cảm nhiễm đến 24 hpi, nhưng từ giai đoạn 48-312 hpi thì TTĐTB ở gan, thận và lách nhóm KBC luôn cao hơn KBT (hình 3). Nguyên nhân do TTĐTB của nhóm KBC ở gan, thận và lách tăng cao từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn sau 48 hpi (lần lượt từ 2,7, 6,7, 9,4 tăng lên 3,9, 14,5 và 29,0 TTĐTB/mô, riêng tại TTĐTB ở gan tăng cao đến 4,4 TTĐTB/mô tại 24 hpi), sau đó giảm, nhưng nhóm KBT tăng ít số lượng TTĐTB ở gan, thận, lách hơn nhóm KBC và chỉ tăng đến giai đoạn sau 24 hpi (lần lượt từ 4,0, 7,4, 10,8 trước cảm nhiễm tăng lên 4,42, 12,5, 37,1 TTĐTB/mô) và sau đó cũng giảm.



Hình 3. So sánh số lượng TTĐTB sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. (A) Số lượng đại thực bào ở gan; (B) Thận và (C) Lách.

HGKT của huyết thanh cá thuộc 2 nhóm KBC, KBT có xu hướng tăng nhanh từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn 264 hpi, sau đó giảm tại thời điểm 312 hpi được thể hiện ở hình 4. Tuy nhiên, HGKT nhóm KBC luôn cao hơn KBT trong toàn bộ quá trình cảm nhiễm, đặc biệt sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại thời điểm 48 hpi ($p < 0,05$).



Hình 4. So sánh HGKT sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT.

Nhìn chung, đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu của cá thuộc các gia đình KBC và KBT trong quá trình cảm nhiễm có các đặc điểm giống nhau bao gồm: (1) Sự sụt giảm số lượng THC do vi khuẩn xâm nhập vào tế bào hồng cầu làm một số lượng lớn các tế bào hồng cầu bị vỡ, dẫn đến giảm khả năng vận chuyển oxy của tế bào hồng cầu, thiếu oxy tế bào ở mô, giảm chuyển hóa vật chất [15]; (2) Các loại bạch cầu của 2 nhóm gia đình cá có xu hướng tăng qua các thời điểm cảm nhiễm nhằm chống lại sự xâm nhiễm của vi khuẩn [16]. Bạch cầu NEU và MONO tăng đáng kể, đặc biệt trong giai đoạn đầu đáp ứng miễn dịch quá trình viêm nhằm tạo ra phản ứng phòng vệ khẩn cấp cho cơ thể cá [15], tham gia vào quá trình xử lý và trình diện kháng nguyên tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của cơ thể [17, 18]; (3) Sự tăng số lượng TTĐTB trong quá trình cảm nhiễm của cá thuộc 2 nhóm gia đình kháng bệnh nhằm diệt khuẩn trong phản ứng viêm hệ thống và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu [19]; (4) HGKT tăng ở các gia đình KBC và KBT trong quá trình cảm nhiễm nhằm tiêu diệt vi khuẩn [7]. Tuy nhiên, đáp ứng miễn dịch nhóm KBC có hiệu quả hơn KBT trong quá trình cảm nhiễm, đặc biệt ở giai đoạn đầu 24-48 hpi: (1) Số lượng hồng cầu nhóm KBC giảm ít hơn KBT; (2) Số lượng TBC, NEU, MONO, LYM của nhóm KBC tăng nhiều hơn KBT; (3) TTĐTB ở gan, thận và lách nhóm KBC cao hơn KBT; (4) HGKT nhóm KBC cao hơn KBT trong các giai đoạn cảm nhiễm. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của K.L. Camp và cs (2000) [3], điều này cho thấy sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch (đặc biệt bạch cầu LYM T, TTĐTB chủ yếu ở lách và thận) của nhóm gia đình cá da trơn (*Ictalurus punctatus*) kháng bệnh cao hơn so với các gia đình mẫn cảm với vi khuẩn *E. ictaluri* trong giai đoạn 3-14 ngày cảm nhiễm. Ngoài ra, nghiên cứu của E.B. Flemming và cs (2009) [20] cho thấy, giai đoạn 48-72 giờ sau cảm nhiễm rất quan trọng trong mô hình để đánh giá hiệu quả của đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cá nheo Mỹ thông qua tăng phản ứng của các tế bào đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, ức chế sự phát triển của vi khuẩn và cảm ứng phản ứng giai đoạn đáp ứng cấp tính tiếp theo. Kết quả tương đồng với nghiên cứu này cho thấy,

giai đoạn đầu cảm nhiễm 48 hpi có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch của cá. Do đó, các gia đình nhóm KBT có đáp ứng miễn dịch kém hiệu quả hơn KBC giai đoạn đầu cảm nhiễm có thể là một nguyên nhân dẫn đến số lượng cá chết ở nhóm KBT nhiều hơn KBC trong quá trình cảm nhiễm.

3.2. Xác suất liên quan đến việc xác định cá thể kháng bệnh qua các giai đoạn cảm nhiễm của các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch đều có thể xác định được các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT tại tất cả thời điểm trong quá trình cảm nhiễm với xác suất liên quan $\geq 4,80\%$ được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Xác suất (%) các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch xác định được cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT.

Chỉ tiêu	Đơn vị	24-48 hpi	264-312 hpi	24-312 hpi
THC	10^3 tế bào/mm ³	11,2	26,5	12,4
TBC	10^4 tế bào/mm ³	19,5	41,3	23,7
NEU	10^3 tế bào/mm ³	88,6	9,1	25,3
MONO	10^3 tế bào/mm ³	11	15,3	69,1
LYM	10^3 tế bào/mm ³	17,9	39,2	18,1
HGKT	Độ pha loãng huyết thanh	100	19	100
TTĐTB ở gan	TTĐTB/mô	100	22,2	63,1
TTĐTB ở thận	TTĐTB/mô	4,8	63	95,1
TTĐTB ở lách	TTĐTB/mô	12,3	5,8	41,8

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch liên quan nhất giúp xác định các cá thể KBC hay KBT trong giai đoạn 24-48 hpi là NEU, HGKT và TTĐTB ở gan với xác suất lần lượt là 88,6, 100, 100%; trong giai đoạn 264-312 hpi là TTĐTB ở thận, LYM và TBC với xác suất lần lượt là 63, 39,2 và 41,3%. Tuy nhiên, trong toàn bộ giai đoạn cảm nhiễm các yếu tố có ý nghĩa trong việc phân biệt các cá thể kháng bệnh là MONO, HGKT và TTĐTB ở thận.

3.3. Phát triển mô hình xác định khả năng kháng bệnh

Phân tích hồi quy logistic đơn biến cho thấy, chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch như TBC, NEU và LYM, HGKT, TTĐTB ở gan và thận có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong việc xác định được cá thể KBC hay KBT tại các thời điểm trong quá trình cảm nhiễm. Phân tích hồi quy logistic đa biến, thông qua việc đánh giá giá trị AIC nhỏ nhất, Pseudo R^2 cao nhất cho thấy mô hình hiệu quả và giá trị đa cộng tuyến VIF < 2 cho thấy sự tồn tại thấp của tính đa cộng tuyến trong mô hình [14]. Nghiên cứu bước đầu xác lập được các mô hình tại những thời điểm cảm nhiễm với một số chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch có ý nghĩa trong việc xác định được các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT (bảng 2). Ngoài ra, kết quả phân tích tỷ số ODD của các tham số trong mô hình xác định cá thể KBC so với KBT đều cao hơn 1,0. Điều này cho thấy, khi các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tăng sẽ làm tăng khả năng xác định các cá thể KBC.

Chọn lọc gián tiếp khả năng kháng bệnh dựa trên các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch, thường là chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu được xem như chọn lọc tính trạng kháng bệnh [7]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch khác nhau có thể xác định các cá thể KBC hay KBT với hiệu quả khác nhau tại từng thời điểm trong quá trình cảm nhiễm. Phân tích hồi quy logistic đa biến trong nghiên cứu này cho thấy, có nhiều mô hình

Bảng 2. Các mô hình xác định khả năng kháng bệnh của các cá thể theo các giai đoạn.

Chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch	Chỉ tiêu	24-48 hpi	264-312 hpi	24-312 hpi
NEU	Tỷ số ODD	1,0024	–	–
MONO	Tỷ số ODD	–	–	1,0010
LYM	Tỷ số ODD	–	1,0001	–
HGKT	Tỷ số ODD	14,0	–	1,76
TTĐTB ở gan	Tỷ số ODD	3,2	1,5096	–
TTĐTB ở thận	Tỷ số ODD	–	1,3747	1,27
Các thông số kiểm định				
Giá trị kiểm định mô hình AIC nhỏ nhất		33,1	58,4	101,9
Giá trị đa cộng tuyến VIF trong mô hình		1,0	1,1	1,1
Pseudo R ²		0,6	0,2	0,3
AUC		0,9	0,8	0,8

có thể xác định cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT trong quá trình cảm nhiễm. Cách tiếp cận này phù hợp với nghiên cứu trong thử nghiệm các mô hình chẩn đoán bệnh dựa trên các thông số huyết học [14]. Giá trị AUC của các mô hình xác định cá thể kháng bệnh trong nghiên cứu này tại giai đoạn 24-48 hpi, 264-312 hpi và toàn bộ quá trình cảm nhiễm lần lượt là 0,9, 0,8 và 0,8. Kết quả này cho thấy, ở các thời điểm cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm đều có thể xác định được các cá thể kháng bệnh đạt hiệu quả ($AUC \geq 0,8$), đặc biệt tại thời điểm 24-48 hpi với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch NEU, HGKT và TTĐTB ở gan ($AUC=0,9$).

Bảng 3. Khả năng (%) xác định các cá thể kháng bệnh tại giai đoạn 24-48 hpi.

Chỉ tiêu	Tiêu chí (đơn vị)	Giá trị
NEU	Độ nhạy/độ đặc hiệu (%)	70,8/66,7
	AUC	0,7
	Ngưỡng phân biệt (10^3 tế bào/mm ³)	2.610
HGKT	Độ nhạy/độ đặc hiệu (%)	87,5/45,8
	AUC	0,8
	Ngưỡng phân biệt (log ₁₀ (HGKT))	1,0
TTĐTB ở gan	Độ nhạy/độ đặc hiệu (%)	95,8/50,0
	AUC	0,7
	Ngưỡng phân biệt (TTĐTB/mô)	2,5

Trong mô hình xác định khả năng KBC hay KBT tại giai đoạn 24-48 hpi, độ nhạy của NEU, HGKT và TTĐTB ở gan đạt 70,8-95,8%, độ đặc hiệu đạt 45,8-66,7% với ngưỡng phân biệt tương ứng là 2.610×10^3 tế bào/mm³, 1,0, 2,5 TTĐTB/mô tại bảng 3. Độ nhạy và đặc hiệu của mô hình hồi quy logistic đa biến là 91,7 và 95,7% (số liệu không trình bày chi tiết trong nghiên cứu này). T.T. Phan và cs (2018) [14] cũng xác định rằng, việc sử dụng các thông số huyết học chẩn đoán bệnh là khả thi với độ nhạy và đặc hiệu lần lượt là 74,8 và 87,1%. Tuy nhiên, trong phạm vi nghiên cứu này chỉ thực hiện với 6 gia đình KBC và KBT nên trong tương lai cần phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại nhiều thời điểm, đặc biệt lưu ý 24-48 hpi ở quy mô quần đàn chọn giống với số lượng gia đình lớn hơn. Ngoài ra, để có thể vận dụng vào chương trình chọn giống dài hạn, cần tính toán tương quan di truyền giữa chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch với tính trạng sống/chết của thí nghiệm cảm nhiễm và hệ số di truyền qua các thế hệ với quy mô gia đình lớn như vừa nêu.

4. Kết luận

Cá thuộc gia đình cá tra KBC thể hiện đáp ứng miễn dịch cao hơn cá thuộc gia đình KBT tại hầu hết các thời điểm sau cảm nhiễm. Số lượng NEU, HGKT và TTĐTB ở gan tại thời điểm 24-48 hpi có thể sử dụng như các chỉ thị miễn dịch trong việc xác định cá thể cá tra KBC hay KBT do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Directorate of Fisheries (2021), "Many obstacles for pangasius export", <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/ca-tra/nguyen-lieu/nhiều-chông- gai-cho-xuat-khau-ca-tra-20992.html>, accessed 25 August 2021 (in Vietnamese).
- [2] T. Gjedrem, M. Baranski (2009), *Selective Breeding in Aquaculture: an Introduction*, Springer, DOI: 10.1007/978-90-481-2773-3.
- [3] K.L. Camp, W.R. Wolters, C.D. Rice (2000), "Survivability and immune responses after challenge with *Edwardsiella ictaluri* in susceptible and resistant families of channel catfish, *Ictalurus punctatus*", *Fish Shellfish Immunol.*, **10**(6), pp.475-487, DOI: 10.1006/fsim.2000.0261.
- [4] T.V. Nguyen, N.V. Sang, T.H. Phuc, et al. (2019), "Genetic evaluation of a 15-year selection program for high growth in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*", *Aquaculture*, **509**, pp.221-226, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.05.034.
- [5] S. Das, P.K. Sahoo (2014), "Makers for selection of disease resistance in fish a review", *Aquaculture International*, **22**(6), pp.1793-1812.
- [6] G.M. Weber, R.L. Vallejo (2008), "Cortisol response to a crowding stress: Heritability and association with disease resistance to *Yersinia ruckeri* in rainbow trout", *N. Am. J. Aquacult.*, **70**, pp.425-433, DOI: 10.1577/A07-059.1.
- [7] J. Galina (2017), *Fish Diseases*, Academic Press.
- [8] T.T.P. Dung, T.H. Phuc, N.T. Vu, et al. (2021), "Estimated genetic parameters for resistance to pyogenic liver and kidney disease in fish tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **20**(1), pp.40-48 (in Vietnamese).
- [9] T.T.P. Dung, N.V. Sang, V.H. Phuong, et al. (2021), "Evaluating the immune response of macrophages in selected pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*) resistant to purulent liver and kidney disease", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **16**(1), pp.1-10 (in Vietnamese).
- [10] N.T.T. Lieu, B.T.B. Hang, D.T.H. Oanh (2011), "Understanding the fluctuations of non-specific immune factors in pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) infected with *Edwardsiella ictaluri* bacteria", *CTU Journal of Science*, **(17A)**, pp.20-29 (in Vietnamese).
- [11] C.T. Hrubec, J.L. Cardinale, S.A. Smith (2000), "Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*)", *Veterinary Clinical Pathology*, **29**(1), pp.7-12, DOI: 10.1111/j.1939-165X.2000.tb00389.x.
- [12] M. Thrusfield (2018), *Veterinary Epidemiology*, Veterinary Clinical Sciences, University of Edinburgh, pp.422-423.
- [13] N.V. Tuan (2015), *Data Analysis with R*, General Publishing House, pp.360-393 (in Vietnamese).
- [14] T.T. Phan, A.T.T. Nguyen, A.N. Van, et al. (2018), "Neutrophil to lymphocyte with monocyte to lymphocyte ratio and white blood cell count in prediction of lung cancer", *A.M.J.*, **11**(4), pp.231-236, DOI: 10.21767/AMJ.2018.3387.
- [15] H. Chen, G. Yuan, J. Su, et al. (2019), *Hematological and Immune Genes Responses in Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with Septicemia Induced by Edwardsiella ictaluri*, Fish and Shellfish Immunology.
- [16] A.C.K. Benli, H.Y. Yildiz (2004), "Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*", *Aquaculture*, **25**, pp.1388-1390, DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.01158.x.
- [17] T.C. Uribe, H. Folch, R. Enriquez, et al. (2011), "Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review", *Veterinari Medicina*, **56**(10), pp.486-503, DOI: 10.17221/3294-VETMED.
- [18] E.F. Petersen (2003), *Monoclonal Antibodies to Leucocytes and Immunoglobulin from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) - Production, Characterisation and Application*, Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen.
- [19] C.A. Shoemaker, P.H. Klesius (1997), "Protective immunity against enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following controlled exposure to *Edwardsiella ictaluri*", *Journal of Fish Diseases*, **20**(5), pp.361-368, DOI: 10.1046/j.1365-2761.1997.00310.x.
- [20] E.B. Flemming, G.C. Waldbieser, W.R. Wolters, et al. (2009), "Expression analysis of selected immune-relevant genes in channel catfish during *Edwardsiella ictaluri* infection", *Journal of Aquatic Animal Health*, **21**(1), pp.23-35, DOI: 10.1577/H08-009.1.

Nghiên cứu sự tái sinh một bước *in vitro* của giống mía KK3 (*Saccharum officinarum* L.)

Phan Thị Thu Hiền*

Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2,
32 Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hòa, thị xã Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/11/2021; ngày chuyển phản biện 12/11/2021; ngày nhận phản biện 14/12/2021; ngày chấp nhận đăng 20/12/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu đã thiết lập được công thức môi trường tái sinh trực tiếp của giống mía KK3. Cụ thể, môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non giống mía KK3 là RE2 (MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin), tỷ lệ tái sinh đạt 25,27% và số chồi hình thành/1 g cuộn lá non là 11,56. Nghiên cứu cho thấy, vị trí mảnh cắt cuộn lá non phù hợp cho tái sinh trực tiếp nhất là cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 25,40%, mẫu tái sinh tốt, tỷ lệ tạo đa chồi cao. Khi sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày 1 cm, tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất 25,58%, khả năng hình thành đa chồi cao. Thời gian tiền nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực lên khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non của giống mía KK3. Khi tiến hành tiền nuôi cấy trong thời gian 4 ngày giúp tăng khả năng tái sinh của giống mía KK3 (đạt 47,49%). Môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin có bổ sung 30% nước dừa cho thấy khả năng tái sinh cao nhất (52,95%) và đạt trung bình 52,33 chồi/1 g cuộn lá non.

Từ khóa: cuộn lá non, KK3, mía, một bước, tái sinh trực tiếp.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây mía (*Saccharum officinarum* L.) thuộc chi *Saccharum*, họ Gramineae, lớp một lá mầm (Monocotyledneae), ngành thực vật hạt kín (Magnoliophyta) [1]. Đây là thành viên duy nhất của họ Poaceae [2]. Các giống mía thương mại ngày nay là con lai giữa *Saccharum officinarum* L. (chiếm 80-90% hệ gen) và *Saccharum spontaneum* L. (chiếm 10-20% hệ gen) [3]. Cây mía có đặc tính di truyền đặc biệt là tính dị hợp tử cao, phù hợp nhất với khí hậu nóng ẩm [4].

Hiện nay, có khoảng 110 quốc gia sản xuất đường từ mía hoặc củ cải đường và 8 quốc gia sản xuất đường từ mía và củ cải đường. Mía cung cấp nguyên liệu cho khoảng 70% sản lượng đường toàn cầu, ngoài ra còn cung cấp các nguyên liệu cho ngành công nghiệp sản xuất rượu, acid acetic, ethanol, butanol, giấy, ván ép... [5-10]. Những lợi thế về ethanol của cây mía đối với môi trường đã thay thế các nguyên liệu hóa thạch, xăng... giúp cân bằng năng lượng trong thời đại ngày càng khan hiếm hiện nay [11].

Cho đến nay, phương pháp nhân giống mía truyền thống (như giâm hom) vẫn đang được sử dụng phổ biến nhưng có nhược điểm là sự lây nhiễm sâu bệnh qua các thể hệ, thoái hóa giống theo thời gian, không đồng đều về sản phẩm thương mại... đã làm cho phương pháp này không còn phù hợp. Nghiên cứu tái sinh *in vitro* cây mía đã được các nhà khoa học nghiên cứu. Nguyên liệu thực vật sử dụng để nuôi cấy *in vitro* với nguồn mẫu rất đa dạng như: mảnh cắt cuộn lá non [2, 12], phân đoạn hoa non [13], chồi đỉnh và nách

[14], hạt [15]. Hệ thống tái sinh mía *in vitro* đã được nghiên cứu trên nhiều giống mía, chủ yếu sử dụng để tái sinh cây chuyển gen, một phần khác nhằm mục đích nhân giống cung cấp cho thị trường.

Tuy nhiên, việc nuôi cấy với thời gian càng lâu càng xuất hiện nhiều biến dị soma, ảnh hưởng tới khả năng sống sót của cây mía khi ra vườn ươm. Để hạn chế hiện tượng này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quá trình tái sinh một bước từ cuộn lá non giống mía KK3 nhằm rút ngắn thời gian nuôi cấy trong ống nghiệm, giúp hạn chế tối đa các biến dị soma xảy ra trong quá trình nuôi cấy.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Cuộn lá non của giống mía KK3 4-6 tháng tuổi trồng tại Vườn thực nghiệm Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Mía đường (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non: Cây mía 4-6 tháng tuổi giống KK3 khỏe mạnh được thu thập ở Vườn thực nghiệm Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2. Thu mẫu ngọn mía và lau bằng cồn 70%. Lần lượt bóc bỏ các lớp bẹ lá bên ngoài, phần cuộn lá non trắng nõn được đưa vào thí nghiệm.

*Email: phanthithuhien@hpu2.edu.vn

Research on the one-step regeneration of sugarcane in KK3 variety (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro*

Thi Thu Hien Phan*

Faculty of Biology - Agricultural Engineering, Hanoi Pedagogical University 2,
32 Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen Town, Vinh Phuc Province, Vietnam

Received 8 November 2021; revised 14 December 2021; accepted 20 December 2021

Abstract:

The research has successfully created the formula for direct regeneration medium of sugarcane variety KK3. In detail, the most suitable medium for direct regeneration from young leaf rolls of sugarcane variety KK3 was RE2 (MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin), the regeneration rate was 25.27%, the number of shoots formed/1.0 g of young leaf rolls reached 11.56 shoots. The study showed that the position of the young leaf rolls cuttings suitable for direct regeneration was the cuttings located from 2-6 cm away from the growth apex. The shoot regeneration rate reached 25.40%, the regenerating samples were 25.40%, good yield, and a high rate of multiple shoot formation. When using plant cuttings with a thickness of 1 cm, the highest regeneration rate was 25.58%, and the ability to form multiple shoots was high. Pre-cultivation time had a positive effect on the ability to regenerate shoots directly from young leaf coils of sugarcane variety KK3. When conducting pre-cultivation in four days will help increase the regeneration ability of the sugarcane variety, reaching 47.49%. MS medium + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin supplemented with 30% coconut water showed the highest regeneration ability, reaching 52.95%, number of shoots reaching 52.33 shoots/1 g of young leaf rolls.

Keywords: direct regeneration, KK3, one step, *Saccharum officinarum* L., young leaf rolls.

Classification number: 4.6

Cắt cuộn lá non (có chiều dài khoảng 9 cm tính từ đỉnh sinh trưởng) thành nhiều mảnh cắt thực vật, có đường kính 1 cm. Đặt các mảnh cắt thực vật lên đĩa petri chứa môi trường MS có bổ sung α -NAA 5 mg/l và Kinetin 0,5 mg/l (RE1) [4]. Các công thức thí nghiệm khác (RE2, RE3, RE4) được tăng nồng độ α -NAA và Kinetin lên 10 và 1 mg/l (bảng 1). Sau 4 tuần, thống kê số chồi hình thành.

Bảng 1. Thành phần môi trường tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non.

Công thức	Thành phần môi trường
ĐC	MS
RE1	MS + 5 mg/l α -NAA + 0,5 mg/l Kinetin
RE2	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin
RE3	MS + 10 mg/l α -NAA + 0,5 mg/l Kinetin
RE4	MS + 10 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguyên liệu vào mẫu đến khả năng tái sinh trực tiếp của giống mía KK3: Để khảo sát khả năng tái sinh trực tiếp, chúng tôi tiến hành sử dụng 3 mẫu khác nhau (đỉnh sinh trưởng, chồi nách và mảnh cắt cuộn lá non) đặt trên môi trường tái sinh trực tiếp. Sau 4 tuần nuôi cấy thống kê số chồi hình thành.

Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí lát cắt đến khả năng tái sinh của giống mía KK3: Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí lát cắt cuộn lá non đến khả năng tái sinh bằng việc đặt trên môi trường tái sinh đã tối ưu các mảnh cắt thuộc 3 nhóm như sau: OP1 cách đỉnh sinh trưởng 1 cm; OP2: cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm; OP3: cách đỉnh sinh trưởng 7-10 cm. Kết quả thí nghiệm được thống kê sau 4 tuần nuôi cấy.

Nghiên cứu ảnh hưởng của độ dày mẫu cấy lên khả năng tái sinh của giống mía KK3: Sử dụng cuộn lá non của giống mía KK3 cắt thành những mảnh cắt có độ dày lần lượt là 1, 2, 3 và 4 cm đặt lên môi trường tái sinh tối ưu. Kết quả được thống kê sau 4 tuần nghiên cứu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tái sinh của giống mía KK3: Để nâng cao hiệu suất tái sinh, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tái sinh của giống mía KK3 (trong 2, 4 và 6 ngày) trên môi trường tái sinh tối ưu. Sau 4 tuần nuôi cấy thống kê khả năng tái sinh của giống mía KK3.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nước dừa lên khả năng tái sinh của giống mía KK3: Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nước dừa trên 5 công thức thí nghiệm được bố trí theo bảng 2. Sau 4 tuần nuôi cấy thống kê tỷ lệ tái sinh.

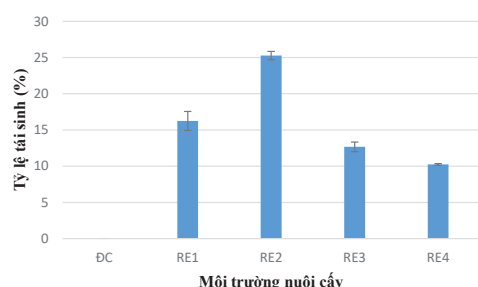
Bảng 2. Môi trường tái sinh một bước giống mía KK3 bổ sung nước dừa với nồng độ khác nhau.

Công thức	Thành phần môi trường
ĐC	MS
CC1	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin + 10% nước dừa
CC2	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin + 20% nước dừa
CC3	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin + 30% nước dừa
CC4	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin + 40% nước dừa

3. Kết quả và bàn luận

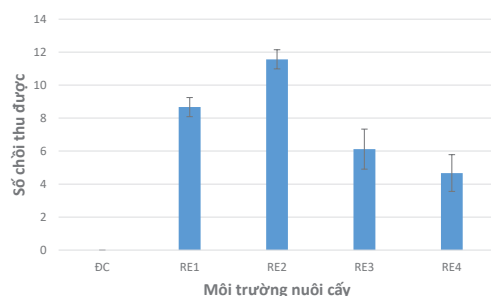
3.1. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA và Kinetin đến sự tái sinh trực tiếp của giống mía KK3

Phương pháp tái sinh trực tiếp chồi mía không qua giai đoạn phôi soma giúp rút ngắn thời gian nuôi cấy, tạo ra được một lượng chồi nhất định trong thời gian ngắn trên môi trường MS cải biên có bổ sung α -NAA và Kinetin [4]. Sự hình thành chồi được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện ở hình 1 và 2.



Hình 1. Tỷ lệ tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non của giống mía KK3 trên môi trường khác nhau.

Kết quả hình 1 cho thấy, trên môi trường MS (đối chứng) không có sự phát sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non. Trên môi trường RE1, RE3 tỷ lệ tái sinh chồi đạt lần lượt là 16,25 và 12,67%. Tỷ lệ tái sinh đạt thấp nhất (10,25%) trên môi trường RE4. Môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non giống mía KK3 là RE2, tỷ lệ tái sinh đạt 25,27%. Kết quả số chồi/1 g cuộn lá non cho thấy, trên môi trường RE1 số chồi thu được đạt 8,67, RE3 là 6,12, RE4 có số chồi thu được thấp nhất (4,67). Môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non là RE2, tỷ lệ tái sinh đạt 11,56 chồi/g cuộn lá non (hình 2). Kết quả thu được cho thấy, để tái sinh chồi chúng tôi đã sử dụng gấp đôi lượng Kinetin so với công thức của R. Gill và cs (2006) [4]. Tuy nhiên, tỷ lệ tái sinh chúng tôi thu được chỉ tương đương với kết quả của R. Gill và cs (2006) [4]. Nguyên nhân hiện tượng này do bản chất di truyền mỗi giống mía khác nhau, dẫn đến khả năng tái sinh của các giống mía trên các môi trường thu được khác nhau.



Hình 2. Số chồi tái sinh từ cuộn lá trên môi trường tái sinh trực tiếp giống mía KK3.

3.2. Ảnh hưởng của các nguyên liệu khác nhau đến khả năng tái sinh chồi trực tiếp

Để tiến hành khảo sát khả năng tái sinh chồi trực tiếp trên các nguyên liệu khác nhau, chúng tôi sử dụng các mẫu cây thực vật khác nhau đặt trên môi trường RE2. Sau 4 tuần thống kê số mẫu tái sinh (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguyên liệu thực vật đến tỷ lệ tái sinh chồi trực tiếp giống mía KK3.

Nguyên liệu thực vật	Tỷ lệ tái sinh (%)
Đỉnh sinh trưởng	6,06 ^a ±0,18
Chồi bên	9,58 ^b ±0,36
Mảnh cắt cuộn lá	25,27 ^a ±0,47
<i>LSD</i> _{0,05}	2,6
<i>CV</i> (%)	0,72

Các chữ cái (^{a, b, c}) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 3 cho thấy, khi sử dụng nguồn mẫu thực vật khác nhau đặt trên môi trường tái sinh MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin, tỷ lệ tái sinh thấp nhất thu được ở mẫu cây là đỉnh sinh trưởng (6,06%). Trên môi trường này, chồi bên đạt tỷ lệ tái sinh cao hơn (9,58%). mảnh cắt cuộn lá non đạt tỷ lệ tái sinh cao nhất (25,27%). Có hiện tượng này do những mảnh cắt thực vật gần đỉnh sinh trưởng của cây mía tiết ra một lượng lớn phenolic gây độc cho mẫu cây làm ảnh hưởng đến khả năng tái sinh mẫu. Hiện tượng này cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của R. Kaur và cs (2016) [2].

Như vậy, trên môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin, mảnh cắt cuộn lá non của giống mía KK3 cho tỷ lệ tái sinh cao nhất trong các vật liệu sử dụng để nuôi cấy (đạt 25,27%).

3.3. Ảnh hưởng của vị trí lát cắt đến khả năng tái sinh của mẫu

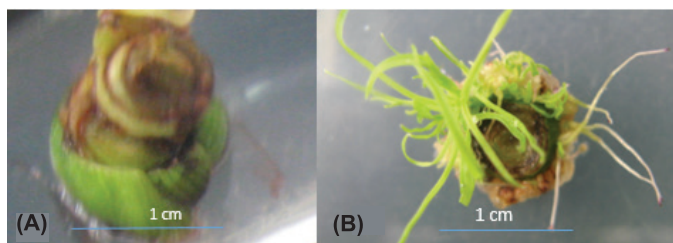
Vị trí lát cắt của cuộn lá non cũng ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của mẫu ở giống mía KK3. Các mảnh cắt cuộn lá non thuộc nhóm OP1 (cách đỉnh sinh trưởng 1 cm), OP2 (cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm) và OP3 (cách đỉnh sinh trưởng 7-10 cm) của giống mía KK3 được đặt trên môi trường tái sinh chồi trực tiếp MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của vị trí lát cắt mẫu lên khả năng tái sinh trực tiếp giống mía KK3.

Vị trí của mẫu	Tỷ lệ tái sinh	Đặc điểm của mẫu
OP1	9,10 ^a ±0,28	Phenolic tiết ra nhiều
OP2	25,40 ^b ±0,69	Tái sinh tốt, tỷ lệ tạo đa chồi cao
OP3	16,14 ^b ±0,52	Tỷ lệ tạo rễ cao
<i>LSD</i> _{0,05}	1,04	
<i>CV</i> (%)	3,1	

Các chữ cái (^{a, b, c}) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 4 và hình 3 cho thấy, vị trí OP2 cho tỷ lệ tái sinh cao nhất (đạt 25,40%), OP1 cho tỷ lệ tái sinh thấp nhất (đạt 9,10%), nguyên nhân do các mẫu gần đỉnh sinh trưởng có rất nhiều chất phenolic thứ cấp tiết ra trong quá trình nuôi cấy, dẫn đến gây độc mẫu và làm giảm tỷ lệ tái sinh. Khi đặt các mảnh cắt ở vị trí OP3 cho tỷ lệ tái sinh chỉ đạt 16,14%, nhưng mẫu có tỷ lệ tạo rễ bất định cao (bảng 4). Hiện tượng này xảy ra do mẫu già, nồng độ auxin nội sinh cao dẫn đến ưu tiên hình thành tạo rễ.



Hình 3. Hiệu quả tái sinh chồi từ cuộn lá non ở các vị trí khác nhau. (A) Vị trí OP1; (B) Vị trí OP2.

Như vậy, vị trí mảnh cắt cuộn lá non phù hợp cho tái sinh trực tiếp nhất là các mảnh cắt cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 25,40%, mẫu tái sinh tốt, tỷ lệ tạo đa chồi cao.

3.4. Ảnh hưởng của độ dày mẫu lên khả năng tái sinh của giống mía KK3

Độ dày của mảnh mô cũng là yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của giống mía KK3. Chúng tôi sử dụng mảnh cắt có độ dày lần lượt là 1, 2, 3 và 4 cm. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của độ dày mảnh mô đến khả năng tái sinh chồi trực tiếp của giống mía KK3.

Độ dày của mảnh mô (cm)	Tỷ lệ tái sinh	Khả năng hình thành đa chồi
1	25,58 ^a ±0,78	Tốt
2	18,33 ^b ±0,72	Trung bình
3	12,17 ^c ±0,94	Trung bình
4	8,87±0,65	Ít
<i>LSD</i> _{0,05}	1,47	
<i>CV</i> (%)	4,8	

Các chữ cái (^{a, b, c}) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 5 cho thấy, sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày 4 cm cho tỷ lệ tái sinh thấp nhất (đạt 8,87%) và khả năng hình thành đa chồi thấp. Khi sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày giảm dần, tỷ lệ tái sinh tăng dần. Cụ thể, với độ dày 3 và 2 cm, tỷ lệ tái sinh đạt lần lượt là 12,17 và 18,33%, khả năng hình thành đa chồi trung bình. Khi sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày 1 cm, tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất (25,58%), khả năng hình thành đa chồi tốt.

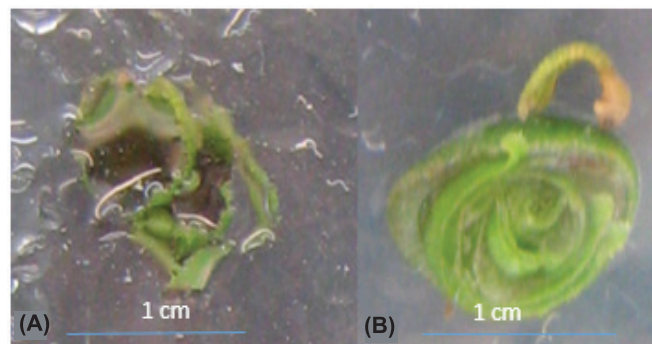
3.5. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tái sinh của giống mía KK3

Để nghiên cứu thời gian tiền nuôi cấy tác động đến khả năng tái sinh của giống mía KK3, chúng tôi tiến hành tiền nuôi cấy với thời gian lần lượt 2, 4 và 6 ngày để khảo sát khả năng tái sinh của giống mía KK3. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tái sinh của giống mía KK3.

Thời gian tiền nuôi cấy (ngày)	Tỷ lệ tái sinh (%)
ĐC	24,26 ^c ±0,74
2	33,75 ^b ±1,08
4	47,49 ^a ±0,79
6	34,03 ^b ±0,60
<i>LSD</i> _{0,05}	1,55
<i>CV</i> (%)	2,40

Các chữ cái (^{a, b, c}) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.



Hình 4. Cuộn lá non khi nuôi cấy 4 ngày (A) và 6 ngày (B).

Kết quả bảng 6 và hình 4 cho thấy, khi không tiến hành tiền nuôi cấy (ĐC), tỷ lệ tái sinh đạt 24,26%. Khi tiến hành tiền nuôi cấy trước 2 ngày, tỷ lệ tái sinh đạt cao hơn (33,75%). Nâng số ngày tiền nuôi cấy lên 4 ngày, tỷ lệ tái sinh đạt 47,49%. Khi tiền nuôi cấy 6 ngày, tỷ lệ tái sinh đạt 34,03%. Thời gian tiền nuôi cấy là một công đoạn quan trọng, trong quá trình này phenolic sẽ được tiết ra, khi được chuyển sang môi trường mới lượng chất này sẽ tiết ra ít hơn, đảm bảo cho việc tái sinh dễ dàng và hiệu quả cao hơn.

Như vậy, thời gian tiền nuôi cấy ảnh hưởng tích cực lên khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non của giống mía KK3. Khi tiến hành tiền nuôi cấy trong thời gian 4 ngày sẽ giúp tăng khả năng tái sinh của giống mía (đạt 47,49%).

3.6. Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa lên khả năng tái sinh của giống mía KK3

Nước dừa là một dung dịch có ý nghĩa quan trọng trong việc nâng cao khả năng tái sinh chồi của cây. Ở giống mía KK3, chúng tôi sử dụng 5 công thức môi trường khác nhau để khảo sát nồng độ nước dừa thích hợp. Kết quả được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tái sinh chồi của giống mía KK3.

Công thức	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi hình thành (chồi/g cuộn lá non)
ĐC (0% nước dừa)	26,31 ^a ±1,18	22,33 ^a ±0,58
CC1 (10% nước dừa)	32,51 ^a ±0,81	30,67 ^a ±2,52
CC2 (20% nước dừa)	46,58 ^b ±3,22	37,67 ^b ±1,15
CC3 (30% nước dừa)	52,95 ^b ±0,78	52,33 ^b ±0,58
CC4 (40% nước dừa)	36,92 ^c ±0,72	32,33 ^c ±0,58
LSD _{0,05}	3,00	2,40
CV (%)	4,20	3,80

Các chữ (a, b, c) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.



Hình 5. Hiện tượng tái sinh chồi từ cuộn lá non sau 4 tuần nuôi cấy.

Về tỷ lệ tái sinh chồi, kết quả bảng 7 và hình 5 cho thấy, trên môi trường đôi chứng, tỷ lệ tái sinh đạt 26,31%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non là 22,33. Khi sử dụng môi trường tái sinh có bổ sung 10% nước dừa, tỷ lệ tái sinh đạt 32,51%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non là 30,67. Khi tăng lượng nước dừa lên 20%, tỷ lệ tái sinh đạt 46,58%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non đạt 37,67. Khi tăng nồng độ nước dừa lên 30%, tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất 52,95%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non đạt 52,33. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ nước dừa lên 40%, tỷ lệ tái sinh giảm, chỉ đạt 36,92%, số chồi hình thành đạt 32,33 chồi/1 g cuộn lá non.

Như vậy, môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin có bổ sung 30% nước dừa cho thấy khả năng tái sinh cao nhất (đạt 52,95%), số chồi đạt 52,33 chồi/1 g cuộn lá non.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập thành công công thức môi trường tái sinh trực tiếp của giống mía KK3. Theo đó, môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non giống mía KK3 là RE2 (MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin), tỷ lệ tái sinh đạt 25,27%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non đạt 11,56 chồi.

Trong tất cả các mẫu đem nuôi cấy, mảnh cắt cuộn lá non là mẫu cấy cho thấy khả năng tái sinh cao nhất với tỷ lệ tái sinh đạt 25,27%. Kết quả nghiên cứu cho thấy, vị trí mảnh cắt cuộn lá non phù hợp cho tái sinh trực tiếp nhất là các mảnh cắt thuộc vị trí cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 25,40%, mẫu tái sinh tốt, tỷ lệ tạo đa chồi cao.

Khi sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày 1 cm, tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất 25,58%, khả năng hình thành đa chồi cao.

Thời gian tiền nuôi cấy ảnh hưởng tích cực lên khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non của giống mía KK3. Khi tiến hành tiền nuôi cấy trong thời gian 4 ngày sẽ giúp gia tăng khả năng phát sinh chồi (47,49%).

Môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin có bổ sung 30% nước dừa cho thấy khả năng tái sinh cao nhất, đạt 52,95%, số chồi đạt 52,33 chồi/1 g cuộn lá non.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài "Nghiên cứu tạo cây mía kháng bộ hung sử dụng công nghệ gen" (mã số C.2020-SP2-04). Tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.N. Vinh (2006), *Applied Plant Cell Technology*, Agriculture Publishing House (in Vietnamese).
- [2] R. Kaur, M. Kapoor (2016), "Plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane", *Sugar Tech.*, **18**, pp.93-99.
- [3] J.Y. Hoarau, L. Grivet, B. Offmann, et al. (2002), "Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). II. Detection of QTLs for yield components", *Theor. Appl. Genet.*, **105**(6), pp.1027-1037.
- [4] R. Gill, P.K. Malhotra, S.S. Gosal (2006), "Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane", *Plant Cell, Tis. and Org. Cul.*, **84**(2), pp.227-231.
- [5] P. Lakshmanan, R.J. Geijskes, K.S Aitken (2005), "Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities", *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, **41**, pp.345-363.
- [6] R.B. McQualter, B.F. Chong, K. Meyer, et al. (2005), "Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid", *Plant Biotechnol. J.*, **3**, pp.29-41, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2004.00095.x.
- [7] L.A. Petrasovits, R.B.M. Qualter, K. Leigh, et al. (2013), "Chemical inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase as a strategy to increase polyhydroxybutyrate yields in transgenic sugarcane", *Plant Biotechnol. J.*, **11**, pp.1146-1151, DOI: 10.1111/pbi.12109.
- [8] S. Raghavi, R. Sindhu, P. Binod, et al. (2015), "Development of a novel sequential pretreatment strategy for the production of bioethanol from sugarcane trash", *Bioresour. Technol.*, **199**, pp.202-210, DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.062.
- [9] M. Zhang, X. Zhuo, J. Wang, et al. (2015), "Effective selection and regeneration of transgenic sugarcane plants using positive selection system", *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, **51**, pp.52-61.
- [10] W. Yao, M. Ruan, L. Qin, et al. (2017), "Field performance of transgenic sugarcane lines resistant to sugarcane mosaic virus", *Frontiers in Plant Sci.*, **8**, DOI: 10.3389/fpls.2017.00104.
- [11] L. Wang, X. Shi, J. Zhang, et al. (2020), "Lightweight and robust rGO/sugarcane derived hybrid carbon foams with outstanding EMI shielding performance", *J. Mater. Res. Technol.*, **52**, pp.119-126, DOI: 10.1016/j.jmst.2020.03.029.
- [12] T. Kumar, Uzma, M.R. Khan, et al. (2014), "Genetic improvement of sugarcane for drought and salinity stress tolerance using Arabidopsis vacuolar pyrophosphatase (AVP1) gene", *Mol. Biotechnol.*, **56**(3), pp.199-209.
- [13] V.Y. Patade, P. Suprasanna (2006), "Advances in the development of *in vitro* culture systems and transgenics in sugarcane", *Int. Symp. Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries*, pp.629-636.
- [14] S. Biradar, D.P. Biradar, V.C. Patil, et al. (2009), "In vitro plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane", *Karnataka IJAAS*, **22**(1), pp.21-24.
- [15] S. Mayavan, K. Subramanyam, M. Arun, et al. (2013), "Agrobacterium tumefaciens - mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane", *Plant Cell Rep.*, **32**(10), pp.1557-1574.a

Đánh giá đất đai phục vụ quy hoạch phát triển bền vững một số cây công nghiệp lâu năm chủ lực vùng Tây Nguyên

Nguyễn Thị Thuỷ¹, Hoàng Thị Huyền Ngọc^{1*}, Nguyễn Mạnh Hà^{1,2}, Nguyễn Thanh Bình¹,
Nguyễn Ngọc Thắng¹, Nguyễn Công Long¹, Hoàng Quốc Nam¹

¹Viện Địa lý, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/8/2021; ngày chuyển phản biện 30/8/2021; ngày phản biện 29/9/2021; ngày chấp nhận đăng 4/10/2021

Tóm tắt:

Tây Nguyên là vùng sản xuất nông nghiệp lớn của Việt Nam với các nông sản chủ lực như cà phê, hồ tiêu, cao su. Tuy nhiên, phát triển nông nghiệp của vùng đang phải đối mặt với nhiều thách thức từ chính sự phát triển ồ ạt các cây công nghiệp này. Đặc biệt, sự suy giảm các nguồn tài nguyên tự nhiên (đất, nước, rừng) do khai thác quá mức để mở rộng diện tích sản xuất và sự gia tăng các tác động tiêu cực do biến đổi khí hậu (BĐKH) đã và đang tác động mạnh tới sản xuất nông nghiệp. Do đó, đánh giá thích hợp đất đai nhằm rà soát, điều chỉnh, ổn định diện tích các vùng chuyên canh theo các lợi thế tự nhiên đặc thù và thích ứng với BĐKH được cho là cách tiếp cận khả thi để giải quyết vấn đề này. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định những vùng đất trồng thích hợp cho nhóm cây công nghiệp chủ lực (cà phê, hồ tiêu, cao su) ở vùng Tây Nguyên. Mô hình tích hợp ALES (Automated land evaluation system) - GIS (hệ thống thông tin địa lý) với 13 chỉ tiêu đã được sử dụng để đánh giá thích hợp đất đai cho các loại cây trồng dưới khía cạnh sinh thái và môi trường. Kết quả cho thấy, diện tích đất cấp rất thích hợp (S1) và thích hợp (S2) đối với cây cà phê vối chiếm 23,7%, cà phê chè 4,4%, hồ tiêu 29,3%, cao su 18,5% diện tích đất tự nhiên (DTĐTN) toàn vùng. Kết quả đánh giá góp phần cung cấp cơ sở khoa học để định hướng sử dụng đất (LUT) đến năm 2030 phục vụ quy hoạch phát triển bền vững vùng Tây Nguyên, trong đó diện tích đất trồng cà phê ổn định còn 432.775,9 ha (cà phê vối 369.357,6 ha, cà phê chè 63.418,3 ha), đất trồng hồ tiêu 80.589,5 ha và cao su là 247.621,0 ha.

Từ khóa: ALES, cây công nghiệp lâu năm, đánh giá đất đai, GIS, sử dụng đất.

Chỉ số phân loại: 4.7

1. Đặt vấn đề

Phát triển cây công nghiệp lâu năm là thế mạnh của nông nghiệp Tây Nguyên để phục vụ nhu cầu nguyên liệu cho công nghiệp chế biến và xuất khẩu. Trong đó, cà phê, hồ tiêu và cao su là 3 cây công nghiệp lâu năm chủ lực có diện tích lớn nhất vùng (952.985 ha, chiếm 66,9% diện tích cây lâu năm). Với diện tích đất trồng cà phê chiếm 92,3%, hồ tiêu 63,5% và cao su 25,4% diện tích của cả nước, Tây Nguyên hiện là vùng chuyên canh cà phê và hồ tiêu lớn nhất nước, vùng cao su lớn thứ hai sau Đông Nam Bộ [1, 2]. Tính trong 30 năm (1990-2019), diện tích đất trồng nhóm cây công nghiệp thế mạnh này của vùng đã tăng gấp hơn 4 lần (tương ứng 723.085 ha) [1, 3]. Tuy nhiên, việc liên tục mở rộng diện tích đất trồng nhóm cây công nghiệp này đã và đang dẫn đến nhiều hệ lụy nghiêm trọng cho phát triển nông nghiệp bền vững ở Tây Nguyên như: gia tăng tình trạng chuyển đổi và xâm lấn đất rừng trái phép để mở rộng diện tích canh tác, gia tăng các quá trình thoái hoá đất (xói mòn, rửa trôi, suy giảm độ phì...) do trồng trên những vùng đất không thích hợp (N), suy giảm nguồn nước mặt và ngầm... [3-6]. Đồng thời, trong những năm gần đây, BĐKH đã làm cho khí hậu ở Tây Nguyên diễn biến ngày càng phức tạp và gây ra nhiều tác động bất lợi đối với sản xuất nông nghiệp như: quy luật phân bố mưa bị thay đổi, thiên tai, đặc biệt là hạn hán xảy ra ngày càng thường xuyên, nghiêm trọng hơn cả về quy mô và cường độ [7]. Thực tiễn trên cho thấy, giải pháp hàng đầu để phát triển bền vững nhóm cây công nghiệp (cà phê, hồ tiêu, cao su) của vùng là cần nhanh chóng rà soát, điều chỉnh quy hoạch LUT

sản xuất nhóm cây trồng này theo hướng phân bố các vùng sản xuất nông nghiệp với lợi thế đặc thù (đất, nước, khí hậu), trên nguyên tắc khai thác hiệu quả, bền vững các lợi thế đó và thích ứng với BĐKH.

Đánh giá đất đai là phần cốt lõi, cung cấp cơ sở khoa học cho việc lập quy hoạch LUT [8, 9]. Hiện nay, khung hướng dẫn đánh giá đất đai của FAO được vận dụng và chấp nhận là phương pháp tốt nhất để đánh giá đất đai ở Việt Nam cũng như nhiều quốc gia khác trên thế giới [10-12]. Về mặt kỹ thuật, đã có nhiều phần mềm được sử dụng để đánh giá mức độ thích hợp đất đai đối với các loại LUT dựa trên khung hướng dẫn của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên hợp quốc (FAO) [12, 13]. Trong đó, ALES là một trong những phần mềm đã được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới cũng như ở Việt Nam [14]. Do ALES chỉ xử lý các dữ liệu thuộc tính nên thường được tích hợp với GIS để thực hiện những phân tích về không gian và biểu diễn các bản đồ trong quá trình đánh giá đất đai [10, 11, 13].

Bài báo mô tả việc đánh giá mức độ thích hợp đất đai và đề xuất định hướng LUT phục vụ quy hoạch phát triển bền vững cho nhóm cây công nghiệp lâu năm chủ lực là cà phê, hồ tiêu và cao su ở vùng Tây Nguyên bằng mô hình tích hợp ALES-GIS.

2. Cơ sở dữ liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Cơ sở dữ liệu

Bộ dữ liệu để đánh giá đất đai bao gồm các dữ liệu không gian địa lý và thông tin mô tả. Tổng cộng có 5 nhóm đặc điểm đất đai (LC) và chất lượng đất đai (LQ) được chọn làm lớp đầu vào cho quá

*Tác giả liên hệ: Email: ngoc.hoanghuyen@gmail.com

Land suitability evaluation for sustainable development planning major perennial industrial crops in the Central Highlands

Thi Thuy Nguyen¹, Thi Huyen Ngoc Hoang^{1*},
Manh Ha Nguyen^{1,2}, Thanh Binh Nguyen¹,
Ngoc Thang Nguyen¹, Cong Long Nguyen¹,
Quoc Nam Hoang¹

¹Institute of Geography, VAST,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, VAST,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 25 August 2021; revised 29 September 2021; accepted 4 October 2021

Abstract:

The Central Highlands is a major agricultural production region of Vietnam with essential agricultural products such as coffee, pepper, and rubber. However, the agricultural development of the region is currently facing many challenges from the massive development of these industrial crops. The cause is the decline of natural resources (land, water, forest) due to over-exploitation to expand production area and the increase in negative impacts of climate change on agricultural cultivation. Therefore, land suitability assessment to monitor, adjust and stabilize the specialized farming areas according to specific natural advantages and adapt to climate change is considered as a feasible approach to solve these problems. This study was carried out to identify suitable planting areas for essential industrial crops (coffee, pepper, rubber) in the Central Highlands. ALES-GIS integrated model with 13 criteria was used to assess the suitability of land for crops in terms of ecology and environment. The study results showed that the very suitable area (S1) and moderately suitable area (S2) of coffee robusta accounted for 23.7%, coffee arabica accounted for 4.4%, pepper accounted for 29.3%, rubber accounted for 18.5% of the whole region land area. The assessment results have contributed to providing a scientific basis for orienting land use to 2030 for sustainable development in the Central Highlands, in which the coffee area is 432,775.9 ha (369,357.6 ha for coffee robusta and 63,418.2 ha for coffee arabica), pepper cultivation is 80,589.5 ha, and rubber plantation is 247,621.0 ha.

Keywords: ALES, GIS, land evaluation, land use, perennial industrial crop.

Classification number: 4.7

trình xác định mức độ thích hợp đất đai đối với các cây cà phê vối, cà phê chè, hồ tiêu và cao su vùng Tây Nguyên như sau:

Dữ liệu đất: Các thông số về loại đất, độ dày tầng đất và thành phần cơ giới được chiết tách từ bản đồ đất vùng Tây Nguyên tỷ lệ 1/250.000 theo hệ thống phân loại phát sinh đất của Việt Nam năm 2005.

Dữ liệu địa hình: Các thông số về độ dốc và độ cao tuyệt đối được chiết tách từ mô hình số độ cao ASTER, độ phân giải 30 m.

Dữ liệu khí hậu: Các thông số về nhiệt độ (trung bình năm, cao nhất trung bình năm), lượng mưa (trung bình năm, trung bình thời kỳ phân hoá mùa hoa - tháng 1 và 2) và số tháng hạn được xác lập bởi Phòng Địa lý Khí hậu - Viện Địa lý năm 2019 dựa trên chuỗi số liệu quan trắc tại 16 trạm khí tượng thuộc khu vực Tây Nguyên và 20 trạm lân cận Tây Nguyên; số liệu mưa của 30 trạm thủy văn và đo mưa thuộc khu vực Tây Nguyên trong thời gian 40 năm (1980-2019).

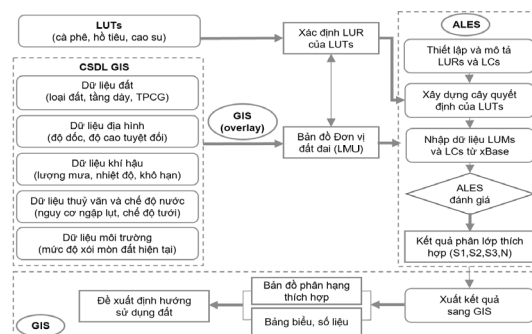
Dữ liệu thủy văn và chế độ nước: Thông số về nguy cơ ngập lụt được chiết tách từ bản đồ nguy cơ ngập lụt do mưa lũ vùng Tây Nguyên tỷ lệ 1/250.000; thông số về chế độ tưới được thành lập từ bản đồ mạng lưới thủy văn và địa chất thủy văn vùng Tây Nguyên cùng tỷ lệ 1/250.000 [6].

Dữ liệu môi trường: Thông số về mức độ xói mòn đất hiện tại được tính toán từ các dữ liệu đầu vào đến năm 2019, dựa trên bản đồ xói mòn đất hiện tại vùng Tây Nguyên tỷ lệ 1/250.000 thành lập theo phương trình mất đất phổ dụng (USLE) của Wischmeier và Smith (2015) [5]. Các lớp bản đồ chỉ số được cập nhập giá trị trong phương trình tính toán xói mòn gồm R, LS, C và P.

Ngoài ra, nghiên cứu đã sử dụng hiện trạng đất trồng cây cà phê, hồ tiêu và cao su của bản đồ LUT sản xuất nông nghiệp vùng Tây Nguyên tỷ lệ 1/250.000 (được thành lập từ ảnh vệ tinh Landsat 8 OLI năm 2019).

2.2. Phương pháp

Nghiên cứu sử dụng phương pháp đánh giá đất đai theo hướng dẫn của FAO trên nền tảng các phần mềm ALES và GIS, tuy nhiên giới hạn trong đánh giá thích hợp dưới khía cạnh sinh thái nông nghiệp và môi trường. Phần mềm ALES được sử dụng là phiên bản 4.65 được cài đặt và chạy trên Window 7 (32 bit), các phần mềm GIS là Mapinfo 12.0 và ArcGIS 10.2. Các bước tiến hành được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Quy trình đánh giá đất đai nhóm cây công nghiệp lâu năm vùng Tây Nguyên. LUTs: các loại sử dụng đất đai; TPCG: thành phần cơ giới; LUR: yêu cầu sử dụng đất đai; LMU: bản đồ đơn vị đất đai; LCs: các đặc điểm đất đai; LQs: chất lượng đất đai.

Bước 1: Xác định vùng đánh giá và LUT, thu thập cơ sở dữ liệu GIS về LC và LQ, gồm các dữ liệu về đất, địa hình, khí hậu, thủy văn, chế độ nước và môi trường.

Bước 2: Xác định yêu cầu LUR của LUTs.

Bước 3: Phân cấp và xây dựng các lớp bản đồ thuộc tính đất đai LCs và LQs (loại đất, tầng dày, thành phần cơ giới, độ dốc, lượng mưa, xói mòn đất...). Chồng xếp các lớp bản đồ thuộc tính để xây dựng LMU.

Bước 4: Trong ALES, thiết lập LURs và mô tả LCs, LQs tương ứng với thuộc tính của LUT và LMU. Xây dựng cây quyết định cho LURs của LUTs.

Bước 5: Nhập dữ liệu LMUs và giá trị LCs, LQs từ xBase vào ALES. ALES tính toán thích hợp cho các LMU. Kết quả được hiển thị dưới dạng các lớp thích hợp.

Bước 6: Xuất kết quả đánh giá từ ALES trong các trường dữ liệu LMU sang GIS và thành lập bản đồ đánh giá thích hợp đất đai, tính toán diện tích các cấp thích hợp của từng LUT.

Bước 7: Chồng xếp các bản đồ phân hạng thích hợp đất đai với bản đồ hiện trạng LUT sản xuất nông nghiệp, kết hợp phân tích các quy hoạch và kế hoạch có liên quan của vùng, đề xuất định hướng LUT cho các khu vực.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Yêu cầu sinh thái của cây cà phê, hồ tiêu và cao su vùng Tây Nguyên

Các chỉ tiêu đánh giá mức độ thích hợp đất đai được lựa chọn và phân cấp dựa trên yêu cầu sinh thái của các loại cây trồng. Các yêu cầu này được xác định theo tài liệu của C. Sys và cs (1993) [15], được cập nhật từ các kết quả nghiên cứu có liên quan [3, 11, 16], điều chỉnh phù hợp với điều kiện tự nhiên và tác động của BĐKH đến sản xuất nông nghiệp (lượng mưa, nhiệt độ, ngập lụt và khô hạn) trong giai đoạn 1980-2019 ở khu vực nghiên cứu. Tổng hợp 13 chỉ tiêu thuộc 5 tiêu chí và phân cấp cho đánh giá thích hợp đất đai đối với các cây cà phê vối, cà phê chè, hồ tiêu và cao su ở vùng Tây Nguyên (bảng 1).

Trong đó: tiêu chí đất (loại đất, tầng dày đất, thành phần cơ giới) được lựa chọn để đánh giá sự phù hợp về khả năng sinh trưởng, khả năng giữ và cung cấp không khí, nước và các chất dinh dưỡng của đất.

Tiêu chí địa hình (độ dốc, độ cao tuyệt đối) đánh giá sự phù hợp về khả năng tiếp cận địa hình, khả năng quản lý và mức độ phát triển của các công trình cơ sở hạ tầng nông nghiệp.

Bảng 1. Chỉ tiêu đánh giá thích hợp đất đai đối với cây cà phê vối, cà phê chè, hồ tiêu và cao su vùng Tây Nguyên.

LUTs	Chỉ tiêu	Mức độ thích hợp/hạn chế	Rất thích hợp (S1)	Thích hợp (S2)	Ít thích hợp (S3)	Không thích hợp (N)
Cây cà phê vối	Đất					
	Loại đất	Fk, Fu	Ru, Rk, Fd, Fs, Fe, Fq, Fp, X, Xa	Pbc, Pc, Pf, Py, B, Ba, Fa	D, J, Xk, Fl, Pg, A, E, Hk, Hs, Ha	
	Độ dày tầng đất (cm)	>100	-	50-100	<50	-
	Thành phần cơ giới	c, d	b	-	-	-
	Địa hình					
	Độ dốc (°)	0-8	8-15	15-25	>25	-
	Độ cao tuyệt đối (m)	300-800	800-1.000	1.000-1.200, <300	>1.200	-
	Khí hậu					
	Lượng mưa TBN (mm)	>1.600-2.400	1.200-1.600, >2.400	-	<1.200	-
	Lượng mưa trung bình thời kỳ phân hóa mầm hoa (mm)	0-60	> 60	-	-	-
Cây cà phê chè	Nhiệt độ cao nhất TBN (°C)	>26	24-26	22-24	<22	-
	Nhiệt độ TBN (°C)	>22	20-22	18-20	<18	-
	Số tháng hạn	<3	3-4	4-5	>5	-
	Thủy văn và chế độ nước					
	Điều kiện tưới	I2	I1	-	I3	-
	Nguy cơ ngập lụt	F2	-	-	F1	-
	Môi trường					
	Mức độ xói mòn đất hiện tại	E1	E2	E3	E4	-
	Đất					
	Loại đất	Fk, Fu	Ru, Rk, Fd, Fs, Fe, Fq, Fp, X, Xa	Pbc, Pc, Pf, Py, B, Ba, Fa, Hk, Hs, Ha	D, J, Xk, Fl, Pg, A, E	-
Cây hồ tiêu	Độ dày tầng đất (cm)	>100	-	50-100	<50	-
	Thành phần cơ giới	c, d	b	-	-	-
	Địa hình					
	Độ dốc (°)	0-8	8-15	15-25	>25	-
	Độ cao tuyệt đối (m)	900-1.500	800-900	600-800, 1.500-2.000	<600, >2.000	-
	Khí hậu					
	Lượng mưa TBN (mm)	1.200-2.000	2.000-2.400, 1.000-1.200	>2.400	-	-
	Lượng mưa trung bình thời kỳ phân hóa mầm hoa (mm)	0-60	>60	-	-	-
	Nhiệt độ cao nhất TBN (°C)	22-28	28-30, 20-22	30-32, 18-20	>32, <18	-
	Nhiệt độ TBN (°C)	16-22	22-24	24-26	>26	-
Cây cao su	Số tháng hạn	<4	4-5	>5-6	-	-
	Thủy văn và chế độ nước					
	Điều kiện tưới	I2	I1	-	I3	-
	Nguy cơ ngập lụt	F2	-	-	F1	-
	Môi trường					
	Mức độ xói mòn đất hiện tại	E1	E2	E3	E4	-
	Đất					
	Loại đất	Fk, Fu, Fd, Fs, Fe, Ru, Rk	X, Xa, B, Ba, Fq, Fp, Fa	Pbc, Pc, Pf, Py, B, Ba, Fa	Pg, Fl, D, J, Xk, Hk, Hs, Ha, A, E	-
	Độ dày tầng đất (cm)	>100	-	50-100	<50	-
	Thành phần cơ giới	c, d	b	-	-	-
Cây cao su	Địa hình					
	Độ dốc (°)	0-8	8-15	15-25	>25	-
	Độ cao tuyệt đối (m)	<600	600-700	700-800	>800	-
	Khí hậu					
	Lượng mưa TBN (mm)	>1.600	1.200-1.600	-	<1.200	-
	Nhiệt độ TBN (°C)	>22	20-22	18-20	<18	-
	Nhiệt độ cao nhất TBN (°C)	>26	24-26	22-24	<22	-
	Số tháng hạn	<3	3-4	4-5	>5	-
	Thủy văn và chế độ nước					
	Điều kiện tưới	F2	-	-	F1	-
Cây cao su	Nguy cơ ngập lụt	F2	-	-	F1	-
	Môi trường					
	Mức độ xói mòn đất hiện tại	E1	E2	E3	E4	-

TBN: trung bình năm; b: nhẹ; c: trung bình; d: nặng; I1: tưới nước mặt thuận lợi; I2: tưới nước ngầm thuận lợi; I3: dựa vào nước mưa; F1: vùng có nguy cơ ngập lụt; F2: vùng không có nguy cơ ngập; E1: không hoặc xói mòn nhẹ (lượng đất mất <5 tấn/ha/năm); E2: xói mòn trung bình (lượng đất mất 5-10 tấn/ha/năm); E3: xói mòn mạnh (lượng đất mất 10-50 tấn/ha/năm); E4: xói mòn rất mạnh (lượng đất mất >50 tấn/ha/năm); S3: ít thích hợp. Fk: đất nâu đỏ trên đá macma bazơ và trung tính; Fu: đất nâu vàng trên đá macma bazơ và trung tính; Fd: đất đỏ vàng trên đá macma bazơ và trung tính; Fs: đất đỏ vàng trên đá phiến sét và biến chất; Fe: đất nâu tím trên trầm tích lục nguyên; Ru: đất nâu thẫm trên sản phẩm phong hóa của đá bọt và bazan; Rk: đất đen trên sản phẩm bồi tụ của đá bazan; X: đất xám trên phù sa cổ; Xa: đất xám trên đá macma axit; Xk: đất xám trên đá macma bazơ; B: đất xám bạc màu trên phù sa cổ; Ba: đất xám bạc màu trên đá macma axit; Fq: đất vàng nhạt trên cát; Fp: đất nâu vàng trên phù sa cổ; Fa: đất vàng đỏ trên đá macma axit; Fl: đất đỏ vàng biến đổi do trồng lúa; Hk: đất mùn nâu đỏ trên đá macma bazơ và trung tính; Hs: đất mùn đỏ vàng trên đá sét và biến chất; Ha: đất mùn vàng đỏ trên đá macma axit; D: đất thung lũng do sản phẩm dốc tụ; J: đất lầy thụt; Pbc: đất phù sa được bồi chua; Pc: đất phù sa không được bồi chua; Pf: đất phù sa có tầng loang lổ đỏ vàng; Py: đất phù sa ngòi suối; Pg: đất phù sa lầy; A: đất mùn alit núi cao; E: đất xói mòn tro sỏi đá.

Tiêu chí khí hậu (nhiệt độ trung bình năm, nhiệt độ cao nhất trung bình năm, lượng mưa trung bình năm, số tháng hạn) ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình phát triển, năng suất và chất lượng thu hoạch. Đặc biệt, đối với cây cà phê có một chỉ tiêu khí hậu quan trọng, quyết định tỷ lệ đậu quả là lượng mưa trung bình thời kỳ phân hoá mầm hoa (tháng 1 và 2), đây là thời kỳ cuối và sau vụ thu hoạch, yêu cầu một mùa khô hạn ngắn với lượng mưa trung bình <60 mm/tháng thì thuận lợi cho quá trình phân hóa mầm hoa của cây cà phê.

Tiêu chí thủy văn và chế độ nước (nguy cơ ngập lụt, điều kiện tưới) ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng và năng suất thu hoạch của các LUT vùng Tây Nguyên do điều kiện phân hóa mùa mưa - mùa khô sâu sắc và yêu cầu cung cấp nước tưới của các LUT, trong đó nước ngầm là nguồn nước tưới quan trọng cho các cây công nghiệp lâu năm (cà phê, hồ tiêu).

Tiêu chí môi trường (mức độ xói mòn đất hiện tại) đánh giá sự phù hợp về khả năng bảo vệ đất của loại hình LUT.

3.2. Xây dựng LMU

LMU vùng Tây Nguyên được xây dựng bằng phương pháp chồng ghép các lớp bản đồ chuyên đề của 13 chỉ tiêu đã lựa chọn. Mỗi LMU chứa các thuộc tính đất đai (LCs và LQs) thể hiện trong các lớp bản đồ chuyên đề và phân biệt với các đơn vị khác bởi sự khác biệt của ít nhất một chỉ tiêu.

Kết quả đã tổng hợp được 13.429 LMU, trong đó LMU có diện tích lớn nhất là 5.006,0 ha và nhỏ nhất 5,0 ha.

3.3. Kết quả đánh giá thích hợp đất đai

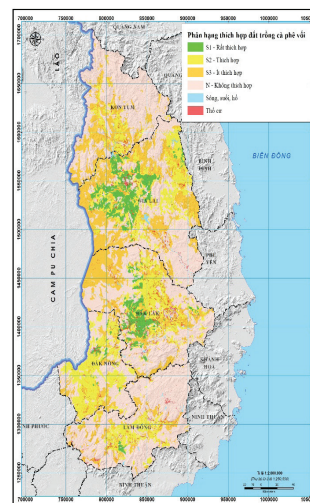
Cây cà phê vối: Có diện tích S1 chiếm 5,4% và S2 chiếm 18,3% DTĐTN (bảng 2, hình 2), phân bố tập trung trên các cao nguyên bazan của vùng. Diện tích S3 chiếm 23,3% DTĐTN, phân bố chủ yếu trên các vùng núi thấp ở Kon Tum và vùng bán bình nguyên phía tây Gia Lai, Đắk Lắk, hạn chế chính là độ dốc và tầng dày đất. Diện tích N chiếm 53,0% DTĐTN, hạn chế chính là độ dốc, độ cao địa hình và mức độ xói mòn đất hiện tại.

Cây cà phê chè: Có diện tích S1 chiếm 0,4% và S2 chiếm 4,0% DTĐTN, phân bố chủ yếu trên khu vực cao nguyên bazan cao hơn ở Lâm Đồng, Đắk Nông, Gia Lai (bảng 2, hình 3). Diện tích S3 chiếm 18,9% DTĐTN, phân bố chủ yếu trên các cao nguyên bazan thấp hơn ở Gia Lai, Đắk Lắk và các vùng núi thấp ở Kon Tum, hạn chế chính là độ dốc, độ cao địa hình. Diện tích N chiếm 76,7% DTĐTN, hạn chế chính là độ dốc, tầng dày đất, mức độ xói mòn đất hiện tại.

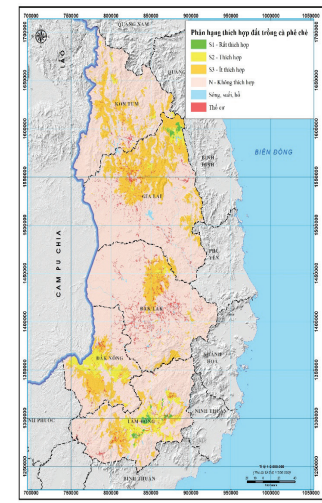
Bảng 2. Kết quả phân hạng thích hợp đất đai cho các loại LUT.

Mức độ thích hợp	Cà phê vối		Cà phê chè		Hồ tiêu		Cao su	
	Diện tích (ha)	Tỷ lệ (%)	Diện tích (ha)	Tỷ lệ (%)	Diện tích (ha)	Tỷ lệ (%)	Diện tích (ha)	Tỷ lệ (%)
S1	290.068,2	5,4	21.297,7	0,4	340.279,7	6,3	283.758,6	5,3
S2	984.621,5	18,3	215.557,8	4,0	1.232.169,3	22,9	707.301,8	13,2
S3	1.248.906,6	23,3	1.014.852,8	18,9	1.518.303,7	28,3	1.158.532,1	21,6
N	2.846.826,1	53,0	4.118.714,1	76,7	2.279.669,7	42,4	3.220.829,9	60,0
Tổng DTĐTN	5.370.422,4	100,0	5.370.422,4	100,0	5.370.422,4	100,0	5.370.422,4	100,0

S1: rất thích hợp; S2: thích hợp; S3: ít thích hợp; N: không thích hợp.



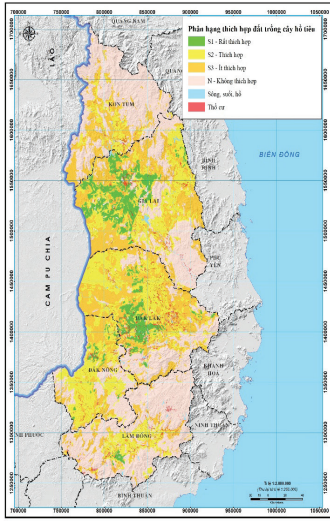
Hình 2. Bản đồ phân hạng thích hợp đất đai cho cây cà phê vối.



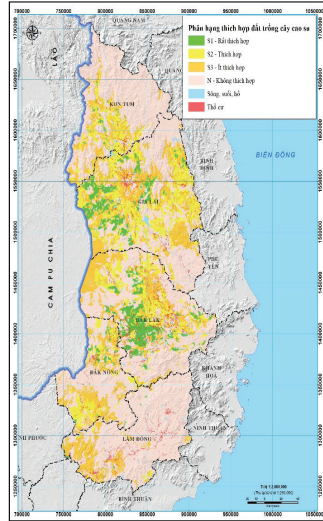
Hình 3. Bản đồ phân hạng thích hợp đất đai cho cây cà phê chè.

Cây hồ tiêu: Có diện tích S1 chiếm 6,3% và S2 chiếm 22,9% DTĐTN, phân bố chủ yếu trên các cao nguyên bazan của vùng (bảng 2, hình 4). Diện tích S3 chiếm 28,3% DTĐTN, phân bố chủ yếu trên các vùng núi thấp ở Kon Tum, Gia Lai và vùng bán bình nguyên phía tây Gia Lai, Đắk Lắk, hạn chế chính là độ dốc, tầng dày đất. Diện tích N chiếm 42,4% DTĐTN, hạn chế chính là độ dốc và mức độ xói mòn đất hiện tại.

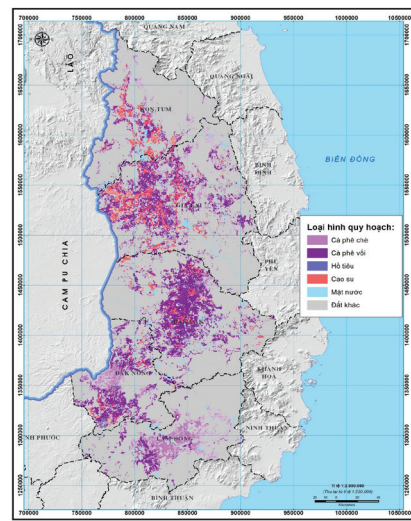
Cây cao su: Có diện tích S1 chiếm 5,3% và S2 chiếm 13,2% DTĐTN, phân bố chủ yếu trên các cao nguyên bazan ở Gia Lai, Đắk Lắk và vùng trũng giữa núi ở Kon Tum (bảng 2, hình 5). Diện tích S3 chiếm 21,6% DTĐTN, phân bố chủ yếu ở các cao nguyên bazan ở Đắk Nông và Lâm Đồng, bán bình nguyên phía tây Gia Lai, Đắk Lắk và vùng núi thấp trong khu vực, hạn chế chính là độ cao, độ dốc, tầng dày đất. Diện tích N chiếm 60,0% DTĐTN, hạn chế chính là độ dốc, độ cao và mức độ xói mòn đất hiện tại.



Hình 4. Bản đồ phân hạng thích hợp đất đai cho cây hồ tiêu.



Hình 5. Bản đồ phân hạng thích hợp đất đai cho cây cao su.



Hình 6. Bản đồ định hướng LUT phục vụ quy hoạch phát triển bền vững nhóm cây công nghiệp lâu năm vùng Tây Nguyên.

3.4. Bàn luận

Dựa trên kết quả phân hạng thích hợp đất đai, hiện trạng LUT sản xuất nông nghiệp năm 2019 và các quy hoạch có liên quan [17-21], đề xuất định hướng LUT đến năm 2030 phục vụ quy hoạch phát triển bền vững nhóm cây cà phê, hồ tiêu và cao su của vùng được thể hiện ở bảng 3 và hình 6 cho thấy:

Đất trồng cà phê: Diện tích cà phê hiện đang trồng trên các LMU có mức S1 và S2 là 281.140,5 ha, S3 là 156.525,3 ha và N là 193.191,2 ha. Đề xuất ổn định diện tích đất trồng cà phê là 432.775,9 ha (chiếm 8,0% DTĐTN). Trong đó, đất trồng cà phê vối là 369.357,6 ha (chiếm 6,9% DTĐTN) chủ yếu tập trung trên các cao nguyên bazan của vùng, với diện tích lớn nhất ở Đắk Lắk (131.779 ha). Đất trồng cà phê chè là 63.418,3 ha (chiếm 1,2% DTĐTN), chủ yếu tập trung ở khu vực các cao nguyên bazan cao hơn và bình sơn nguyên ở phía nam vùng, với diện tích lớn nhất ở Lâm Đồng (33.187,3 ha). Điều chuyển giảm 198.081,2 ha trên các LMU có mức S3 hoặc N (do yếu tố hạn chế chính là độ dốc địa hình và điều kiện tưới) sang cây lâu năm khác (14.776,7 ha) và trồng rừng (183.304,5 ha).

Bảng 3. Đề xuất định hướng LUT phục vụ quy hoạch phát triển bền vững nhóm cây công nghiệp lâu năm vùng Tây Nguyên (đơn vị tính: ha).

LUTs	Kon Tum	Gia Lai	Đắk Lắk	Đắk Nông	Lâm Đồng	Tổng diện tích đề xuất	Hiện trạng 2019	Tăng (+)/ giảm (-)
Cà phê chè	3.357,5	13.719,0	9.090,1	4.064,4	33.187,3	63.418,3	630.857,0	-198.081,2
Cà phê vối	25.712,9	122.737,5	131.779,0	64.001,3	25.126,9	369.357,6		
Hồ tiêu	-	13.754,8	33.433,6	33.105,0	296,1	80.589,5	87.500,0	-6.910,5
Cao su	50.964,2	126.845,8	49.345,5	19.860,2	605,3	247.621,0	234.628,0	12.993,0
Tổng cộng	80.034,6	277.057,1	233.648,2	121.030,9	59.215,6	760.986,3	952.985,0	191.998,7

Đất trồng hồ tiêu: Diện tích hồ tiêu hiện đang trồng trên các LMU có mức S1 và S2 là 65.898,7 ha, S3 là 18.547,5 ha và N là 3.053,7 ha. Đề xuất ổn định diện tích đất trồng hồ tiêu là 80.589,5 ha (chiếm 1,5% DTĐTN), phân bố chủ yếu trên các cao nguyên bazan của vùng, với diện tích lớn nhất ở Đắk Lắk (33.433,6 ha). Điều chuyển giảm 6.910,5 ha đất trồng hồ tiêu ở những vùng đất có tiềm năng đất đai ở mức S3 hoặc N (chủ yếu do độ dốc địa hình và điều kiện tưới) sang cây lâu năm khác (2.791,0 ha) và trồng rừng (4.119,5 ha).

Đất trồng cao su: Diện tích cao su hiện đang trồng trên các LMU có mức S1 và S2 là 110.115,4 ha, S3 99.867,0 ha và N là 24.645,6 ha. Đề xuất diện tích đất trồng cao su là 247.621,0 ha (chiếm 4,6% DTĐTN), phân bố chủ yếu trên các cao nguyên bazan thấp hơn và núi thấp ở phía bắc vùng, với diện tích lớn nhất ở Gia Lai (126.845,8 ha). Trong đó, giữ nguyên hiện trạng đất trồng cao su là 208.862,4 ha và giảm 25.765,6 ha đất trồng cao su sang trồng rừng ở các vùng đất có tiềm năng đất đai ở mức S3 hoặc N (chủ yếu do độ dốc địa hình lớn), đồng thời tăng thêm 38.758,6 ha đất trồng cao su từ đất đồi núi chưa sử dụng có tiềm năng đất đai ở S2 cho trồng cao su.

4. Kết luận và kiến nghị

Kết quả đánh giá thích hợp đất đai cho nhóm cây công nghiệp chủ lực (cà phê, hồ tiêu và cao su) vùng Tây Nguyên cho thấy, diện tích cấp S1 và S2 đối với cây cà phê vối chiếm 23,7% (1.274.689,7 ha), cà phê chè 4,4% (236.855,5 ha), hồ tiêu 29,3% (1.572.449,0 ha), cao su 18,5% (991.060,4) DTĐTN toàn vùng. Đối chiếu với diện tích hiện đang trồng nhóm cây này của vùng thì cà phê chiếm 44,6% (281.140,5 ha), hồ tiêu 75,3% (65.898,7 ha) và cao su 46,9% (110.115,4 ha) diện tích đang trồng trên những LMU có mức S1 và S2. Còn lại 24,8% (156.525,3 ha) diện tích cà phê, 21,2% (18.547,5 ha) diện tích

hồ tiêu, 42,6% (99.867 ha) diện tích cao su đang trồng trên những LMU có mức S3; có 30,6% (193.191,2 ha) diện tích cà phê, 3,5% (3.053,7 ha) diện tích hồ tiêu, 10,5% (24.645,6 ha) diện tích cao su đang được trồng trên những LMU N.

Kết quả đánh giá này cung cấp cơ sở khoa học để đề xuất định hướng LUT đến năm 2030 phục vụ quy hoạch phát triển bền vững nhóm cây trồng chủ lực này của vùng. Theo đó, đề xuất ổn định diện tích đất trồng cà phê là 432.775,9 ha (cà phê với 369.357,6 ha, cà phê chè 63.418,3 ha, giảm 198.081,2 ha), hồ tiêu 80.589,5 ha (giảm 6.910,5 ha) và cao su là 247.621,0 (tăng 12.993,0 ha).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu đã sử dụng một phần kết quả của Đề tài cấp quốc gia thuộc Chương trình KH&CN phục vụ xây dựng nông thôn mới giai đoạn 2016-2020 “Nghiên cứu thực trạng nông thôn Tây Nguyên và đề xuất mô hình nông thôn mới theo các vùng địa lý sinh thái nhằm tạo sinh kế, thích ứng với BĐKH và phát triển nông nghiệp bền vững” giao cho Viện Địa lý chủ trì thực hiện từ năm 2019. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Statistics Office of 5 provinces of Kon Tum, Gia Lai, Dak Lak, Dak Nong, Lam Dong (2020), Statistical Yearbook of Kon Tum, Gia Lai, Dak Lak, Dak Nong, Lam Dong provinces in 2019 (in Vietnamese).
- [2] General Statistics Office (2020), Vietnam Statistical Yearbook 2019 (in Vietnamese).
- [3] V.N. Dung, P.C. Tri, D.V. Chung, et al. (2015), Research on Assessing and Synthesizing The Situation and Proposing Solutions for Sustainable Development of Industrial Crops and Food Crops in The Central Highlands, State-level project synthesis report under the Central Highlands Program 3 (code TN3/T28) (in Vietnamese).
- [4] D.V. Tuyen, B.T.M. Nguyet, N. Khang, et al. (2019), “Current situation of agricultural production on forestry land in the Central Highlands”, Journal of Agriculture and Rural Development, **13**, pp.51-158 (in Vietnamese).
- [5] L.T. Anh (2015), Integrated Study on Land Degradation and Desertification in The Central Highlands and Proposed Solutions for Sustainable Land Use, State-level Project Synthesis Report Under The Central Highlands Program 3 (code TN3/T01) (in Vietnamese).
- [6] N.L. Dan, H.T. Son, N.T. Hieu, et al. (2015), Research on The Scientific Basis for The Overall Solution to Resolve Conflicts of Interest in The Exploitation and Use of Water Resources in The Central Highlands Territory, General Report on State-level Projects Under The Central Highlands Program 3 (code TN3/T02) (in Vietnamese).
- [7] H.D. Cuong, V.V. Thang, N.V. Thang, et al. (2015), *Study on Climatic Conditions, Agricultural Climate for Socio-economic Development and Disaster Prevention in The Central Highlands, State-level Project Summary Report Under The Central Highlands Program 3 (code TN3/T25)* (in Vietnamese).
- [8] FAO (1976), *A Framework for Land Evaluation*.
- [9] FAO (2007), *Land Evaluation: Towards a Revised Framework*, FAO Land and Water Discussion.
- [10] L.T. Dat, V.N. Dung, B.T.N. Dung, et al. (2015), *Handbook of Survey, Classification, Soil Mapping and Land Assessment, Agricultural Publishing House* (in Vietnamese).
- [11] N.T. Thuy (2020), Research on Geographical Basis in Land Exploitation and Use for Sustainable Planning in Da Lat City and Surrounding Areas, Lam Dong Province, PhD Thesis in Geography, Academy of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology (in Vietnamese).
- [12] R. Herzberg, T.G. Pham, M. Kappas, et al. (2019), “Multi-criteria decision analysis for the land evaluation of potential agricultural land use types in a hilly area of central Vietnam”, *Land* **2019**, **8**, DOI: 10.3390/land8060090.
- [13] H. Nguyen, T. Nguyen, N. Hoang, et al. (2020), “The application of LSE software: A new approach for land suitability evaluation in agriculture”, *Computers and Electronics in Agriculture*, **173**, DOI: 10.1016/j.compag.2020.105440.
- [14] D.G. Rossiter, A.R. Van Wambeke (2000), *Automated Land Evaluation System, Version 4.65 User's Manual*, Cornell University, USA.
- [15] C. Sys, E.V. Ranst, J. Debaveye, et al. (1993), *Land Evaluation Part 3 Crop Requirements*, Agricultural Publications, Brussels, Belgium, pp.13-128.
- [16] Ministry of Agriculture and Rural Development (2015), Technical Process of Planting, Caring for and Harvesting Pepper (in Vietnamese).
- [17] Ministry of Agriculture and Rural Development (2012), Explanatory Report on The Master Plan for Development of The Country's Agricultural Sector to 2020 and Vision to 2030 (in Vietnamese).
- [18] Ministry of Agriculture and Rural Development (2012), Decision No. 1987/QĐ-BNN-TT dated 21/8/2012 Approving The Development Planning of Vietnam Coffee Industry to 2020, Vision to 2030 (in Vietnamese).
- [19] Ministry of Agriculture and Rural Development (2014), Decision No. 1442/QĐ-BNN-TT dated 27/6/2014 Approving The Planning for Development of Vietnam Pepper Industry to 2020, Vision to 2030 (in Vietnamese).
- [20] Prime Minister (2014), Decision No. 1194/QĐ-TTg dated 22/7/2014 Approving The Construction Planning for The Central Highlands Until 2030 (in Vietnamese).
- [21] Ministry of Agriculture and Rural Development (2018), Decision No. 4325/QĐ-BNN-TCTL dated 2/11/2018 Approving The Master Plan for Irrigation in The Central Highlands for The Period to 2030 and Vision to 2050 (in Vietnamese).

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài báo gửi đăng trên Tạp chí phải là bài báo nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài báo trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacaongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khi liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

3. Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phân kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện ^(1, 2, 3,...) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với một hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

- Lưu ý:
- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
 - Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
 - Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

Tập(số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang/số trang/trang đầu-trang cuối phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

Nếu có một số tài liệu tham khảo có cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: A. Amber (1982, p.39).

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng; kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của khoa học y - dược

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 64 - Number 5 - May 2022

So sánh kết quả xét nghiệm điện giải đồ trên hệ thống máy phân tích khí máu và hóa sinh tự động.

Nguyễn Thị Ngọc Lan, Vũ Văn Quý, Lê Hữu Lộc

Biểu hiện thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD20 (CD20-CAR) trên bề mặt tế bào Jurkat T và đánh giá hoạt tính sinh học của nó.

Võ Nguyễn Thanh Thảo, Chu Đào Xuân Trúc, Huỳnh Đàm Kim Tuyền, Phùng Thị Việt Anh, Nguyễn Đăng Quân

Điều trị bệnh Crohn ở trẻ em bằng adalimumab sau nhiễm Covid-19 tại Bệnh viện Nhi đồng 2: báo cáo một trường hợp.

Hà Văn Thiệu, Dương Châu Giang, Lê Thị Minh Hồng

Cao chiết Rau đắng biển (*Bacopa monnieri*) cải thiện hành vi tự kỷ theo cơ chế liên quan đến protein PTEN trên mô hình chuột thực nghiệm gây bởi muối natri valproat.

Phạm Thị Nguyệt Hằng, Phạm Anh Tùng, Trần Nguyên Hồng, Lê Thị Xoan, Nguyễn Thị Lập, Nguyễn Thị Hiền

Tối ưu hóa quy trình phun sấy hỗn dịch nano curcumin.

Phạm Đình Duy, Trần Quốc Thanh, Nguyễn Hoàng Tùng

Thành phần hóa học và khả năng kháng nấm *Malassezia* gây bệnh trên da người của tinh dầu Hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) trồng tại Hà Nội.

Trần Bảo Trâm, Đào Ngọc Anh, Trần Bình Minh, Đỗ Thị Kim Trang, Trần Văn Tuấn, Vũ Xuân Tạo

Thành phần loài và giá trị sử dụng cây thuốc theo kinh nghiệm của dân tộc Xinh Mun tại xã biên giới Phiêng Păn, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La.

Vũ Thị Liên, Ngô Hoàng Long, Lò Văn Loa, Lò Thị Bích Hậu

Khả năng ức chế *Helicobacter pylori* của một số mẫu cao chiết methanol từ thực vật thu tại tỉnh Lâm Đồng.

Phan Nhã Hòa, Phạm Bảo Yên

Đặc điểm di truyền ở bệnh nhân Covid-19: tình hình nghiên cứu, triển vọng và thách thức trong điều trị Covid-19.

Vũ Phương Nhung, Trần Thị Bích Ngọc, Nguyễn Đăng Tôn, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Thủy Dương, Nguyễn Quang Thạch, Nông Văn Hải, Nguyễn Hải Hà

Độc lực và ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên sự phát triển của *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá rô phi và biến đổi mô bệnh học trên cá nhiễm bệnh.

Đoàn Thị Ninh, Vũ Đức Mạnh, Nguyễn Thị Hương Giang, Đặng Thị Lua, Trương Đình Hoài

Nghiên cứu chất lượng nước và bệnh trong nuôi tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) áp dụng công nghệ Nanobubble.

Nguyễn Hữu Nghĩa, Nguyễn Đức Bình, Phạm Thái Giang, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Nguyên, Nguyễn Thị Hạnh, Phan Trọng Bình, Vũ Thị Kiều Loan, Phan Thị Vân

Đánh giá đáp ứng miễn dịch của các gia đình cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mũ và xác định các chỉ thị miễn dịch phục vụ chọn giống.

Trần Thị Phương Dung, Nguyễn Văn Sáng, Võ Hồng Phương, Trần Hữu Phúc, Huỳnh Thị Trúc Quân, Nguyễn Hữu Thịnh

Nghiên cứu sự tái sinh một bước *in vitro* của giống mía KK3 (*Saccharum officinarum* L.).

Phan Thị Thu Hiền

Đánh giá đất đai phục vụ quy hoạch phát triển bền vững một số cây công nghiệp lâu năm chủ lực vùng Tây Nguyên.

Nguyễn Thị Thủy, Hoàng Thị Huyền Ngọc, Nguyễn Mạnh Hà, Nguyễn Thanh Bình, Nguyễn Ngọc Thắng, Nguyễn Công Long, Hoàng Quốc Nam

1 Comparison of electrolyte test results on blood gas analyzer and automatic biochemistry analyzer.

Thi Ngoc Lan Nguyen, Van Quy Vu, Huu Loc Le

6 Expression of CD20-specific chimeric antigen receptor (CD20 - CAR) on Jurkat T cells and evaluation its biological activity.

Nguyen Thanh Thao Vo, Dao Xuan Truc Chu, Dam Kim Tuyen Huynh, Thi Viet Anh Phung, Dang Quan Nguyen

11 Treatment of Crohn's disease in children with adalimumab after being infected with SARS-CoV-2 at Children's Hospital No. 2: a case report.

Van Thieu Ha, Chau Giang Duong, Thi Minh Hong Le

15 *Bacopa monnieri* extract ameliorates core autistic behavioural deficits of sodium valproate-induced autism spectrum disorder in mice, and its mechanism of action related to PTEN protein.

Thi Nguyet Hang Pham, Anh Tung Pham, Nguyen Hong Tran, Thi Xoan Le, Thi Lap Nguyen, Thi Hien Nguyen

20 Optimisation of spray drying process parameters of curcumin nanosuspension.

Dinh Duy Pham, Quoc Thanh Tran, Hoang Tung Nguyen

26 Chemical components of *Ocimum sanctum* L. essential oil grown in Hanoi, Vietnam and its antifungal properties against dermatologic pathogen - *Malassezia*.

Bao Tram Tran, Ngoc Anh Dao, Binh Minh Tran, Thi Kim Trang Do, Van Tuan Tran, Xuan Tao Vu

31 Species composition and use value of medicinal plants according to the experience of Xinh Mun ethnic people at Phieng Pan border commune, Mai Son district, Son La province.

Thi Lien Vu, Hoang Long Ngo, Van Loa Lo, Thi Bich Hau Lo

36 Inhibitory effects on *Helicobacter pylori* of methanol extracts from plants collected in Lam Dong province.

Nha Hoa Phan, Bao Yen Pham

40 Host genetic variation and Covid-19 disease: recent discoveries, prospects and challenges in the treatment of Covid-19.

Phuong Nhung Vu, Thi Bich Ngoc Tran, Dang Ton Nguyen, Thi Thu Hien Le, Thuy Duong Nguyen, Quang Thach Nguyen, Van Hai Nong, Hai Ha Nguyen

51 Examination of virulence and the effects of environmental conditions on the growth of *Aeromonas hydrophila* in farmed tilapia and histopathological changes in infected fish.

Thi Ninh Doan, Duc Manh Vu, Thi Huong Giang Nguyen, Thi Lua Dang, Dinh Hoai Trung

58 Investigating water quality and disease in white leg shrimp (*Penaeus vannamei*) culture applying Nanobubble technology.

Huu Nghia Nguyen, Duc Binh Nguyen, Thai Giang Pham, Thi Minh Nguyet Nguyen, Thi Nguyen Nguyen, Thi Hanh Nguyen, Trong Binh Phan, Thi Kieu Loan Vu, Thi Van Phan

65 Evaluation of the immune responses against enteric septicemia and determination of immune markers for selective breeding of pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*).

Thi Phuong Dung Tran, Van Sang Nguyen, Hong Phuong Vo, Huu Phuc Tran, Thi Truc Quan Huynh, Huu Thinh Nguyen

70 Research on the one-step regeneration of sugarcane in KK3 variety (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro*.

Thi Thu Hien Phan

75 Land suitability evaluation for sustainable development planning major perennial industrial crops in the Central Highlands.

Thi Thuy Nguyen, Thi Huyen Ngoc Hoang, Manh Ha Nguyen, Thanh Binh Nguyen, Ngoc Thang Nguyen, Cong Long Nguyen, Quoc Nam Hoang