



p-ISSN 1859-4794 * e-ISSN 2615-9929

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

B

Tập 64 - Số 7 - Tháng 7 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 Duc 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

Tổng quan về bệnh dịch kính - võng mạc xuất tiết có tính chất gia đình

Dương Thu Trang^{1,2}, Nguyễn Minh Phú³, Phạm Minh Châu³, Đỗ Mạnh Hưng^{1,2}, Nguyễn Hải Hà^{1,2*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Bệnh viện Mắt Trung ương, 85 Bà Triệu, phường Nguyễn Du, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 27/8/2021; ngày chuyển phản biện 1/9/2021; ngày nhận phản biện 20/9/2021; ngày chấp nhận đăng 24/9/2021

Tóm tắt:

Bệnh dịch kính - võng mạc xuất tiết có tính chất gia đình (Familial exudative vitreoretinopathy - FEVR) là một rối loạn di truyền hiếm gặp, đặc trưng bởi sự phát triển bất thường của mạch máu võng mạc. Đặc điểm điển hình của mắt bị bệnh là vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, tùy vào mức độ nghiêm trọng có thể dẫn đến các biến chứng đe dọa thị lực. Những tổn thương nhãn cầu của FEVR tương tự như bệnh võng mạc do sinh non, tuy nhiên hầu hết bệnh nhân FEVR đều sinh đủ tháng. Cho đến nay, nhiều gen đã được xác định có đột biến gây bệnh FEVR, với các kiểu di truyền như: gen trội/lặn trên nhiễm sắc thể (NST) thường và gen lặn liên kết NST X. Những khiếm khuyết trong con đường tín hiệu Norrin/Frizzled4 được cho là có liên quan đến bệnh FEVR. Chụp mạch huỳnh quang là một phương pháp quan trọng trong việc chẩn đoán FEVR, giúp phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm và những thành viên gia đình không có triệu chứng. Hiện nay, việc điều trị FEVR tập trung vào ngăn chặn sự tiến triển của bệnh, trong đó có sử dụng laser quang đông trên những vùng võng mạc vô mạch để điều trị tân mạch và xuất tiết, can thiệp phẫu thuật đối với bệnh nhân tiến triển nặng hơn kèm với bong võng mạc.

Từ khóa: bệnh dịch kính - võng mạc xuất tiết có tính chất gia đình (FEVR), di truyền, võng mạc vô mạch.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Mở đầu

Bệnh FEVR là một rối loạn di truyền đặc trưng bởi sự phát triển bất thường của mạch máu võng mạc, dẫn đến sự hình thành mạch máu võng mạc chu biên không hoàn chỉnh và kém biệt hóa. Bệnh này được báo cáo lần đầu bởi Criswick và Schepens vào năm 1969 [1]. Phần lớn bệnh nhân FEVR có mạch máu võng mạc chu biên không hoàn chỉnh, tuy nhiên biểu hiện bệnh khác nhau đáng kể giữa các bệnh nhân và ngay cả giữa các thành viên trong cùng một gia đình. Bệnh có thể biểu hiện ra ở bất cứ độ tuổi nào, nhưng nếu bệnh biểu hiện sớm ở giai đoạn trẻ em hoặc thanh thiếu niên thì sẽ có tiên lượng kém hơn so với giai đoạn trưởng thành.

FEVR là một bệnh di truyền hiếm gặp với tỷ lệ mắc bệnh vẫn chưa xác định được cho đến nay. Tỷ lệ số ca bệnh giữa nam và nữ không có sự khác biệt. Có 3 kiểu di truyền của FEVR đã được xác định, bao gồm: di truyền lặn liên kết NST X, di truyền trội trên NST thường và lặn trên NST thường. Ngoài ra, bệnh cũng có thể xảy ra ở những bệnh nhân không có tiền sử gia đình.

2. Đặc điểm lâm sàng

Bệnh FEVR có thể biểu hiện ra ở bất cứ độ tuổi nào, tuy nhiên phổ biến nhất là ở thời kỳ thơ ấu. Đặc biệt, nếu bệnh khởi phát ở giai đoạn trẻ sơ sinh thì tiên lượng sẽ rất kém [2]. Những bệnh nhân khởi phát muộn có tiên lượng tốt hơn, tuy nhiên bệnh vẫn có thể diễn tiến với biến chứng không lường trước được. Sự tiến triển của bệnh thường diễn ra nhanh nhất ở giai đoạn trẻ em và thanh thiếu niên, hiếm khi xảy ra sau tuổi 20 [2].

Một đặc điểm quan trọng của bệnh FEVR là hầu hết các mắt bị bệnh đều có vùng võng mạc vô mạch (hình 1). Vùng vô mạch thường được quan sát thấy ở võng mạc chu biên phía thái dương và có dạng hình chữ V. Ở những trường hợp bệnh nhẹ, vùng võng mạc vô mạch nhỏ không gây triệu chứng và chỉ có thể phát hiện bằng phương pháp chụp mạch huỳnh quang. Ở những trường hợp bệnh mức độ trung bình và nặng, xuất hiện tân mạch và gờ xơ giữa vùng võng mạc có mạch máu và vùng vô mạch, gây co kéo mạch máu võng mạc và vùng võng mạc hoàng điểm (hình 2) [3, 4]. Ở những

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

Familial exudative vitreoretinopathy: An overview

Thu Trang Duong^{1,2}, Minh Phu Nguyen³,
Minh Chau Pham³, Manh Hung Do^{1,2}, Hai Ha Nguyen^{1,2*}

¹Graduate University of Science and Technology, VAST,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

²Institute of Genome Research, VAST,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Vietnam National Eye Hospital,
85 Ba Trieu Street, Nguyen Du Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

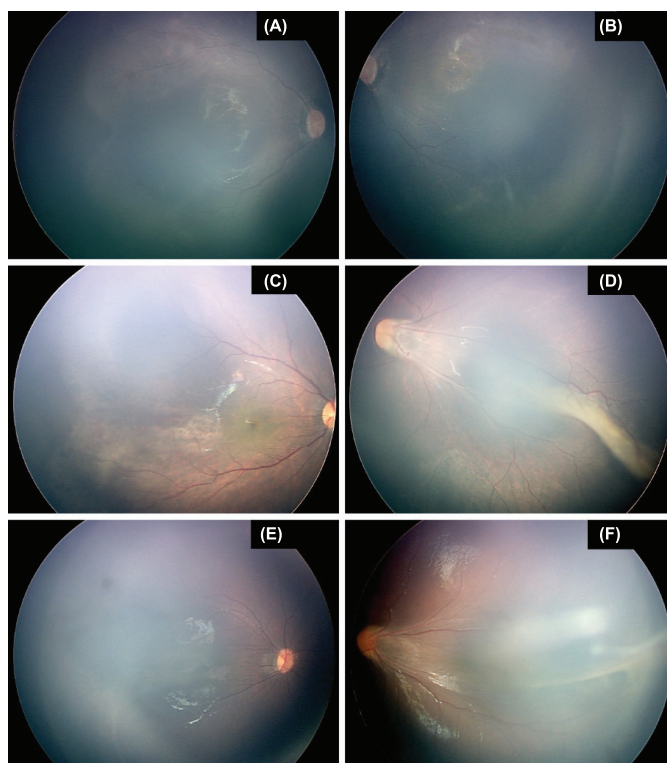
Received 27 August 2021; revised 20 September 2021; accepted 24 September 2021

Abstract:

Familial exudative vitreoretinopathy (FEVR) is a rare inherited disorder, characterised by the abnormal development of retinal blood vessels. FEVR is marked by an avascular peripheral retina, which may give rise to a range of sight-threatening complications depending on the severity of the disease. FEVR and retinopathy of prematurity almost share the same ocular manifestations, but most FEVR cases are full-term. To date, several pathogenic genes have been reported to be associated with FEVR whose inheritance pattern may be autosomal dominant, autosomal recessive or X-linked. It has been proposed that defects in the *Norrin/ Frizzled4* signalling pathway play a role in the pathogenesis of FEVR. Fluorescein Angiography stands out as a standard approach for an accurate diagnosis, especially in early stages and asymptomatic cases. Regarding current treatments, laser coagulation of retinal avascular zones is a key for managing neovascularization and exudation, and surgical intervention is required in severe cases with progressive retinal detachment.

Keywords: familial exudative vitreoretinopathy (FEVR), genetics, retinal avascularity.

Classification number: 3.1

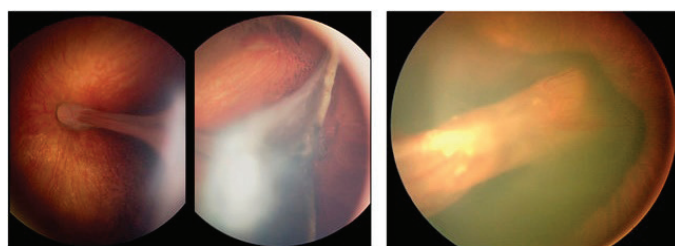


Hình 1. Vùng võng mạc vô mạch chu biên với sự phát triển mạch máu không hoàn chỉnh ở mắt phải (A) và trái (B) của một bé trai 4 tháng tuổi; vùng vô mạch chu biên với sự phát triển mạch máu không hoàn chỉnh ở mắt phải (C) và lệch vị trí hoàng điểm ở mắt trái (D) của một bé gái 4 tháng tuổi; màng xơ mạch ngoài võng mạc xuất hiện cùng với đường viền vô mạch thái dương ở mắt phải (E) và bong võng mạc ngoài hoàng điểm vùng võng mạc chu biên ở mắt trái (F) của một bé trai 20 tháng tuổi [5].

ca bệnh nặng, sự co kéo này có thể dẫn đến bong võng mạc và các nếp gấp võng mạc, đây là các biến chứng nguy hiểm vì gây giảm và mất thị lực (hình 3). Đặc điểm thường thấy ở bệnh nhân FEVR là sự bất cân xứng về tổn thương dịch kính võng mạc giữa hai mắt, thường một mắt có thể không có hoặc có biểu hiện nhẹ nhưng mắt còn lại tổn thương rất nặng.



Hình 2. Mạch máu võng mạc bị kéo do sự co lại của các mô xơ hóa võng mạc [4].



(A)

(B)

Hình 3. Nếp gấp võng mạc hướng về phía vùng xơ hóa (A) và vùng vô mạch (B) [3].

Theo đánh giá của D.F. Gilmour (2015) [3], bong võng mạc là biến chứng phổ biến của bệnh FEVR, với các hình thái như có vết rách, co kéo và bong thanh dịch võng mạc. Bong võng mạc do co kéo dẫn đến các nếp gấp võng mạc hướng tâm, là hình ảnh điển hình ở hình thái FEVR nặng (hình 3). Ngoài ra, các biểu hiện khác ở mắt có thể gặp bao gồm: xuất tiết võng mạc, xuất huyết dịch kính, hình thành màng trước võng mạc thứ phát, tách lớp võng mạc ở chu biên, tăng nhãn áp thứ phát, viêm màng bồ đào, u mao mạch võng mạc và tồn lưu mạch máu [3].

Các nhà khoa học đã xây dựng nên một số hệ thống phân loại khác nhau cho bệnh FEVR. Năm 1998, S.D. Pendergast và cs [6] đã đưa ra một hệ thống phân loại gồm 5 giai đoạn với mức độ nặng tăng dần của FEVR dựa vào các kết quả soi đáy mắt (bảng 1). Hệ thống phân loại này đưa ra sự mô tả bao quát nhất so với những sự phân loại trước đó. Giai đoạn 1 đặc trưng bởi vùng võng mạc vô mạch, thường là ở võng mạc chu biên phía thái dương. Ở giai đoạn 2, mắt bị bệnh có vùng vô mạch ở võng mạc chu biên và sự hình thành mạch ngoài võng mạc, không đi kèm với xuất tiết (2A) hoặc đi kèm với xuất tiết (2B). Giai đoạn 3 mô tả mắt bị bong võng mạc một phần không liên quan đến vùng hoàng điểm, trong khi đó giai đoạn 4 đề cập đến mắt bị bong võng mạc một phần có liên quan đến vùng hoàng điểm. Ở giai đoạn 3 và 4, biểu hiện mắt đều được chia thành 2 nhóm nhỏ là chủ yếu xuất tiết (3A và 4A) và co kéo (3B và 4B). Bong võng mạc được đánh giá là chủ yếu do co kéo nếu có những đặc điểm sau: các lớp màng dịch kính - võng mạc hoặc khối xơ bám vào thể thủy tinh hoặc dịch kính phía trước, bề lõm võng mạc, không có nhiều xuất tiết hoặc xuất huyết dưới võng mạc, các mạch máu bị kéo với mức độ đáng kể và lệch vị trí hoàng điểm. Trái lại, bong võng mạc được đánh giá là do xuất tiết trong trường hợp có một lượng đáng kể chất lỏng và xuất tiết tích tụ dưới võng mạc, bong võng mạc xuất tiết có cấu trúc lồi hơn. Giai đoạn 5 mô tả mắt bị bong võng mạc hoàn toàn với dạng phễu mở (5A) hoặc đóng (5B). Tuy nhiên, sự phân loại này không đại diện cho sự tiến triển của bệnh FEVR và bệnh nhân FEVR có thể không phải trải qua lần lượt từng giai đoạn như vậy.

Bảng 1. Các giai đoạn lâm sàng của bệnh FEVR.

Giai đoạn của bệnh	Đặc điểm lâm sàng	
	Được đề xuất năm 1998	Được sửa đổi năm 2014
1	Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, không có sự hình thành mạch ngoài võng mạc	Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên hoặc các mạch máu bất thường trong võng mạc
1A		Không có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
1B		Có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
2	Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, có sự hình thành mạch ngoài võng mạc	Vùng vô mạch ở võng mạc chu biên, có sự hình thành mạch ngoài võng mạc
2A	Không có xuất tiết	Không có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
2B	Có xuất tiết	Có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
3	Bong võng mạc ngoài vùng hoàng điểm	Bong võng mạc ngoài vùng hoàng điểm
3A	Chủ yếu xuất tiết	Không có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
3B	Chủ yếu co kéo	Có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
4	Bong một phần võng mạc có liên quan vùng hoàng điểm	Bong một phần võng mạc có liên quan vùng hoàng điểm
4A	Chủ yếu xuất tiết	Không có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
4B	Chủ yếu co kéo	Có xuất tiết hoặc rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang
5	Bong võng mạc hoàn toàn	Bong võng mạc hoàn toàn
5A	Dạng phễu mở	Dạng phễu mở
5B	Dạng phễu đóng	Dạng phễu đóng

Năm 2014, A.H. Kashani và cs (2014a) [7] đã đề xuất một số sửa đổi trong hệ thống phân loại lâm sàng dựa trên các đặc điểm chụp mạch huỳnh quang. Họ đã lưu ý sự rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang trong chụp mạch khi không có xuất tiết chính là dấu hiệu báo trước cho giai đoạn xuất tiết của bệnh. Ngoài ra, việc phát hiện rò rỉ thuốc nhuộm huỳnh quang trong chụp mạch rất quan trọng đối với việc điều trị bệnh kịp thời. Vì những lý do này, họ đã sửa đổi và bổ sung đặc điểm rò rỉ trong chụp mạch vào hệ thống phân loại (bảng 1). Bên cạnh đó, họ cũng bổ sung thêm đặc điểm mạch máu bất thường vào giai đoạn 1 của bệnh, không đi kèm (1A) hoặc có đi kèm (1B) rò rỉ trong chụp mạch.

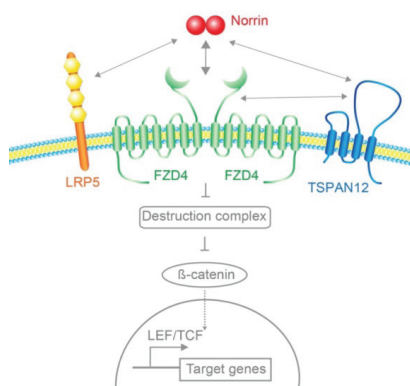
Ngoài các đặc điểm ở mắt, sự suy giảm khối lượng xương có thể xảy ra ở một số bệnh nhân FEVR có đột biến trên gen *LRP5*. Hiện tượng giảm thính lực tiến triển và thiếu năng trí tuệ xuất hiện ở những bệnh nhân có biến đổi nghiêm trọng trên gen *NDP*. Bên cạnh đó, tật đầu nhỏ cũng được tìm thấy ở các ca bệnh FEVR [8-11].

3. Sinh bệnh học và các biến đổi di truyền gây bệnh

Cho đến nay, có ít nhất 12 gen đã được báo cáo là có liên quan đến FEVR, bao gồm: Frizzled-4 (*FZD4*), Low-density lipoprotein receptor related protein-5 (*LRP5*), Norrie disease pseudoglioma (*NDP*), Tetraspanin-12 (*TSPAN12*), Zinc finger protein-408 (*ZNF408*), Kinesin family member 11 (*KIF11*), Cadherin-associated protein, beta (*CTNBN1*), Jagged 1 (*JAG1*), RCC1 và BTB domain containing protein 1 (*RCBTB1*), Atonal bHLH transcription factor 7 (*ATOH7*),

Dedicator of Cytokinesis 6 (*DOCK6*) và RHO GTPase-activating protein 31 (*ARHGAP31*). Hầu hết các gen được cho là có đột biến gây bệnh đã được xác định có liên quan đến một trong số các dạng di truyền đã được nhắc đến ở trên là: di truyền dạng trội trên NST thường: *FZD4*, *LRP5*, *TSPAN12*, *ZNF408*, *KIF11*, *CTNNB1*, *JAG1*, *ARHGAP31*; di truyền dạng lặn trên NST thường: *FZD4*, *LRP5*, *TSPAN12*, *RCBTB1*, *ATOH7*, *DOCK6*; di truyền dạng lặn liên kết NST X: *NDP*.

Trong số những gen nêu trên, có 4 gen (*FZD4*, *NDP*, *LRP5* và *TSPAN12*) mã hóa các protein tương tác với nhau trong con đường truyền tín hiệu Wnt (Wnt signaling) - con đường sinh học được xác định có liên quan đến FEVR. Con đường tín hiệu Norrin/Frizzled-4 (*FZD4*) hay Norrin/ β -catenin là một trong những con đường Wnt và trực tiếp liên quan đến quá trình phát triển của mạch máu trong võng mạc. Vai trò của con đường này là điều hòa sự hình thành và phát triển bình thường của mạch máu võng mạc, hoạt động này có liên quan đến sự kích hoạt *FZD4*, *LRP5* và *TSPAN12* (các protein được mã hóa bởi các gen lặn là *FZD4*, *LRP5* và *TSPAN12*). Cụ thể, Norrin (protein mã hóa bởi gen *NDP*) có chức năng như một phối tử liên kết với thụ thể *FZD4* trên tế bào nội mô võng mạc và bằng cách đó, tín hiệu Wnt được kích hoạt (hình 4). *LRP5* là một đồng thụ thể Wnt, còn *TSPAN12* được cho rằng có vai trò giúp ổn định phức hợp Norrin/*FZD4* và làm tăng khả năng chọn lọc phối tử của thụ thể *FZD4* [12].



Hình 4. Con đường tín hiệu Norrin/Frizzled-4 tại tế bào nội mô võng mạc [13]. Sự liên kết của yếu tố tăng trưởng Norrin với thụ thể *FZD4* trên màng tế bào kết hợp với đồng thụ thể *LRP5* và protein *TSPAN12* dẫn đến việc kích hoạt tín hiệu Wnt/ β -catenin. Phức hợp phân giải β -catenin bị bất hoạt, dẫn đến sự ổn định và di chuyển của β -catenin vào trong nhân, nơi nó tương tác với yếu tố phiên mã Tcf/Lef, từ đó kích hoạt quá trình phiên mã của các gen mục tiêu.

CTNNB1 (β -catenin) là một protein trong tế bào chất và có vai trò quan trọng trong quá trình phiên mã của gen. β -catenin thực hiện chức năng này thông qua việc đi vào nhân tế bào và tương tác với protein Tcf/Lef. Protein này sau đó sẽ chuyển từ dạng chất kìm hãm phiên mã sang dạng chất

kích hoạt phiên mã, nhờ đó kích hoạt quá trình biểu hiện các gen mục tiêu của Tcf [14, 15]. Sự biểu hiện của các gen mục tiêu này sẽ điều chỉnh sự tăng sinh và biệt hóa của các tế bào trong các mô cụ thể. Protein β -catenin chỉ có thể thực hiện được nhiệm vụ này khi nó được bảo vệ khỏi quá trình phosphoryl hóa và tiêu hủy bởi proteasome, điều này chính là nhờ con đường tín hiệu Wnt. Khi các thụ thể *FZD4* và *LRP5* được kích hoạt, con đường Wnt sẽ được kích hoạt và các tín hiệu được gửi đi để ngăn chặn quá trình phosphoryl hóa β -catenin, do vậy giúp ổn định mức β -catenin trong tế bào chất [14, 15].

Đột biến xảy ra ở những gen ảnh hưởng đến tín hiệu Wnt có thể dẫn đến một số bệnh lý dịch kính ở trẻ em, chẳng hạn như FEVR, Norrie và hội chứng osteoporosis - pseudoglioma (một hội chứng đặc trưng bởi tình trạng loãng xương và mất thị lực).

Protein *RCBTB1* (mặc dù chưa rõ vai trò cụ thể) cũng được cho là có tham gia vào con đường tín hiệu Norrin/ β -catenin thông qua việc điều hòa mức β -catenin tích tụ trong nhân tế bào [16]. Các đột biến dị hợp trên gen *KIF11* cũng là một nguyên nhân phổ biến gây bệnh FEVR dạng di truyền trội trên NST thường [11]. Ngoài các vấn đề mắt, những bệnh nhân mang đột biến gen *KIF11* có thể mắc thêm các tình trạng khác, bao gồm tật đầu nhỏ, phù bạch huyết hoặc thiếu năng trí tuệ [11]. Gần đây đã có bằng chứng cho thấy, protein *KIF11* biểu hiện và khu trú ở các tế bào cảm thụ ánh sáng ở võng mạc [17]. Một số gen khác cũng dần được phát hiện có đột biến liên quan đến bệnh FEVR, trong đó, Tao và cs (2021) [18] đã tìm thấy các đột biến ở 2 gen gây hội chứng Adams-Oliver gồm *DOCK6* và *ARHGAP31* ở 2 bệnh nhân có biểu hiện FEVR và tật đầu nhỏ.

4. Phương pháp chẩn đoán và điều trị

4.1. Chẩn đoán trên lâm sàng

Soi đáy mắt bằng máy soi đáy mắt gián tiếp dưới gây mê toàn thân: Phương pháp này giúp thu được hình ảnh vùng vô mạch nhỏ ở võng mạc chu biên. Nếu bệnh mức độ trung bình và nặng sẽ xuất hiện tân mạch và gờ xơ giữa vùng võng mạc có mạch máu và vùng vô mạch, gây co kéo mạch máu võng mạc và vùng võng mạc hoàng điểm. Nếu nặng hơn sẽ có co kéo võng mạc, có thể dẫn đến bong võng mạc và các nếp gấp võng mạc.

Siêu âm B nhãn cầu: Tùy từng mức độ biểu hiện bệnh, có thể có hình ảnh dải tăng sinh kéo từ đĩa thị ra phía trước kèm bong võng mạc (khi bệnh ở giai đoạn 4 và 5), tuy nhiên khó quan sát được chi tiết võng mạc.

Chụp mạch huỳnh quang: Đây là một phương pháp quan trọng để chẩn đoán, phân giai đoạn và theo dõi tiến triển

bệnh FEVR, đồng thời có tác động lớn đến việc điều trị bệnh. Chụp mạch máu võng mạc huỳnh quang phổ rộng có thể phát hiện được nhiều bất thường trong mạch máu, ngay cả ở những thành viên gia đình không triệu chứng [7, 19]. Một số phương pháp có thể sử dụng kết hợp bao gồm chụp cắt lớp quang học (OCT) hoặc phân tích mô bệnh học. Ngoài ra, gần đây phương pháp soi đáy mắt bằng quét laser trường rộng (Ultra-wide-field scanning laser ophthalmoscopy) cũng được báo cáo là một công cụ hỗ trợ phát hiện sớm và đánh giá lâm sàng giai đoạn đầu ở những thành viên gia đình không triệu chứng [20]. Ngoài ra, những bệnh nhân dương tính với đột biến gen *LRP5* cần được chụp DEXA để kiểm tra mật độ khoáng của xương.

Chẩn đoán phân biệt: Thông tin tiền sử gia đình có người bị giảm hoặc mất thị lực sẽ rất hữu ích để xác định nguy cơ mắc FEVR. Tuy nhiên, có nhiều trường hợp không có tiền sử gia đình, điều này là do người bệnh FEVR không có triệu chứng, hoặc có triệu chứng nhưng chưa đi khám cũng như chưa được chẩn đoán chính xác. Bên cạnh đó, nếu bệnh nhân mang đột biến *de novo* thì việc khai thác tiền sử gia đình sẽ không hỗ trợ được việc chẩn đoán. Bệnh FEVR có nhiều đặc điểm nhân cầu tương tự với một số bệnh dịch kính - võng mạc khác, nhất là bệnh võng mạc ở trẻ sinh non. Tuy nhiên, trẻ mắc bệnh FEVR được sinh đủ tháng và không sử dụng liệu pháp ôxy thì các tổn thương nhân cầu tiến triển chậm.

Di chứng của tân mạch võng mạc là mối đe dọa nguy hiểm đối với thị lực, cho nên chẩn đoán và điều trị bệnh sớm là rất cần thiết. Các thành viên trong gia đình của bệnh nhân FEVR cũng cần được khuyến khích khám sàng lọc bệnh. Đặc biệt, đối với những thành viên đang trong độ tuổi sinh đẻ, sàng lọc còn giúp ích cho việc tư vấn di truyền, để những đứa trẻ sinh ra tránh được nguy cơ mắc bệnh. Nghiên cứu của A.H. Kashani và cs (2014b) [19] đã cho thấy, tỷ lệ đáng chú ý những thành viên gia đình của bệnh nhân FEVR không có triệu chứng có thể mắc bệnh ở một mức độ nào đó. Cụ thể, trong số 57 người không có triệu chứng, có 58% số ca khi kiểm tra có biểu hiện lâm sàng ở giai đoạn 1 hoặc 2 và 21% ở giai đoạn 3, 4 hoặc 5.

4.2. Chẩn đoán di truyền

Xét nghiệm gen rất hữu ích cho việc chẩn đoán đúng bệnh trong những trường hợp đặc điểm lâm sàng không rõ ràng, chẳng hạn như để phân biệt với các bệnh lý dịch kính - võng mạc khác có điểm tương đồng với FEVR như: Norrie, tồn lưu dịch kính nguyên thủy, rối loạn sắc tố da dầm dề và võng mạc do sinh non.

Để xác định đột biến gen gây bệnh FEVR, người ta thường kết hợp giải trình tự gen nhằm phát hiện các đột

biến gen loại nhỏ với lai phân tử hoặc khuếch đại gen (PCR) để phát hiện các thay đổi DNA lớn. Nhìn chung, giải trình tự Sanger cho từng gen đơn và giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa (Whole exome sequencing - WES) là 2 phương pháp được sử dụng rộng rãi hơn cả. Hệ gen mã hóa của người chiếm chưa đến 2% bộ gen, nhưng lại chứa khoảng 85% các biến thể liên quan đến các bệnh do đột biến gen đã biết. Vì vậy, phương pháp WES có ưu điểm là giảm chi phí và công phân tích so với phương pháp giải trình tự toàn bộ gen (Whole genome sequencing - WGS). Ngoài ra, giải trình tự bộ gen đích (Gene panel), tập trung vào phân tích các vùng gen mục tiêu có liên quan tới bệnh đã biết cũng được sử dụng tương đối phổ biến. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là các biến thể quan trọng bên ngoài các vùng được nhắm mục tiêu có thể không được phát hiện. Đối với các biến đổi DNA lớn như các đột biến mất và lặp đoạn gen, có thể sử dụng các phương pháp như PCR, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) hoặc lai array-CGH. Các đột biến gen gây bệnh FEVR và phương pháp phát hiện tương ứng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Đột biến gen gây bệnh đã được phát hiện ở bệnh nhân FEVR.

Tên gen	Kiểu di truyền	Đột biến	Phương pháp phát hiện	Tham khảo
<i>FZD4</i>	Di truyền trội	c.1501_1502, c.662_663insA, c.1507_1508del	Targeted NGS	[21]
		c.313A>G, c.1282_1285del	Sanger sequencing	[16]
		Mất toàn bộ gen	MLPA	[22]
<i>NDP</i>	Di truyền lặn liên kết NST X	c.112C>T, c.112C>T, c.362G>A, c.196G>T, c.393C>A	Targeted NGS	[21]
<i>LRP5</i>	Di truyền trội	c.2300del, c.2716_2719del, c.2737dupT, c.2635C>T, c.4087G>A, c.4517C>T	Targeted NGS	[21]
<i>TSPAN12</i>	Di truyền trội	c.218_219insGCTCTT, c.419T>A, c.68T>G, c.361-1_361-5del, c.149p3A>G, c.302T>A, c.629T>G	Sanger sequencing	[23]
		c.308T>C, c.440C>A	Targeted NGS	[21]
		Mất exon 4, hoặc mất toàn bộ gen	Semiquantitative multiplex PCR và ddPCR	[5]
<i>ZNF408</i>	Di truyền trội	c.443G>A, p.R148Q	Targeted NGS	[21]
<i>KIF11</i>	Di truyền trội	c.1844_1846del, c.808G>T, c.2267p1G>A	Targeted NGS	[17]
		c.131_132dupAT, c.2230C>T, c.2863C>T, c.2952_2955del	WES	[11]
<i>CTNNA1</i>	Di truyền trội	c.2142_2157dup, c.2128C>T, c.1434_1435insC	WES	[24]
<i>JAG1</i>	Di truyền trội	c.413C>T, c.1415G>A, c.2884A>G	WES	[25]
<i>RCBTB1</i>	Di truyền lặn	c.1172+1G>A	WES	[16]
<i>ATOH7</i>	Di truyền lặn	c.106_129del	Sanger sequencing	[26]
<i>DOCK6</i>	Di truyền lặn	c.3190_3191del	WES	[18]
<i>ARHGAP31</i>	Di truyền trội	c.3524G>A	WES	[18]

4.3. Điều trị

FEVR là một bệnh kéo dài suốt đời, có thể biến chuyển xấu và không đoán trước được, do đó bệnh nhân nên được theo dõi thường xuyên. Điều trị FEVR tập trung vào việc ngăn chặn sự tiến triển của bệnh và điều trị các biến chứng có nguy cơ ảnh hưởng xấu đến thị lực.

Các phương pháp được áp dụng sẽ phụ thuộc vào giai đoạn lâm sàng của bệnh. Bệnh nhân ở giai đoạn 1 và 2 chủ yếu được điều trị bằng laser cho vùng võng mạc vô mạch, có thể phải điều trị bằng laser nhiều lần hoặc phối hợp với tiêm anti-VEGF khi có xuất tiết. Laser quang đông là phương pháp điều trị chính cho bệnh FEVR. Trong một số trường hợp, bệnh nhân có đặc điểm thường xuyên xuất tiết nhiều và tân mạch mạc dù đã điều trị bằng các liệu pháp tiêu chuẩn, thì anti-VEGF có thể được dùng như một phương pháp bổ trợ giúp giảm tình trạng xuất tiết và tân mạch. Tuy nhiên, anti-VEGF có thể gây ra tác dụng phụ như làm cho tình trạng kéo võng mạc trở nên xấu hơn [27]. Vì vậy, tính an toàn của anti-VEGF trong chữa trị FEVR vẫn cần được nghiên cứu thêm. Ở giai đoạn 3, khi bong võng mạc xuất hiện, có thể kết hợp lạnh đông vùng vô mạch và tháo dịch dưới võng mạc. Phẫu thuật đặt đai củng mạc giúp làm giảm co kéo võng mạc. Ở giai đoạn 4 và 5, để điều trị bong võng mạc do co kéo, cần phẫu thuật cắt dịch kính, bóc màng xơ co kéo võng mạc, bóc màng trước võng mạc giúp trải phẳng võng mạc, nhất là vùng võng mạc hậu cực. Bệnh nhân ở giai đoạn 3, 4 và 5 thường có tiên lượng thị lực thấp.

5. Kết luận

FEVR là một bệnh dịch kính - võng mạc hiếm gặp, gây ảnh hưởng đến sự hình thành và phát triển mạch máu võng mạc. Người bệnh cần được kiểm tra lâm sàng kỹ để xác định rõ tình trạng bệnh, nhờ đó các phương pháp điều trị dịch kính - võng mạc được can thiệp phù hợp và kịp thời với mục đích ngăn chặn bệnh tiến triển, giúp bệnh nhân cải thiện, duy trì thị lực. Việc tìm hiểu về gen gây bệnh cũng rất được quan tâm vì nó không những tạo điều kiện thuận lợi cho tư vấn di truyền, mà mỗi gen mới và biến thể gen mới gây bệnh FEVR được xác định còn giúp làm tăng hiểu biết về các cơ chế phân tử gây bệnh. Ngoài ra, các nghiên cứu sâu hơn về phương pháp điều trị cũng rất cần được thực hiện trong tương lai để giúp nâng cao hiệu quả việc kiểm soát và điều trị bệnh.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện bởi nguồn kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu các biến thể gen liên quan đến bệnh võng mạc - dịch kính xuất tiết có tính chất gia đình ở người Việt Nam” (mã số đề tài GUST.STS.DT2020-SH06) do Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam quản lý. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V.G. Criswick, C.L. Schepens (1969), “Familial exudative vitreoretinopathy”, *American Journal of Ophthalmology*, **68**(4), pp.578-594, DOI: 10.1016/0002-9394(69)91237-9.
- [2] W. Tasman, J.J. Augsburger, J.A. Shields, et al. (1981), “Familial exudative vitreoretinopathy”, *Transactions of the American Ophthalmological Society*, **79**, pp.211-226.
- [3] D.F. Gilmour (2015), “Familial exudative vitreoretinopathy and related retinopathies”, *Eye (London, England)*, **29**(1), pp.1-14, DOI: 10.1038/eye.2014.70.
- [4] The Retina Reference (2021), “Familial exudative vitreoretinopathy”, retinareference.com/diseases/57137a898c28a9d5/, accessed 18 June 2021.
- [5] S.H. Seo, M.J. Kim, S.W. Park, et al. (2016), “Large deletions of TSPAN12 cause familial exudative vitreoretinopathy (FEVR)”, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **57**(15), pp.6902-6908, DOI: 10.1167/iiov.16-20585.
- [6] S.D. Pendergast, M.T. Trese (1998), “Familial exudative vitreoretinopathy: Results of surgical management”, *Ophthalmology*, **105**(6), pp.1015-1023, DOI: 10.1016/S0161-6420(98)96002-X.
- [7] A.H. Kashani, K.T. Brown, E. Chang, et al. (2014a), “Diversity of retinal vascular anomalies in patients with familial exudative vitreoretinopathy”, *Ophthalmology*, **121**(11), pp.2220-2227, DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.05.029.
- [8] R.G. Coussa, Y. Zhao, M.J. DeBenedictis, et al. (2020), “Novel mutation in CTNBN1 causes familial exudative vitreoretinopathy (FEVR) and microcephaly: Case report and review of the literature”, *Ophthalmic Genetics*, **41**(1), pp.63-68, DOI: 10.1080/13816810.2020.1723118.
- [9] S. Hull, G. Arno, P. Ostergaard, et al. (2019), “Clinical and molecular characterization of familial exudative vitreoretinopathy associated with microcephaly”, *American Journal of Ophthalmology*, **207**, pp.87-98, DOI: 10.1016/j.ajo.2019.05.001.
- [10] D.W. Karjosukarso, F.P.M. Cremers, C.E. van Nouhuys, et al. (2018), “Detection and quantification of a KIF11 mosaicism in a subject presenting familial exudative vitreoretinopathy with microcephaly”, *European Journal of Human Genetics: EJHG*, **26**(12), pp.1819-1823, DOI: 10.1038/s41431-018-0243-y.
- [11] H. Hu, X. Xiao, S. Li, et al. (2016), “KIF11 mutations are a common cause of autosomal dominant familial exudative vitreoretinopathy”, *The British Journal of Ophthalmology*, **100**(2), pp.278-283, DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-306878.
- [12] H.J. Junge, S. Yang, J.B. Burton, et al. (2009), “TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/β-catenin signaling”, *Cell*, **139**(2), pp.299-311, DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.048.

- [13] M.B. Lai, C. Zhang, J. Shi, et al. (2017), "TSPAN12 is a norrin co-receptor that amplifies Frizzled4 ligand selectivity and signaling", *Cell Reports*, **19**(13), pp.2809-2822, DOI: 10.1016/j.celrep.2017.06.004.
- [14] S.M. Warden, C.M. Andreoli, S. Mukai (2007), "The Wnt signaling pathway in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease", *Seminars in Ophthalmology*, **22**(4), pp.211-217, DOI: 10.1080/08820530701745124.
- [15] H. Clevers (2006), "Wnt/ β -catenin signaling in development and disease", *Cell*, **127**(3), pp.469-480, DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.018.
- [16] J.H. Wu, J.H. Liu, Y.C. Ko, et al. (2016), "Haploinsufficiency of RCBTB1 is associated with Coats disease and familial exudative vitreoretinopathy", *Human Molecular Genetics*, **25**(8), pp.1637-1647, DOI: 10.1093/hmg/ddw041.
- [17] J. Birtel, M. Gliem, E. Mangold, et al. (2017), "Novel insights into the phenotypical spectrum of KIF11-associated retinopathy, including a new form of retinal ciliopathy", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **58**(10), pp.3950-3959, DOI: 10.1167/iovs.17-21679.
- [18] Z. Tao, S. Bu, F. Lu (2021), "Two AOS genes attributed to familial exudative vitreoretinopathy with microcephaly: Two case reports", *Medicine*, **100**(9), DOI: 10.1097/MD.00000000000024633.
- [19] A.H. Kashani, D. Learned, E. Nudleman, et al. (2014), "High prevalence of peripheral retinal vascular anomalies in family members of patients with familial exudative vitreoretinopathy", *Ophthalmology*, **121**(1), pp.262-268, DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.08.010.
- [20] J. Lyu, Q. Zhang, S.Y. Wang, et al. (2017), "Ultra-wide-field scanning laser ophthalmoscopy assists in the clinical detection and evaluation of asymptomatic early-stage familial exudative vitreoretinopathy", *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, **255**(1), pp.39-47, DOI: 10.1007/s00417-016-3415-x.
- [21] J. Salvo, V. Lyubasyuk, M. Xu, et al. (2015), "Next-generation sequencing and novel variant determination in a cohort of 92 familial exudative vitreoretinopathy patients", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**(3), pp.1937-1946, DOI: 10.1167/iovs.14-16065.
- [22] S.H. Seo, Y.S. Yu, S.W. Park, et al. (2015), "Molecular characterization of FZD4, LRP5, and TSPAN12 in familial exudative vitreoretinopathy", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **56**(9), pp.5143-5151, DOI: 10.1167/iovs.14-15680.
- [23] J.A. Poulter, M. Ali, D.F. Gilmour, et al. (2010), "Mutations in TSPAN12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy", *American Journal of Human Genetics*, **86**(2), pp.248-253, DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.01.012.
- [24] E.S. Panagiotou, C.S. Soriano, J.A. Poulter, et al. (2017), "Defects in the cell signaling mediator β -catenin cause the retinal vascular condition FEVR", *American Journal of Human Genetics*, **100**(6), pp.960-968, DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.05.001.
- [25] L. Zhang, X. Zhang, H. Xu, et al. (2020), "Exome sequencing revealed Notch ligand JAG1 as a novel candidate gene for familial exudative vitreoretinopathy", *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, **22**(1), pp.77-84, DOI: 10.1038/s41436-019-0571-5.
- [26] H. Kondo, I. Matsushita, T. Tahira, et al. (2016), "Mutations in ATOH7 gene in patients with nonsyndromic congenital retinal nonattachment and familial exudative vitreoretinopathy", *Ophthalmic Genetics*, **37**(4), pp.462-464, DOI: 10.3109/13816810.2015.1120316.
- [27] T. Yamane, T. Yokoi, Y. Nakayama, et al. (2014), "Surgical outcomes of progressive tractional retinal detachment associated with familial exudative vitreoretinopathy", *American Journal of Ophthalmology*, **158**(5), pp.1049-1055, DOI: 10.1016/j.ajo.2014.08.009.

Ảnh hưởng của phospholipase C zeta (PLC ζ) đến khả năng thụ tinh và cải thiện kỹ thuật hỗ trợ sinh sản trên người

Nguyễn Thanh Bình^{1,2*}, Ngô Thái Minh Quân², Dương Thị Phương Thanh²

¹Khoa Y Dược, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn On, phường Phú Hòa, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

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

Ngày nhận bài 25/10/2021; ngày chuyển phản biện 1/11/2021; ngày nhận phản biện 25/11/2021; ngày chấp nhận đăng 2/12/2021

Tóm tắt:

Sự hình thành sóng dao động nồng độ Ca^{2+} nội bào (Ca^{2+} oscillations) dẫn đến quá trình hoạt hóa noãn và chuẩn bị cho sự hình thành các giai đoạn sớm của phôi. Phospholipase C zeta (PLC ζ) đóng vai trò quan trọng đối với khả năng thụ tinh. Những báo cáo lâm sàng cho thấy, có mối liên hệ giữa PLC ζ bị khiếm khuyết và vô sinh ở nam giới. Đặc biệt, thiếu hụt yếu tố hoạt hóa noãn (OAD) được đề cập là nguyên nhân gây thất bại của nhiều trường hợp điều trị vô sinh bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI). Một số kết quả về các tiến bộ trong nghiên cứu và ứng dụng lâm sàng được phân tích tổng hợp trong bài viết này: PLC ζ - yếu tố hoạt hóa noãn từ tinh trùng, cấu trúc của PLC ζ , kiểu khu trú của PLC ζ trong tinh trùng, PLC ζ bị khiếm khuyết và vô sinh nam, ứng dụng lâm sàng của PLC ζ trong điều trị và cải tiến quy trình thụ tinh trên người. Đồng thời, các tác giả tổng kết và phân tích các kết quả nghiên cứu và ứng dụng hỗ trợ cho quá trình điều trị hiếm muộn trên cơ sở cải tiến về tinh trùng qua yếu tố PLC ζ - tinh trùng. Bên cạnh đó, thảo luận hướng sử dụng PLC ζ nhằm giúp cho các nhà phôi học, lâm sàng, nghiên cứu viên cải tiến quy trình tạo phôi, mang lại kết quả tốt nhất cho bệnh nhân, đặc biệt trong trường hợp phôi hiếm.

Từ khóa: hoạt hóa noãn, kỹ thuật hỗ trợ sinh sản, phospholipase C zeta, sự thụ tinh, tinh trùng.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Ở người và động vật có vú, thụ tinh là một quá trình bao gồm nhiều giai đoạn liên kết, mang ý nghĩa sự kết hợp của tinh trùng với noãn sẽ tạo ra cá thể sinh vật mới. Khi một giai đoạn bất kỳ bị gián đoạn, quá trình thụ tinh sẽ có nguy cơ thất bại [1]. Thuật ngữ “sự hoạt hóa noãn” biểu đạt giai đoạn diễn ra các sự kiện sinh hóa để noãn phát triển thành phôi sau khi 2 giao tử kết hợp [2]. Sự kiện phát tín hiệu đầu tiên và vô cùng quan trọng ở giai đoạn hoạt hóa noãn là hiện tượng gia tăng nồng độ ion canxi (Ca^{2+}) nội bào nhanh chóng rồi tạo thành sóng dao động [2]. Để đáp ứng thay đổi đột ngột về nồng độ Ca^{2+} , các sự kiện sinh hóa xảy ra nhằm chuẩn bị cho giai đoạn phát triển phôi sớm [2, 3]. Hiện tại, PLC ζ trong tinh trùng được ủng hộ mạnh mẽ là yếu tố tạo ra sóng dao động Ca^{2+} nội bào và khởi động giai đoạn hoạt hóa noãn. Các nghiên cứu nổi bật đã đề cập PLC ζ tạo ra sóng dao động Ca^{2+} thông qua con đường tín hiệu inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) [3, 4].

Theo ước tính, cứ 7 cặp vợ chồng sẽ có 1 cặp mắc phải tình trạng hiếm muộn [1]. Các trường hợp vô sinh ở nam giới được đánh giá ngày càng tăng cao khi khoảng 15% cặp vợ chồng gặp khó khăn về sinh sản thì tỷ lệ nam giới mắc vô sinh là khoảng 7% [3, 4]. Việc sử dụng các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART) như thụ tinh nhân tạo (IVF) đã mang lại kết quả khả quan cho những cặp vợ chồng hiếm muộn. Dù vậy, vẫn còn nhiều trường hợp chưa điều trị thành công, đáng chú ý, vô sinh nam rất nặng chiếm 19-57% số trường hợp trên [2-4]. Đối với các bệnh nhân nam có rất ít

tinh trùng hoặc tinh trùng rất yếu hay dị dạng nặng, kỹ thuật ICSI được sử dụng để tiêm trực tiếp tinh trùng chọn lọc vào bào tương noãn. Tuy nhiên, 1-5% các chu kỳ điều trị ICSI vẫn thất bại [1, 4]. Nguyên nhân chính cản trở điều trị vô sinh bằng ICSI là do thiếu hụt yếu tố hoạt hóa noãn dẫn đến thụ tinh thất bại [1-4].

Mặc dù còn các yếu tố từ noãn hoặc tự nhiên khác cũng có khả năng gây thụ tinh thất bại sau khi ICSI, nhưng PLC ζ trong tinh trùng là yếu tố thường được quan tâm, vì trong các ca bệnh, noãn kết hợp với tinh trùng không chứa hoặc chứa PLC ζ bị khiếm khuyết thì sóng dao động Ca^{2+} đặc trưng không xuất hiện để khởi động sự hoạt hóa noãn [1, 4].

Trong phần tổng hợp về vai trò quan trọng của PLC ζ trong thụ tinh, chúng tôi sẽ phân tích và tổng hợp mối liên hệ giữa các dạng PLC ζ bị khiếm khuyết và những trường hợp vô sinh nam. Bên cạnh đó, chúng tôi thảo luận hướng sử dụng những cơ sở khoa học vào việc nghiên cứu PLC ζ cũng như cách ứng dụng chất này để tiếp cận các tiến bộ nhằm cải tiến trong nghiên cứu và thực hành lâm sàng, cải thiện tỷ lệ thụ tinh bằng các kỹ thuật ART.

2. Các tiến bộ trong nghiên cứu

2.1. PLC ζ - yếu tố hoạt hóa noãn từ tinh trùng

Trong thụ tinh ở người và động vật có vú, tinh trùng có một chức năng quan trọng là hoạt hóa noãn [1]. Sau khi 2 giao tử kết hợp, một sự gia tăng nồng độ Ca^{2+} xuất hiện trong tế bào chất của noãn [2]. Hiện tượng này tạo ra các tín hiệu kích hoạt

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

A review: Phospholipase C zeta (PLCζ) impacts fertilisation and improves human-assisted reproductive technology

Thanh Binh Nguyen^{1,2*}, Thai Minh Quan Ngo²,
Thi Phuong Thanh Duong²

¹Faculty of Medicine and Pharmacy, Thu Dau Mot University,
6 Tran Van On Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

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

Received 25 October 2021; revised 25 November 2021; accepted 2 December 2021

Abstract:

The change of concentration of intracellular Ca^{2+} oscillations leads to oocyte activation and preparation for early embryogenesis. Phospholipase C zeta (PLCζ) plays an essential role in fertilisation. Clinical reports have suggested a link between defective PLCζ and male infertility. In particular, oocyte activation deficiency was mentioned as the cause of failure in many cases of infertility treated with intracytoplasmic sperm injection. Some results about advances in research and clinical applications were reviewed in this article, including PLCζ - Sperm oocyte activating factor, the structure of PLCζ, localisation of PLCζ in sperm, defective PLCζ and relation to male infertility, and clinical applications of PLCζ in treatment and improvement of human insemination procedures. At the same time, the authors summarised and analysed research results and applications to support infertility treatment on the basis of sperm improvement through PLCζ - sperm factor. Finally, the authors discussed the direction of using PLCζ to help embryologists, clinicians, and researchers improve the embryogenesis process, with the aim to bring the best results for patients, especially in the case of rare embryos.

Keywords: assisted reproductive technology, fertilisation, oocyte activation, phospholipase C zeta, sperm.

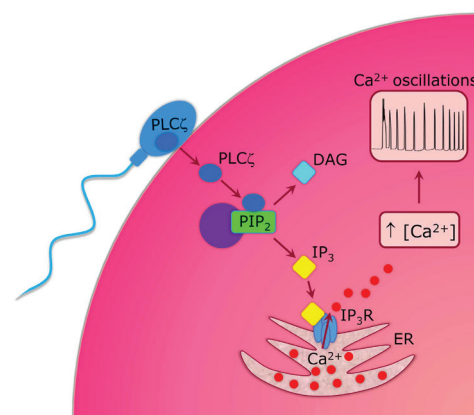
Classification number: 3.1

chuỗi sự kiện trong giai đoạn hoạt hóa noãn như sự xuất bào tế bào hạt để ngăn đa thụ tinh, kế tiếp là sự hoàn thành giảm phân và hình thành các tiền nhân [2]. Quá trình theo dõi cho thấy, tín hiệu Ca^{2+} khởi động sự hoạt hóa noãn có tính chu kỳ và tạo thành một chuỗi bước sóng lặp lại nên được gọi là sóng dao động Ca^{2+} . Thời gian xuất hiện và tần số của sóng dao động Ca^{2+} có tính đặc trưng riêng cho từng loài khác nhau [1, 4].

Trong quá khứ, một số giả thuyết đã được đưa ra để giải thích nguyên nhân xuất hiện sóng dao động Ca^{2+} khi thụ tinh. Theo thời gian, các giả thuyết dần bị bác bỏ nhưng một giả

thuyết gọi là “yếu tố từ tinh trùng” vẫn được ủng hộ nhờ vào các thử nghiệm trên mô hình động vật [1]. Giả thuyết này giải thích một yếu tố có tính hòa tan trong phần đầu tinh trùng được đưa vào tế bào chất của noãn ngay hoặc sau khi 2 giao tử kết hợp [1, 3]. Yếu tố từ tinh trùng được đề xuất có khả năng tạo ra sóng dao động Ca^{2+} thông qua hình thành IP_3 từ sự thủy phân phosphatidylinositol 4,5- biphosphate (PIP_2). Sự tạo thành sóng dao động Ca^{2+} theo con đường tín hiệu IP_3 làm xuất hiện đề xuất yếu tố từ tinh trùng là một isoform thuộc nhóm enzyme phospholipase C (PLC) [1].

Năm 2002, dựa trên việc tìm kiếm tính tương đồng với các trình tự mã hóa những PLC isoform đã biết trong cơ sở dữ liệu của chuột nhắt, các nhà khoa học đã phân lập thành công cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid) của PLC isoform mới [1, 3, 5]. PLC isoform được phát hiện là PLCζ. Enzyme này được đề xuất là yếu tố từ tinh trùng chịu trách nhiệm hoạt hóa noãn sau khi nhóm tác giả thực hiện vi tiêm cRNA (Complementary ribonucleic acid) mã hóa PLCζ vào noãn của chuột nhắt và ghi nhận có sóng dao động Ca^{2+} trong tế bào chất. Mặt khác, tần số của sóng dao động Ca^{2+} đã được chứng minh là tăng lên khi thêm lượng cRNA vi tiêm, ngược lại, sự gia tăng Ca^{2+} nội bào cũng được chứng minh là không xảy ra nếu sử dụng chất ức chế quá trình tổng hợp PLC isoform mới. Ngoài ra, kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy noãn của chuột nhắt có thể hình thành các tiền nhân và phát triển đến giai đoạn blastocyst sau khi tiêm cRNA mã hóa PLCζ [1, 3, 5]. Hiện tại, cơ chế hoạt động của PLCζ để tạo ra sóng dao động Ca^{2+} đã được đề xuất và có tính phổ biến trong các báo cáo độc lập. Sau khi tinh trùng kết hợp với noãn, PLCζ được giải phóng từ phần đầu tinh trùng vào tế bào chất của noãn. Enzyme đặc hiệu cho tinh trùng định vị các màng túi nội bào có chứa PIP_2 và thủy phân cơ chất này. Phản ứng xúc tác của PLCζ tạo ra các chất truyền tin thứ 2 là IP_3 và diacylglycerol (DAG). IP_3 tiếp tục gắn với thụ thể (IP_3R) trên màng lưới nội chất (ER), sự tương tác này khiến kênh ion mở ra và giải phóng Ca^{2+} từ lưới nội chất ra tế bào chất của noãn. Tập hợp các đợt gia tăng nồng độ Ca^{2+} nội bào tạo thành sóng dao động và đây cũng là tín hiệu để sự hoạt hóa noãn khởi động (hình 1) [2-4].

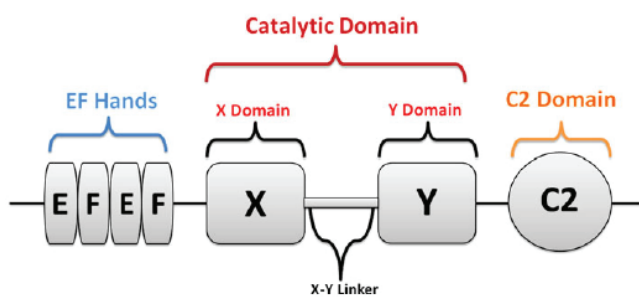


Hình 1. Biểu đồ biểu diễn PLCζ khởi động sự hoạt hóa noãn [2].

Cấu trúc của PLC ζ

PLC ζ có khả năng tạo sóng dao động Ca^{2+} vượt trội nhưng enzyme này vẫn có hầu hết các loại miền cấu trúc cơ bản như những PLC isoform khác [2, 3]. Điểm khác biệt nổi bật về thành phần cấu trúc của PLC ζ là sự vắng mặt miền PH (Pleckstrin homology) [2, 3]. Ngoài ra, PLC ζ là isoform nhỏ nhất ở các loài, với của người, kích thước là khoảng 70 kDa [4, 6].

Thành phần cấu trúc của PLC ζ bao gồm 4 miền EF-hand ở đầu tận cùng N, 1 miền C2 ở đầu tận cùng C. Ở giữa phân tử là miền xúc tác X và Y cùng liên kết X-Y (hình 2). Các miền cấu trúc của PLC ζ đều có vai trò thiết yếu riêng, giúp enzyme này thực hiện chức năng sinh học và có chế độ điều hòa đặc biệt [2, 3].



Hình 2. Sơ đồ biểu diễn các miền cấu trúc của PLC ζ [6].

Mỗi miền EF-hand có 2 chuỗi xoắn alpha và 1 vòng lặp. Chức năng của các chuỗi này là gắn với các Ca^{2+} , vì thế độ nhạy cảm cao của PLC ζ đối với Ca^{2+} phụ thuộc vào vai trò của các miền EF-hand [1-3]. Khác với các isoform còn lại trong nhóm PLC, độ nhạy cảm cao đối với Ca^{2+} cho phép PLC ζ vẫn hoạt động trong tế bào chất có nồng độ Ca^{2+} thấp. Ngoài ra, miền EF-hand đầu tiên có chứa một số gốc amino acid đặc biệt, cùng với liên kết X-Y, các thành phần cấu trúc này hỗ trợ PLC ζ tương tác với các màng chứa cơ chất PIP_2 [1-3].

Miền X và Y là 2 thành phần cấu trúc thể hiện khả năng xúc tác của PLC ζ . Các miền xúc tác đóng vai trò giúp PLC ζ thực hiện phản ứng thủy phân PIP_2 . Đối với tất cả PLC isoform thuộc động vật có vú, X và Y là các miền được bảo tồn cao nhất. Tuy sự giống nhau về trình tự giữa các miền xúc tác của PLC ζ với các miền xúc tác của PLC isoform khác đạt đến 60% nhưng nếu thay thế 2 miền X và Y (kèm liên kết X-Y) của PLC ζ bằng 2 miền tương ứng của PLC isoform khác thì khả năng tạo ra sóng dao động Ca^{2+} trong noãn chuột nhắt bị mất đi [1-3].

Khác với 2 miền xúc tác, liên kết X-Y là một đoạn trình tự ngắn có độ bảo tồn thấp. Liên kết X-Y có nhiều vai trò quan trọng khi tham gia hỗ trợ khả năng điều hòa hoạt tính xúc tác và khả năng di chuyển qua lỗ nhân của PLC ζ . Bên cạnh đó, liên kết X-Y chứa các gốc amino acid mang điện tích dương, giúp làm tăng khả năng định vị cơ chất PIP_2 và tạo tương tác tĩnh điện giữa PLC ζ với các màng nội bào [1-3].

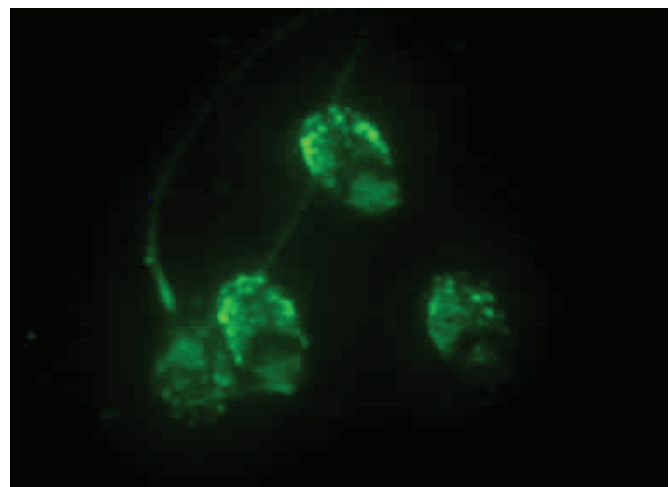
Số lượng amino acid của miền C2 gồm khoảng 120 gốc đơn vị. Dù vai trò chính của miền C2 vẫn chưa được kết luận, nhưng

miền này được cho là có ảnh hưởng mạnh đến chức năng khởi động sự hoạt hóa noãn của PLC ζ . Vì khi xóa bỏ hoặc thay thế miền C2 của PLC ζ với C2 của PLC $\delta 1$ thì khả năng tạo ra sóng dao động Ca^{2+} của PLC ζ bị mất, nhưng hoạt tính xúc tác và độ nhạy cảm với Ca^{2+} là không đổi. Sau khi phát hiện miền C2 có tương tác với phospholipid trên màng sinh chất như phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) hay phosphatidylinositol-5-phosphate (PI5P), đã có nhận xét cho rằng miền C2 có thể đóng vai trò hỗ trợ PLC ζ định vị màng chứa cơ chất hoặc miền này có thể tham gia vào sự điều hòa hoạt tính của PLC ζ [1-3].

2.3. Sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng

Kết quả phân tích sinh học phân tử trong báo cáo phát hiện PLC ζ cho thấy, mRNA mã hóa PLC ζ và sự biểu hiện của PLC ζ lần lượt cho phản ứng ở tinh hoàn và tinh trùng của chuột nhắt [5]. Các kết quả phân tích tương tự ở lợn và ngựa sau đó cho thấy, sự tổng hợp PLC ζ có tính đặc hiệu cho từng loài và liên quan đến quá trình sinh tinh của động vật có vú nói chung [3, 6]. Đến nay, kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang đã được sử dụng rộng rãi để xác định kiểu khu trú (hay sự định vị) của PLC ζ trong tinh trùng của các loài, đặc biệt là trong tinh trùng của người [3, 4].

PLC ζ được xác định phổ biến nhất ở các vùng khác nhau thuộc phần đầu tinh trùng, điều này có thể lý giải chức năng của PLC ζ được thể hiện ngay lập tức hoặc không quá lâu sau khi 2 giao tử kết hợp [1, 3]. Ngoài ra, một số báo cáo ghi nhận tín hiệu hiển thị của PLC ζ có ở phần thân và đuôi tinh trùng [1, 3]. Đối với chuột nhắt, các báo cáo đạt thống nhất khi đều xác định PLC ζ có ở các vị trí trong vùng acrosome và thuộc phần đầu tinh trùng. Tuy nhiên, đối với tinh trùng của người và động vật có vú khác, các vị trí tạo thành kiểu khu trú đặc trưng của PLC ζ vẫn đang gây tranh cãi. Theo một loạt các báo cáo độc lập, PLC ζ trong tinh trùng của người từng được ghi nhận phân bố trong vùng acrosome, post-acrosome, đoạn xích đạo (equatorial segment) và cả phần đuôi [1, 3, 4, 6]. Trong tinh trùng đầu tròn của một số bệnh nhân vô sinh, PLC ζ được xác định phân bố ở đoạn midpiece thuộc phần thân và có một số tín hiệu hiển thị ở phần đầu [3, 7].



Hình 3. Sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng lợn được phát hiện bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang.

Hình 3 thể hiện sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng lợn được phát hiện bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang.

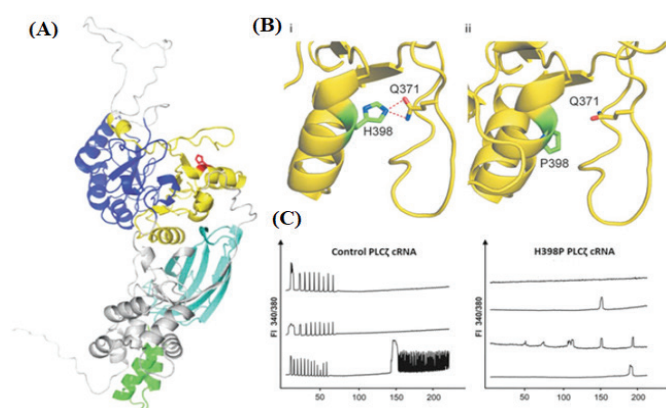
PLC ζ được tìm thấy có mặt ở đầu tinh trùng, trong acrosome và post-acrosome (20X10). Cần lưu ý sự mâu thuẫn giữa những kết quả nghiên cứu về kiểu khu trú của PLC ζ trong tinh trùng của người vì các báo cáo ghi nhận chỉ một loại kháng thể được sử dụng [1, 3, 4]. Có khả năng mỗi nghiên cứu thực hiện các protocol khác nhau hoặc sử dụng các kháng thể đa dòng có tính đặc hiệu thấp là nguyên nhân gây ra mâu thuẫn về sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng. Từ vấn đề này, các kháng thể đa dòng có tính đặc hiệu cao với epitope trong PLC ζ của người và động vật có vú đã được phát triển và tạo ra hy vọng về việc các báo cáo nơi phân bố của PLC ζ trong tinh trùng, đặc biệt là của người sẽ có tính thống nhất hơn [1, 3, 4]. Tiêu biểu cho cải tiến phương pháp nghiên cứu, J. Kashir và cs (2017, 2020) [4, 8] đã kết hợp protocol antigen unmasking (AUM) với kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang để xác định và tăng cường khả năng hiển thị kiểu khu trú của PLC ζ trong tinh trùng của người, lợn và chuột nhắt.

2.4. PLC ζ bị khiếm khuyết và vô sinh nam

Đã có những bằng chứng khoa học cho thấy, hàm lượng và trạng thái của PLC ζ mang ý nghĩa quyết định tinh trùng kích hoạt noãn thành công. Khi đánh giá những trường hợp vô sinh nam, các dạng PLC ζ bị khiếm khuyết thường được đề cập với tinh trùng có tính chất sinh lý và sinh hóa bất thường [1, 3, 4].

Tinh trùng của một số bệnh nhân điều trị ICSI thất bại đã được Yoon và cs (2008) [9] tiêm vào noãn của chuột nhắt, nhưng kết quả không có sự xuất hiện của sóng dao động Ca^{2+} . Bên cạnh việc không tìm thấy sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng của các bệnh nhân, nhóm tác giả báo cáo PLC ζ có mức độ biểu hiện rất thấp hoặc không biểu hiện khi thực hiện phân tích định lượng.

Lần đầu tiên trình tự mã hóa PLC ζ bị khiếm khuyết được xác định là khi các nhà khoa học phát hiện một đột biến dị hợp tử ở một bệnh nhân nam có tinh trùng không thể kích hoạt noãn bình thường sau khi ICSI [1, 3, 10]. Bằng cách mô hình hóa cấu trúc của PLC ζ , nhóm tác giả mô tả đột biến này làm Histidine ở vị trí 389 thuộc miền xúc tác Y bị thay thế thành Proline (H389P) (hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của đột biến H389P đến PLC ζ [10]. (A) Mô hình 3D mô tả các miền cấu trúc của PLC ζ ; **(B)** Đột biến trên trình tự mã hóa PLC ζ làm Histidine ở vị trí 389 thuộc miền xúc tác Y bị thay thế thành Proline; **(C)** Tín hiệu Ca^{2+} trong noãn chuột sau khi vi tiêm cRNA mã hóa PLC ζ và cRNA mã hóa PLC ζ bị khiếm khuyết do đột biến.

Không lâu sau đó, Saleh và cs (2020) [3] và J. Kashir và cs (2012b) [11] đã báo cáo đột biến dị hợp tử thứ hai được di truyền theo dòng mẹ ở cùng bệnh nhân trên. Kết quả giải trình tự cho thấy, đột biến này xuất hiện tại trình tự khung đọc mở (ORF) và làm Histidine tại vị trí 233 thuộc miền xúc tác X bị thay thế thành Leucine (H233L). Giống như đột biến H389P, amino acid tại vị trí xảy ra sự thay thế do đột biến H233L cũng mất đi các liên kết với amino acid bên cạnh (hình 4). Mặt khác, khi thử nghiệm trên noãn của chuột nhắt, các PLC ζ được mã hóa từ cRNA mang 2 đột biến trên không cho thấy khả năng hoạt hóa noãn. Nguyên nhân ảnh hưởng đến chức năng sinh học của PLC ζ là do 2 đột biến làm xuất hiện các sự thay thế trên miền xúc tác X và Y, hậu quả là cấu trúc của enzyme bị phá vỡ dẫn đến hoạt tính thủy phân PIP $_2$ bị suy giảm và không thể tạo sóng dao động Ca^{2+} đặc trưng [1, 3, 11].

Đột biến đồng hợp tử ở trình tự mã hóa PLC ζ được báo cáo từ một nghiên cứu về trường hợp 2 anh em cùng bị vô sinh và tinh trùng của họ không thể thụ tinh sau khi ICSI [1, 3, 12]. Đột biến này làm Isoleucine ở vị trí 489 trên miền C2 bị thay thế thành Phenylalanine (I489F). Kết quả từ nghiên cứu cho thấy, PLC ζ bị ảnh hưởng bởi đột biến I489F tạo ra sóng dao động Ca^{2+} bất thường, vì thế giai đoạn hoạt hóa noãn bị lỗi dẫn đến các giai đoạn phát triển sớm của phôi bị dừng lại. Nghiên cứu cũng xác nhận không có mối liên hệ nào giữa trường hợp vô sinh trên và PAWP - 1 protein khác cũng được đề xuất là yếu tố hoạt hóa noãn từ tinh trùng, qua đó góp phần làm bằng chứng ủng hộ vai trò đặc biệt quan trọng của PLC ζ trong thụ tinh [1, 3, 12].

Trong một báo cáo gần đây [4], số lượng đột biến trên trình tự mã hóa PLC ζ được phát hiện nhiều hơn ở các nghiên cứu độc lập. Phần lớn các đột biến xuất hiện ở những bệnh nhân nam có tinh trùng không chứa hoặc chứa rất ít hàm lượng PLC ζ và họ được chẩn đoán vô sinh do mắc phải tình trạng không có hoặc có sự hoạt hóa noãn lỗi dẫn đến thụ tinh thất bại. Phân tích ở mức độ phân tử đã giải thích các đột biến làm xuất hiện những thay đổi tiêu cực trên các miền cấu trúc như mất đi một đoạn hoặc cả miền, khiến vai trò thiết yếu của các miền này đối với chức năng và sự điều hòa hoạt động của PLC ζ bị ảnh hưởng. Ở một số trường hợp vô sinh nam khác, mức độ liên hệ đáng kể được thể hiện giữa hàm lượng, sự phân bố bất thường của PLC ζ và các tình trạng ảnh hưởng xấu đến sinh sản như phân mảnh DNA tinh trùng hoặc chỉ số xét nghiệm tinh dịch đồ có giá trị thấp [4].

3. Ứng dụng lâm sàng của PLC ζ

3.1. Phương pháp điều trị thiếu hụt hoạt hóa noãn

Ở một số quốc gia đang phát triển, ART làm tăng tỷ lệ sinh lên khoảng 7% nên những cặp vợ chồng hiếm muộn thường tìm kiếm sự giúp đỡ ở các cơ sở hỗ trợ sinh sản [4, 13]. Để khắc phục tình trạng các chu kỳ điều trị ICSI thất bại do thiếu hụt hoạt hóa noãn, những phương pháp hoạt hóa noãn nhân tạo (AOA) đã được sử dụng trong các phòng khám thụ tinh nhân tạo [1, 4, 13]. Thực tế, phương pháp AOA sử dụng hóa chất được xem là áp dụng thành công ở các trường hợp thụ tinh thất bại do không thể khởi động sự hoạt hóa noãn bình thường. Với phương pháp AOA này, noãn được xử lý bằng các hóa chất như calcium ionophore A23187,

ionomycin, purimycin, strontium chloride để làm tăng nồng độ Ca^{2+} bên trong tế bào chất [1, 4, 13]. Tuy nhiên, độ an toàn khi sử dụng phương pháp này tạo ra nỗi lo lắng cho người thực hiện và người điều trị. Sự hoài nghi về việc liệu phôi và trẻ em sẽ phát triển khỏe mạnh không là dễ hiểu khi các yếu tố hóa học có thể tiềm ẩn khả năng gây độc tế bào, gây đột biến hoặc gây quái thai [1, 6]. Mặc dù một số báo cáo đã nhận xét việc kết hợp phương pháp AOA này và kỹ thuật ICSI không gây ảnh hưởng xấu lên noãn, thậm chí còn cải thiện đáng kể tỷ lệ thụ tinh và sinh nhưng việc kết hợp này vẫn được báo cáo là không áp dụng thành công ở tất cả các trường hợp gặp khó khăn về hoạt hóa noãn [1, 3, 13]. Bên cạnh đó, tính hiệu quả của phương pháp AOA sử dụng hóa chất cũng không đạt tuyệt đối khi calcium ionophore và strontium chloride không tạo ra sóng dao động Ca^{2+} mang tính sinh lý đặc trưng như trong sự hoạt hóa noãn bình thường [1, 3].

Để bổ sung cho những khía cạnh còn gây tranh cãi của phương pháp AOA sử dụng hóa chất, PLCζ tái tổ hợp của người (hPLCζ) là chất đầy tiềm năng cho các phương pháp điều trị lâm sàng ở những trường hợp xảy ra thiếu hụt hoạt hóa noãn [1, 3, 4]. Hơn một thập kỷ qua, việc sản xuất hPLCζ tinh khiết và mang hoạt tính cao đã đạt thành tựu nhất định [3]. Năm 2013, M. Nomikos và cs (2013) [14] đã sản xuất thành công hPLCζ và chứng minh sản phẩm này có thể tạo ra sóng dao động Ca^{2+} đặc trưng trong noãn chuột nhắt và noãn người. Nhóm tác giả cũng đã chứng minh hPLCζ có khả năng khắc phục sự hoạt hóa noãn bị lỗi do đột biến và giúp sự phát triển phôi tiếp tục tiến đến giai đoạn blastocyst [14]. Trong một báo cáo [15] nhằm đánh giá hiệu quả cải thiện tỷ lệ thụ tinh và sự phát triển phôi đối với noãn đã ICSI kết hợp xử lý nhiệt, phương pháp vi tiêm hPLCζ vào noãn đã được so sánh với phương pháp xử lý noãn bằng calcium ionophores. Kết quả cho thấy, cả 2 phương pháp đều cải thiện sự hoạt hóa noãn nhưng hPLCζ được đánh giá có tính hiệu quả cao hơn calcium ionophores.

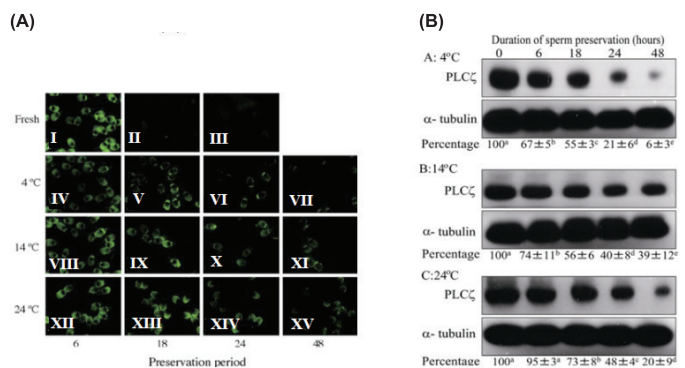
3.2. Dấu ấn sinh học

Tiềm năng sử dụng PLCζ như một dấu ấn sinh học đã được thể hiện trong các nghiên cứu về phân tích và đánh giá hình thái cùng chức năng của tinh trùng ở người. PLCζ đã làm dấu ấn biểu hiện trong một nghiên cứu áp dụng kỹ thuật đánh giá hình thái tinh trùng đi động (MSOME) trên các tinh trùng đầu tròn [7]. Các kết quả phân tích định lượng đối với tinh trùng đã được xử lý bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang cho thấy, tổng hàm lượng của PLCζ biểu hiện trong tinh trùng đầu tròn được và không được lựa chọn bởi MSOME có sự khác biệt đáng kể [4, 7]. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu còn cho biết, việc lựa chọn tinh trùng đầu tròn có sự biểu hiện của PLCζ bằng MSOME có thể tác động đến hiệu quả điều trị của một ART khác là kỹ thuật tiêm tinh trùng có chọn lọc (IMSI). Theo đó, MSOME có thể lựa chọn những tinh trùng đầu tròn có hàm lượng PLCζ đủ để kích hoạt noãn, khi những tinh trùng này được sử dụng trong IMSI thì tỷ lệ thụ tinh được cải thiện mà không cần áp dụng phương pháp AOA sử dụng hóa chất [7].

Trong một báo cáo, J. Kashir và cs (2013) [16] đã trình bày kết quả phân tích định lượng huỳnh quang đối với PLCζ trong tinh trùng của những người đàn ông có khả năng sinh sản bình thường và những bệnh nhân nam điều trị ICSI thất bại do thiếu hụt yếu tố hoạt hóa noãn. Cụ thể, tỷ lệ trung bình của tinh trùng khỏe mạnh có sự biểu hiện của PLCζ (82,6%) cao hơn tỷ lệ trung bình của tinh trùng có sự biểu hiện PLCζ ở những bệnh nhân (27,4%) ($p \leq 0,05$). Trong một báo cáo khác, S. Yelumalai và cs (2015) [17] nhận xét có tương quan đồng biến giữa tỷ lệ thụ tinh sau ICSI với tổng hàm lượng của PLCζ, kiểu khu trú của PLCζ và tỷ lệ tinh trùng dùng để điều trị ICSI có sự biểu hiện của PLCζ. Việc phân tích và đánh giá các biến định lượng của PLCζ trong các báo cáo trên cho thấy, enzyme này có thể thực hiện vai trò như một dấu ấn sinh học để tiên lượng tỷ lệ thụ tinh của những bệnh nhân điều trị ICSI [1, 3, 4].

Trước đây, chúng tôi đã sử dụng PLCζ như một dấu ấn sinh học để đánh giá sự ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản tinh trùng bằng hóa chất lỏng đến khả năng hoạt hóa noãn và khởi động sự phát triển phôi sớm [18]. Để thực hiện mục tiêu nghiên cứu, chúng tôi tiến hành bảo quản tinh trùng của lợn trong hóa chất ở các nhiệt độ 4, 14 và 24°C với thời gian bảo quản tối đa là 48 giờ. Bằng cách sử dụng các chất nhuộm huỳnh quang, chúng tôi nhận thấy màng sinh chất bao quanh khu vực acrosome và post-acrosome của tinh trùng dần bị phá hủy nếu kéo dài thời gian bảo quản. Chúng tôi cũng đã xác định kiểu khu trú của PLCζ trong tinh trùng của lợn là khu vực acrosome và khu vực post-acrosome. Đáng chú ý, cường độ tín hiệu huỳnh quang hiển thị kiểu khu trú của PLCζ và hàm lượng PLCζ trong tinh trùng được bảo quản ở các mức nhiệt độ đều bị suy giảm theo các mức độ khác nhau khi tăng thời gian bảo quản (hình 5).

Sau khi sử dụng các tinh trùng đã bảo quản để thực hiện ICSI, chúng tôi ghi nhận tỷ lệ hoạt hóa noãn, tỷ lệ hình thành tiền nhân được, tỷ lệ phát triển phôi đến giai đoạn blastocyst đạt giá trị cao nhất đối với trường hợp tinh trùng được bảo quản ở 24°C trong 18 giờ. Như vậy, chúng tôi kết luận rằng, việc bảo quản tinh trùng của lợn bằng hóa chất lỏng trong điều kiện thích hợp sẽ phá hủy màng sinh chất của tinh trùng, phóng thích nhanh hàm lượng PLCζ vừa đủ để hoạt hóa noãn và cải thiện sự phát triển phôi sau khi ICSI [18].



Hình 5. Kiểu khu trú của PLCζ trong tinh trùng của lợn sau khi bảo quản ở nhiệt độ theo thời gian (A) và ảnh hưởng của hàm lượng PLCζ đến kết quả thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi nang sau khi ICSI (B) [18].

4. Kết luận

Khi giai đoạn hoạt hóa noãn không thể diễn ra theo cách tự nhiên do yếu tố khởi động bị khiếm khuyết thì các phương pháp tạo sóng dao động Ca^{2+} nhân tạo có thể được xem xét sử dụng để khắc phục vấn đề. Việc chưa có bất kỳ nghiên cứu nào trong nước hoặc quốc tế chứng minh xử lý noãn bằng hóa chất sẽ có hại cho phôi và các thể hệ trẻ em sinh ra là tín hiệu đáng mừng cho các cặp vợ chồng có ý định điều trị hiếm muộn bằng phương pháp AOA này. Trong khi chờ đợi những nghiên cứu đánh giá toàn diện hơn về tính hiệu quả và độ an toàn của các phương pháp AOA, một giải pháp tiềm năng khác cho các trường hợp mắc hoạt hóa noãn là sử dụng hPLC ζ như công cụ hỗ trợ điều trị lâm sàng. Tuy nhiên, bên cạnh kế hoạch ứng dụng hPLC ζ từ mô hình thí nghiệm đến việc sử dụng rộng rãi trong các cơ sở hỗ trợ sinh sản, quá trình nghiên cứu hPLC ζ cần được thực hiện cẩn thận hơn nhằm loại bỏ các khả năng gây hại cho tế bào hay phôi.

Việc sử dụng PLC ζ như một dấu ấn sinh học chẩn đoán mang tính khả thi cao vì các phương pháp phân tích định lượng chất này thường chỉ yêu cầu áp dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang. Bằng cách sử dụng PLC ζ như một công cụ tiên lượng tỷ lệ hoạt hóa noãn, tỷ lệ thụ tinh, phát triển phôi, các quy trình ART như ICSI sẽ được thiết kế và thực hiện hợp lý hơn, từ đó tiết kiệm thời gian và chi phí trong việc điều trị các trường hợp vô sinh nam. Hơn thế nữa, sự so sánh kết quả phân tích PLC ζ với tinh dịch đồ có thể dùng để đánh giá sức khỏe tinh trùng của cả nam giới khỏe mạnh và vô sinh.

Khả năng tạo Ca^{2+} vượt trội trong noãn nhưng lại không thể hiện bất kỳ hoạt tính xúc tác nào trong tinh trùng đã đặt ra câu hỏi liệu trong tinh trùng có chất ức chế hoạt động của PLC ζ hoặc có tồn tại một yếu tố chưa được biết từ noãn có thể tương tác với PLC ζ và cùng tham gia khởi động sự hoạt hóa noãn trong thụ tinh? Rõ ràng, những thành tựu về sinh học phân tử, sinh học tế bào, sinh học sinh sản cần được áp dụng đối với các nghiên cứu về PLC ζ trong tương lai vì việc khám phá enzyme này không chỉ có ý nghĩa bổ sung những hiểu biết về sự thụ tinh của động vật có vú mà còn thể hiện các tiến bộ lớn trong nghiên cứu và thực hành lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M. Nomikos, K. Swann, F.A. Lai (2017), "Fundamental role for sperm phospholipase C ζ at mammalian fertilization", *The Sperm Cell*, Cambridge University Press, **12**, pp.177-192.

[2] M. Nomikos, J. Kashir, F.A. Lai (2017), "The role and mechanism of action of sperm PLC-zeta in mammalian fertilisation", *Biochemical Journal*, **474**(21), pp.3659-3673, DOI: 10.1042/BCJ20160521.

[3] A. Saleh, J. Kashir, A. Thanassoulas, et al. (2020), "Essential role of sperm-specific PLC-zeta in egg activation and male factor infertility: An update", *Frontier in Cell and Developmental Biology*, **8**(28), DOI: 10.3389/fcell.2020.00028.

[4] J. Kashir (2020), "Increasing associations between defects in phospholipase C zeta and conditions of male infertility: Not just ICSI failure?", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **37**(6), pp.1273- 1293, DOI: 10.1007/s10815-020-01748-z.

[5] C.M. Saunders, M.G. Larman, J. Parrington, et al. (2002), "PLC ζ : A sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development", *Development*, **129**(15), pp.3533-3544, DOI: 10.1242/dev.129.15.3533.

[6] W.M. Ramadan, J. Kashir, C. Jones, et al. (2012), "Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): Diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology", *Cell Communication and Signaling*, **10**(12), DOI: 10.1186/1478-811X-10-12.

[7] J. Kashir, N. Sermondade, C. Sifer, et al. (2012a), "Motile sperm organelle morphology evaluation-selected globozoospermic human sperm with an acrosomal bud exhibits novel patterns and higher levels of phospholipase C zeta", *Human Reproduction*, **27**(11), pp.3150-3160, DOI: 10.1093/humrep/der312.

[8] J. Kashir, L. Buntwal, M. Nomikos, et al. (2017), "Antigen unmasking enhances visualization efficacy of the oocyte activation factor, phospholipase C zeta, in mammalian sperm", *Molecular Human Reproduction*, **23**(1), pp.54-67, DOI: 10.1093/molehr/gaw073.

[9] S.Y. Yoon, T. Jellerette, A.M. Salicioni, et al. (2008), "Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development", *The Journal of Clinical Investigation*, **118**(11), pp.3671-3681, DOI: 10.1172/JCI36942.

[10] E. Heytens, J. Parrington, K. Coward, et al. (2009), "Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men", *Human Reproduction*, **24**(10), pp.2417-2428, DOI: 10.1093/humrep/dep207.

[11] J. Kashir, M. Konstantinidis, C. Jones, et al. (2012b), "A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility", *Human Reproduction*, **27**(1), pp.222-231, DOI: 10.1093/humrep/der384.

[12] J. Escoffier, H.C. Lee, S. Yassine, et al. (2016), "Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP", *Human Molecular Genetics*, **25**(5), pp.878-891, DOI: 10.1093/hmg/ddv617.

[13] N.T.T. Lan, M.C.M. Tam, T.T.T. Binh, et al. (2011), "Oocyte activation with calcium ionophore after sperm injection into the oocyte cytoplasm", *Medical News*, **66**(11), pp.3-6 (in Vietnamese).

[14] M. Nomikos, Y. Yu, K. Elgmati, et al. (2013), "Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility", *Fertility and Sterility*, **99**(1), pp.76-85, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.035.

[15] R. Sanusi, Y. Yu, M. Nomikos, et al. (2015), "Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C ζ ", *Molecular Human Reproduction*, **21**(10), pp.783-791, DOI: 10.1093/molehr/gav042.

[16] J. Kashir, C. Jones, G. Mounce, et al. (2013), "Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability", *Fertility and Sterility*, **99**(1), pp.107-117, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.001.

[17] S. Yelumalai, M. Yeste, C. Jones, et al. (2015), "Total levels, localization patterns, and proportions of sperm exhibiting phospholipase C zeta are significantly correlated with fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection", *Fertility and Sterility*, **104**(3), pp.561-568, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.018.

[18] N.T. Binh, N.V. Thuan, M. Miyake (2009), "Effects of liquid preservation of sperm on their ability to activate oocytes and initiate preimplantational development after intracytoplasmic sperm injection in the pig", *Theriogenology*, **71**(9), pp.1440-1450, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.01.018.

Bệnh viêm ruột mạn - một đặc điểm hiếm gặp ở trẻ nhũ nhi tại Bệnh viện Nhi đồng 2: báo cáo một trường hợp

Hà Văn Thiệu^{1,2*}, Lê Thụy Phương Trúc¹, Trịnh Hữu Tùng², Nguyễn Minh Ngọc², Ngô Văn Bách², Hà Huy Khôi¹

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 9/12/2021; ngày chuyển phản biện 13/12/2021; ngày nhận phản biện 5/1/2022; ngày chấp nhận đăng 10/1/2022

Tóm tắt:

Bệnh nhân nam xuất hiện triệu chứng tiêu máu từ lúc 8 tháng tuổi. Triệu chứng: sốt, tiêu lỏng, tiêu máu kéo dài, chậm tăng trưởng, thiếu máu, suy dinh dưỡng. Bệnh nhân được chẩn đoán ban đầu là nhiễm trùng đường ruột và dị ứng đạm sữa bò. Sau khi điều trị tích cực nhiễm trùng và chế độ ăn giới hạn, tiêu máu vẫn còn diễn tiến lượng nhiều. Bệnh nhân được thực hiện các xét nghiệm tìm nguyên nhân tiêu máu kéo dài và nội soi tiêu hóa. Kết quả cho thấy, tốc độ lắng máu (Vs) tăng, albumin huyết thanh giảm, ASCA dương tính, calprotectin phân tăng >800 µg/g, nội soi tiêu hóa dưới ghi nhận viêm loét sâu toàn bộ niêm mạc đại trực tràng, xuất huyết. Giải phẫu bệnh niêm mạc đại trực tràng loét qua lớp dưới niêm mạc và xâm nhập tế bào viêm đủ loại. Chẩn đoán viêm ruột mạn thể trung gian tại thời điểm bệnh nhân 19 tháng tuổi. Điều trị với liệu pháp dinh dưỡng qua đường ruột hoàn toàn (EEN), corticosteroid và azathioprin đường uống, sau 2 tháng bệnh nhân không còn tiêu máu.

Từ khóa: bệnh viêm ruột, rối loạn dạ dày ruột ở trẻ em, suy dinh dưỡng, tiêu máu.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Viêm ruột mạn bao gồm 3 dạng bệnh chủ yếu là Crohn, viêm loét đại tràng và viêm ruột mạn thể trung gian. Viêm ruột mạn thể trung gian mô tả bệnh nhân bị viêm ruột mạn nhưng không có sự phân biệt các đặc điểm giữa bệnh Crohn hay viêm loét đại tràng một cách rõ ràng [1, 2]. Đặc điểm của bệnh viêm ruột mạn là những đợt tái phát và lui bệnh không dự đoán trước được, có thể kéo dài suốt đời. Một số yếu tố nguy cơ từ môi trường đã được xác định là những yếu tố quan trọng, quyết định tính nhạy cảm, liên quan đến cả khởi phát và tái phát của bệnh như: tình trạng dinh dưỡng, chế độ ăn uống và vệ sinh có tác động lên thành phần hệ vi sinh vật của đường tiêu hóa, tiền căn cắt ruột thừa trước đó, nhiễm trùng chu sinh, truyền máu, sử dụng thuốc tránh thai, hút thuốc lá, căng thẳng... [3].

Phân loại bệnh viêm ruột dựa vào độ tuổi khởi phát, bao gồm viêm ruột trẻ em (dưới 17 tuổi), khởi phát sớm (dưới 10 tuổi), khởi phát rất sớm (dưới 6 tuổi), khởi phát ở trẻ nhũ nhi (dưới 2 tuổi), khởi phát ở trẻ sơ sinh (28 ngày tuổi) [4]. Khoảng 47,7% trẻ xuất hiện bệnh ở độ tuổi 6-12, tuổi trung bình khi chẩn đoán là 10,3±4,4. Sự khởi phát của viêm ruột mạn ở trẻ em là rất hiếm, chưa tới 1% trong tổng số các trường hợp mắc bệnh. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, tần suất mắc bệnh ngày càng tăng ở nhóm trẻ nhỏ, ngay cả ở năm tuổi đầu tiên [5].

Phân biệt bệnh Crohn và viêm loét đại tràng dựa vào biểu hiện lâm sàng, nội soi tiêu hóa và giải phẫu bệnh. Khoảng 10% các trường hợp bệnh nhân bị viêm ruột mạn không có sự phân biệt giữa bệnh Crohn hay viêm loét đại tràng một cách rõ ràng, trường hợp này được gọi là viêm ruột mạn thể trung gian hay viêm ruột mạn không xác định [4, 6].

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

Nhân có một trường hợp viêm ruột mạn thể trung gian khởi phát ở nhóm tuổi nhũ nhi vào điều trị tại Khoa Tiêu hóa, Bệnh viện Nhi đồng 2, chúng tôi chia sẻ ca bệnh lâm sàng để cùng tham khảo và rút kinh nghiệm.

2. Ca lâm sàng

Bệnh nhân nam, 18 tháng tuổi, nhập viện vì tiêu phân đàm máu. Bệnh sử: bệnh nhân sốt ngày thứ 6, nhiệt độ cao nhất 39,5°C, tiêu phân lỏng 4-5 lần/ngày, phân vàng lẫn nhầy máu, lượng nhiều, người nhà đưa bệnh nhi nhập Bệnh viện Nhi đồng 2.

Tiền căn: từ 8 tháng tuổi tới nay, bệnh nhân tiêu máu kéo dài và tái phát nhiều lần. Bệnh nhân có tiền căn nhập viện 6 lần trước đây vì tiêu máu kèm sốt với chẩn đoán xuất viện là nhiễm trùng đường ruột do vi khuẩn và theo dõi dị ứng đạm sữa bò. Bên cạnh điều trị nhiễm trùng, bệnh nhân được hướng dẫn chế độ ăn giới hạn (sử dụng sữa thủy phân hoàn toàn và kiêng các thực phẩm từ bò, sữa bò, trứng, hải sản, các loại đậu). Tiền căn dinh dưỡng: từ 8 tháng tới nay, bệnh nhân không tăng cân, chế độ ăn: bệnh nhân uống sữa công thức từ sau sinh, ăn dặm lúc 5 tháng tuổi với đa dạng thực phẩm, từ 9 tháng tuổi bệnh nhân thực hiện chế độ ăn giới hạn. Tiền căn gia đình không ghi nhận các bệnh lý dị ứng, viêm ruột mạn hay bệnh di truyền.

Bệnh nhân được chẩn đoán nhiễm trùng đường ruột do vi khuẩn, dị ứng đạm sữa bò, suy dinh dưỡng, thiếu máu. Điều trị kháng sinh tĩnh mạch, dùng sữa thủy phân hoàn toàn và chế độ ăn giới hạn. Sau 43 ngày điều trị, tình trạng nhiễm trùng đã ổn nhưng tiêu phân nhầy máu vẫn còn diễn tiến, bệnh nhân tiêu nhiều hơn (7-8 lần/ngày, lượng nhiều). Bệnh nhân được thực

Chronic inflammatory bowel disease - a rare feature of infancy in Children's Hospital No. 2: A case report

Van Thieu Ha^{1,2*}, Thuy Phuong Truc Le¹, Huu Tung Trinh²,
Minh Ngoc Nguyen², Van Bach Ngo², Huy Khoi Ha¹

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 9 December 2021; revised 5 January 2022; accepted 10 January 2022

Abstract:

An eight-month-old boy presented with bloody stool. The patient had a fever, loose stools, bloody stool, growth retardation, anaemia, and malnutrition. Preliminary diagnoses were enteric infections and cow's milk protein allergy. After aggressive treatment of the infection and a restricted diet, the bloody stool is still profuse. The patient was carried out tests to find the cause of prolonged bloody stool and gastrointestinal endoscopy. Results showed that erythrocyte sedimentation rate increased, serum albumin decreased, ASCA positive, faecal calprotectin increased >800 µg/g. Ileocolonoscopy revealed continuous mucosal inflammation of the colon, starting from the rectum, and haemorrhage. Histology showed deep ulcers and chronic inflammation. He was diagnosed with chronic inflammatory bowel disease unclassified at nineteen-month-old. Treatment with complete enteral nutrition therapy, oral corticosteroids and azathioprine, after 2 months, the patient no longer had bloody stool.

Keywords: bloody stool, gastrointestinal disorders in children, inflammatory bowel disease, malnutrition.

Classification number: 3.2

hiện các xét nghiệm tìm nguyên nhân tiêu viêm máu kéo dài và nội soi tiêu hóa.

Chẩn đoán xác định viêm ruột mạn thể trung gian, thiếu máu, thiếu sắt, suy dinh dưỡng. Bệnh nhân được điều trị tấn công với corticosteroid đường tĩnh mạch, kết hợp EEN với chế độ lỏng trong 8 tuần.

Sau 16 ngày điều trị, bệnh nhân giảm dần tiêu phân nhầy máu, tăng cân trở lại, chuyển sang corticosteroid và azathioprin đường uống và xuất viện. Tái khám tại thời điểm sau 2 tháng, bệnh nhân không còn tiêu máu. Sau 4 tháng, bệnh nhân tiêu phân vàng sệt, không còn các triệu chứng tiêu hóa, tăng cân tốt, không còn tình trạng suy dinh dưỡng và thiếu máu. Một số đặc điểm trước và sau điều trị được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm trước và sau điều trị.

Triệu chứng	Trước điều trị	Sau 2 tháng điều trị
Sốt	+	-
Tiêu lỏng	Tiêu lỏng >6 lần/ngày	-
Tiêu máu	+	-
Đau bụng	Đau hàng ngày, ảnh hưởng hoạt động	-
Cân nặng	Sụt cân, <-3 SD (6,4 kg)	>-1 SD (11 kg)
Chiều cao	<-2 SD (71 cm)	>-1 SD (75 cm)
Tổn thương ngoài tiêu hóa	-	-
Sinh hoạt	Giới hạn sinh hoạt	-

3. Bàn luận

Bệnh nhi khởi phát triệu chứng tiêu nhầy máu từ 8 tháng tuổi. Vì tính chất hiếm gặp, bên cạnh đó, sốt, tiêu lỏng, tiêu máu cũng là các triệu chứng trong nhiễm trùng đường ruột, do đó chúng tôi không đặt chẩn đoán viêm ruột mạn lên đầu tiên. Tại thời điểm nhập viện, kết quả xét nghiệm bạch cầu là 17,0 K/ul, neutrophils ưu thế, CRP 5 mg/l nên chẩn đoán đầu tiên là nhiễm trùng đường ruột do vi khuẩn (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả cận lâm sàng.

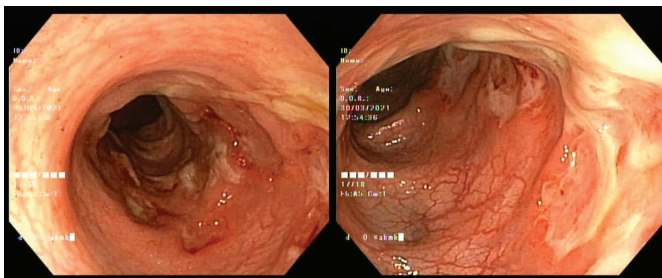
Xét nghiệm	Trước điều trị	Sau 2 tháng điều trị
WBC (K/ul)	17	15,9
Neutrophils	9,47	9,43
Eosinophils (K/ul)	0,02	0,25
RBC (K/ul)	3,88	5,31
Hemoglobin (g/dl)	8,06	11,2
Hematocrit (%)	27	37,3
Platelet (K/ul)	719	460
CRP (mg/l)	5	16,1
Procalcitonin	0,06	0,05
Vs (giờ 1/2 mm)	30/68	46/67
Albumin (g/dl)	25,6	38
Alpha-1-globulins (g/l)	5,46	-
Gamma-globulins (g/l)	14,01	-
IgA (g/l)	3,31	-
IgM (g/l)	3,7	-
IgE (kIU/l)	19,1	-
Calprotectin phân (µg/g)	>800	-
ASCA	Dương tính	-
ANCA	Dương tính	-
Soi phân	Bạch cầu (4+), hồng cầu (3+), không tìm thấy ký sinh trùng đường ruột	Âm tính
Cấy phân	Âm tính	Âm tính
Nội soi tiêu hóa trên	Không ghi nhận tổn thương	-
Nội soi tiêu hóa dưới	Hậu môn bình thường; trực tràng, đại tràng, manh tràng: viêm loét toàn bộ niêm mạc, các vết loét sâu, xuất hiện xen kẽ suốt đại tràng, xuất huyết; van hồi manh tràng: không ghi nhận tổn thương	-
Sinh thiết	Manh tràng, đại tràng lên, đại tràng ngang, đại tràng xuống, đại tràng sigma, trực tràng có loét qua lớp dưới niêm và xâm nhập tế bào viêm đủ loại với nhiều lympho bào	-

Ghi chú: ASCA: anti-saccharomyces cerevisiae antibody; ANCA: anti-neutrophil cytoplasmic.

Theo Hiệp hội Tiêu hóa, Gan mật và Dinh dưỡng Nhi khoa châu Âu (ESPGHAN), trẻ em nghi ngờ viêm ruột mạn, nhiễm trùng đường ruột nên được ưu tiên loại trừ trước khi nội soi tiêu hóa. Cần nuôi cấy phân và loại trừ các tác nhân *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* và *Clostridium difficile* ở tất cả bệnh nhi, loại trừ ký sinh trùng ở những vùng dịch tễ hoặc sau khi du lịch [2]. Chẩn đoán nhiễm trùng đường ruột không nhất thiết phải loại trừ chẩn đoán viêm ruột mạn vì nhiều trường hợp đợt bệnh đầu tiên hoặc đợt bùng phát của viêm ruột mạn có thể bị kích hoạt do nhiễm trùng [7].

Sau khi điều trị kháng sinh tích cực, tình trạng nhiễm trùng đã ổn định, cấy phân nhiều lần âm tính, bệnh nhân tuân thủ chế độ ăn giới hạn (sử dụng sữa thủy phân hoàn toàn và kiêng các thực phẩm có khả năng dị ứng) trong 14 tuần. Chẩn đoán nhiễm trùng đường ruột và dị ứng thức ăn được loại trừ, tuy nhiên bệnh nhân vẫn còn tiêu máu với lượng nhiều hơn, thiếu máu mức độ trung bình phải truyền máu (Hb 6,5 g/dl). Chúng tôi thực hiện các xét nghiệm tìm nguyên nhân tiêu máu kéo dài, bao gồm viêm ruột mạn tính, lao ruột, suy giảm miễn dịch, bệnh tự miễn, ác tính. Kết quả xét nghiệm cho thấy, có tình trạng viêm mạn tính đường tiêu hóa: Vs tăng, albumin giảm, calprotectin phân tăng cao (>800 µg/g). Calprotectin phân tăng khi mắc bệnh viêm ruột mạn có liên quan đến sự xâm nhập vào niêm mạc bởi bạch cầu đa nhân trung tính. Độ nhạy và độ đặc hiệu của calprotectin trong phân ở những người bị bệnh viêm ruột được tìm thấy là 93 và 96% ở người lớn, 92 và 76% ở trẻ em. Calprotectin phân âm tính có thể hữu ích để loại trừ chẩn đoán viêm ruột mạn ở những bệnh nhân có biểu hiện đau bụng hoặc tiêu chảy [8].

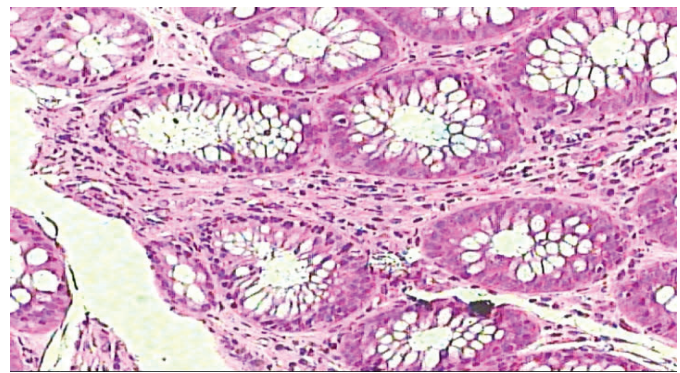
Bệnh nhân được thực hiện nội soi tiêu hóa trên và dưới. Kết quả nội soi tiêu hóa trên không ghi nhận tổn thương ở thực quản, dạ dày, tá tràng. Nội soi tiêu hóa dưới: trực tràng, đại tràng, manh tràng viêm loét toàn bộ niêm mạc, các vết loét sâu, xuất hiện xen kẽ suốt đại tràng, xuất huyết (hình 1). Hậu môn, van hồi manh tràng không ghi nhận tổn thương.



Hình 1. Hình ảnh nội soi đại tràng: niêm mạc viêm, xuất huyết, nhiều vết loét sâu.

Kết quả nội soi của bệnh nhân phù hợp với chẩn đoán viêm ruột mạn. Đặc điểm vị trí sang thương chỉ khu trú ở đại tràng, bao gồm trực tràng mà không có tổn thương ruột non, van hồi manh tràng còn nguyên vẹn, sang thương liên tục, nhiều ổ loét gợi ý bệnh viêm loét đại tràng [9].

Chúng tôi sinh thiết 2 mẫu ở mỗi vị trí manh tràng, đại tràng lên, đại tràng ngang, đại tràng xuống, đại tràng sigma, trực tràng. Theo hướng dẫn của các tổ chức uy tín thế giới, tất cả bệnh nhân nghi ngờ viêm ruột mạn nên được sinh thiết ít nhất 2 mẫu tại mỗi vị trí, bao gồm 5 vị trí ở đại tràng (gồm trực tràng) và 1 vị trí ở hồi tràng [9]. Nếu có tổn thương tại đường tiêu hóa trên, sinh thiết 2 mẫu tại thực quản, dạ dày, tá tràng. Các mẫu sinh thiết nên được lấy từ cả vùng niêm mạc tổn thương lẫn niêm mạc bình thường [10]. Giải phẫu bệnh cho thấy, loét qua lớp dưới niêm mạc và xâm nhập tế bào viêm đủ loại với nhiều lympho bào, bạch cầu đa nhân trung tính. Đặc điểm bệnh học tổn thương viêm loét sâu, xuyên qua lớp niêm mạc ruột thường gặp trong bệnh Crohn, viêm loét đại tràng tổn thương viêm thường khu trú tại lớp niêm mạc (hình 2).



Hình 2. Giải phẫu bệnh niêm mạc đại tràng xâm nhập tế bào viêm đủ loại với nhiều bạch cầu đa nhân trung tính.

Tác giả K. Nakaya và cs (2020) [11] báo cáo rằng, thời gian trung bình của các triệu chứng trước khi chẩn đoán viêm ruột mạn khởi phát ở trẻ nhỏ là 6,5 tháng. Tuy nhiên, ở trường hợp này, chúng tôi chẩn đoán bệnh nhi mắc viêm ruột mạn tại thời điểm 19 tháng tuổi (11 tháng kể từ lúc xuất hiện triệu chứng đầu tiên) dựa vào các đặc điểm triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm, nội soi, giải phẫu bệnh. Ở bệnh nhi này, việc chẩn đoán ban đầu gặp khó khăn vì các triệu chứng tiêu máu tương tự cũng gặp trong nhiễm trùng đường ruột và dị ứng đạm sữa bò, tỷ lệ mắc cũng chiếm đa số và ngày càng gia tăng. Về phân loại, chúng tôi áp dụng tiêu chuẩn Porto có chỉnh sửa của ESPGHAN, cụ thể bệnh nhân có hình ảnh nội soi phù hợp với viêm loét đại tràng có kèm theo: chậm phát triển chiều cao ≤ -2 SD, không giải thích được bằng các bệnh lý khác, tổn thương viêm xuyên thành, ASCA dương tính và ANCA âm tính, bệnh nhân được chẩn đoán xác định viêm ruột mạn thể trung gian [2]. Viêm ruột mạn thể trung gian thường gặp hơn ở những trẻ khởi phát bệnh sớm (<6 tuổi) với tỷ lệ 11-22% so với trẻ lớn hơn là 4-10% [12]. Hơn nữa, ở những trẻ khởi phát bệnh sớm, bệnh có khuynh hướng diễn tiến nặng hơn theo thời gian, 25% trẻ chẩn đoán ban đầu là viêm loét đại tràng hoặc viêm ruột mạn thể trung gian, theo thời gian theo dõi được phân loại lại bệnh Crohn [13]. Do đó, cần chú ý đánh giá lại chẩn đoán phân loại của bệnh nhân khi xuất hiện các triệu chứng mới hoặc bệnh kém đáp ứng điều trị, tái phát.

Bệnh nhân được điều trị ban đầu với EEN và corticosteroid đường tĩnh mạch. EEN được định nghĩa là cung cấp 100% nhu cầu năng lượng cơ bản dưới dạng lỏng bằng đường miệng hay ống thông mũi dạ dày, với việc kiểm soát chế độ ăn chặt chẽ dựa trên độ dài ngắn của chuỗi polypeptide, acid amin hay protein đầy đủ. EEN làm giảm viêm, chữa lành niêm mạc ruột, thời gian điều trị 6-8 tuần với tỷ lệ đáp ứng lâm sàng xấp xỉ 80% [14]. EEN cải thiện tăng trưởng, điều chỉnh sự thiếu hụt vi chất dinh dưỡng cũng như cải thiện các tình trạng bệnh kèm theo như loãng xương và thiếu máu. ESPGHAN khuyến cáo EEN là phương pháp điều trị đầu tiên cho trẻ bị bệnh Crohn ở giai đoạn hoạt động [15]. Bệnh nhân của chúng tôi được hội chẩn bác sĩ chuyên khoa dinh dưỡng, ăn bằng đường miệng kết hợp ống thông mũi dạ dày với chế độ ăn bao gồm sữa thủy phân, cháo lỏng, bổ sung vitamin khoáng chất, acid béo chuỗi ngắn trong 8 tuần. Bên cạnh đó, bệnh nhân được điều trị methylprednisolon tĩnh mạch 1 mg/kg/ngày. Corticosteroid được sử dụng như liệu pháp đầu tay trong viêm ruột mạn mức độ trung bình - nặng, hay bệnh Crohn trong trường hợp không thể thực hiện EEN, viêm loét đại tràng không đáp ứng với 5-ASA. Corticosteroid liều khởi đầu dựa vào cân nặng, giảm dần liều khi bệnh thuyên giảm nhưng không được quá 4 tuần. Corticosteroid chỉ nên sử dụng trong giai đoạn tấn công, không nên sử dụng như một liệu pháp duy trì [16]. Chúng tôi đánh giá bệnh nhân trong giai đoạn hoạt động trung bình theo thang điểm Chỉ số đánh giá tình trạng hoạt động của bệnh Crohn ở trẻ em (PCDAI) là 45. Bên cạnh đó, bệnh nhân có kèm theo chậm tăng trưởng, suy dinh dưỡng nặng và thiếu máu, do đó chúng tôi kết hợp điều trị cả EEN và corticosteroid. Sau 5 ngày điều trị, tiêu máu giảm. Sau 16 ngày, bệnh nhân thuyên giảm còn tiêu phân nhầy máu lượng ít, tăng cân, điều trị corticosteroid đường uống kết hợp azathioprin và xuất viện.

Cơ chế bệnh sinh bệnh viêm ruột phức tạp, đa dạng do nhiều yếu tố kết hợp, bao gồm: gen, hệ miễn dịch và các yếu tố môi trường. Tất cả các yếu tố này tác động cộng gộp, hệ quả cuối cùng là hoạt hóa hệ miễn dịch ở niêm mạc ruột một cách không kiểm soát, các yếu tố tiền viêm cytokines được phóng thích vào ống tiêu hóa gây nên phản ứng viêm mạn tính. Kết quả điều trị bằng EEN và corticosteroid cho thấy, bệnh nhân đáp ứng tốt, tăng cân, các chỉ số xét nghiệm biến đổi theo chiều hướng tích cực, giảm mất protein qua ruột, albumin máu tăng từ 25,6 đến 38 g/l.

Tái khám tại thời điểm sau 2 tháng, bệnh nhân không còn tiêu máu. Sau 4 tháng, bệnh nhân tiêu phân vàng sệt, không còn các triệu chứng tiêu hóa, tăng trưởng cân nặng và chiều cao, không còn tình trạng suy dinh dưỡng và thiếu máu.

4. Kết luận

Viêm ruột mạn nên được nghi ngờ ở trẻ có các triệu chứng tiêu hóa kéo dài hay tái đi tái lại (đau bụng, tiêu lỏng, tiêu máu, sụt cân) không giải thích được. Bệnh rất hiếm gặp ở trẻ nhũ nhi, triệu chứng bệnh đa dạng và trùng lặp với các bệnh lý

khác nên gây khó khăn và chậm trễ trong chẩn đoán. Vì vậy, cần cần nhắc nội soi tiêu hóa trên và dưới sớm cùng với khảo sát mô học trong những trường hợp nghi ngờ để xác định, chẩn đoán và điều trị kịp thời.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.M. Kliegman, J.S. Geme (2019), "Inflammatory bowel disease", *Nelson's Textbook of Pediatrics*, Elsevier, **362**, pp.1973-1987.
- [2] A. Levine, S. Koletzko, D. Turner, et al. (2014), "ESPGHAN revised Porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents", *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **58(6)**, pp.795-806, DOI: 10.1097/MPG.0000000000000239.
- [3] K. Clarke, J. Chintanaboina (2019), "Allergic and immunologic perspectives of inflammatory bowel disease", *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **57(2)**, pp.179-193, DOI: 10.1007/s12016-018-8690-3.
- [4] E. Bequet, H. Sarter, M. Fumery, et al. (2017), "Incidence and phenotype at diagnosis of very-early-onset compared with later-onset paediatric inflammatory bowel disease: A population-based study [1988-2011]", *J. Crohns Colitis*, **11(5)**, pp.519-526, DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw194.
- [5] I. Kern, O. Schoffer, W. Kiess, et al. (2021), "Incidence trends of pediatric onset inflammatory bowel disease in the years 2000-2009 in Saxony, Germany - first results of the Saxon Pediatric IBD Registry", *PLOS ONE*, **16(1)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0243774.
- [6] J.V. Limbergen, R.K. Russell, H.E. Drummond, et al. (2008), "Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease", *Gastroenterology*, **135(4)**, pp.1114-1122, DOI: 10.1053/j.gastro.2008.06.081.
- [7] J.E. Axelrad, K.H. Cadwell, J.F. Colombel, et al. (2021), "The role of gastrointestinal pathogens in inflammatory bowel disease: A systematic review", *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, **14**, DOI: 10.1177/17562848211004493.
- [8] N.E. Walsham, R.A. Sherwood (2016), "Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease", *Clin. Exp. Gastroenterol.*, **9**, pp.21-29, DOI: 10.2147/CEG.S51902.
- [9] C. Maaser, A. Sturm, S.R. Vavricka, et al. (2019), "ECCO-ESGAR guideline for diagnostic assessment in IBD part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications", *J. Crohns Colitis*, **13(2)**, pp.144-164, DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjy113.
- [10] C.M. Spiceland, N. Lodhia (2018), "Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment", *World J. Gastroenterol.*, **24(35)**, pp.4014-4020, DOI: 10.3748/wjg.v24.i35.4014.
- [11] K. Nakaya, Y. Iinuma, Y. Hirayama, et al. (2020), "A case of a two-month-old boy diagnosed with infantile Crohn's disease based on an atypical perianal lesion", *Case Rep. Pediatr.*, **2020**, DOI: 10.1155/2020/8832856.
- [12] J.R. Kelsen, R.N. Baldassano, D. Artis, et al. (2015), "Maintaining intestinal health: The genetics and immunology of very early onset inflammatory bowel disease", *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **1(5)**, pp.462-476, DOI: 10.1016/j.jcmgh.2015.06.010.
- [13] J.O. Shim (2019), "Recent advance in very early-onset inflammatory bowel disease", *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.*, **22(1)**, pp.41-49, DOI: 10.5223/pghn.2019.22.1.41.
- [14] A. Assa, R. Shamir (2017), "Exclusive enteral nutrition for inducing remission in inflammatory bowel disease in paediatric patients", *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **20(5)**, pp.384-389, DOI: 10.1097/MCO.0000000000000402.
- [15] T. Miller, D.L. Suskind (2018), "Exclusive enteral nutrition in pediatric inflammatory bowel disease", *Curr. Opin. Pediatr.*, **30(5)**, pp.671- 676, DOI: 10.1097/MOP.0000000000000660.
- [16] P.F. van Rhee, M. Alo, A. Assa, et al. (2020), "The medical management of paediatric Crohn's disease: An ECCO-ESPGHAN guideline update", *J. Crohns Colitis*, **161**, DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjaa161.

Đặc điểm xét nghiệm huyết học và hình thái tế bào máu ngoại vi trên bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR tại Bệnh viện Phổi Trung ương từ tháng 1/2021 đến tháng 6/2021

Võ Trọng Thành^{1*}, Nguyễn Kim Cương², Phạm Thị Vượng¹

¹Bệnh viện Phổi Trung ương, 463 Hoàng Hoa Thám, phường Vĩnh Phúc, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

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

Ngày nhận bài 8/11/2021; ngày chuyển phản biện 12/11/2021; ngày nhận phản biện 8/12/2021; ngày chấp nhận đăng 13/12/2021

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: ADR (Adverse drug reactions) còn được gọi là tác dụng không mong muốn của thuốc. Các ADR của thuốc chống lao khá phổ biến, gây ra những thay đổi về xét nghiệm huyết học. **Mục tiêu:** nghiên cứu đặc điểm một số chỉ số huyết học và hình thái tế bào máu ngoại vi trên bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR được điều trị tại Bệnh viện Phổi Trung ương từ tháng 1/2021 đến tháng 6/2021. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 134 bệnh nhân lao phổi được chẩn đoán sử dụng thuốc lao có ADR điều trị tại Bệnh viện Phổi Trung ương bằng phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang. **Kết quả cho thấy,** chỉ số hồng cầu trung bình là $3,69 \pm 0,92 \times 10^{12}/l$ ở nam và $3,81 \pm 0,74 \times 10^{12}/l$ ở nữ. **Lượng huyết sắc tố trung bình** là $102,42 \pm 26,44$ g/l ở nam và $96 \pm 22,81$ g/l ở nữ. **Tỷ lệ thiếu máu** là 73,47% ở nam và 61,11% ở nữ; **chỉ số bạch cầu trung bình** là $11,88 \pm 6,38 \times 10^9/l$; **chỉ số tiểu cầu trung bình** là $371,45 \pm 198,16 \times 10^9/l$. **Hình thái thường gặp:** hồng cầu chuôi tiên, hình bia và nhược sắc, bạch cầu trung tính tăng đoạn nhân, tăng hạt đặc hiệu, tiểu cầu không lồ. **Kết luận,** bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR bị thiếu máu, xuất hiện bạch cầu trung tính tăng hạt đặc hiệu, tiểu cầu khổng lồ, hình thái hồng cầu là chuôi tiên, hình bia và nhược sắc.

Từ khóa: ADR thuốc lao, bạch cầu, hồng cầu, lao phổi, tiểu cầu.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Lao là một bệnh nhiễm trùng mạn tính do vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* gây ra và là nguyên nhân gây tử vong thứ 3 trong các bệnh nhiễm trùng [1]. Bệnh lao phải điều trị trong thời gian dài liên tục, quá trình điều trị đòi hỏi người bệnh phải tuân thủ nghiêm ngặt các nguyên tắc như: bắt buộc phải phối hợp nhiều loại thuốc chống lao theo phác đồ điều trị, phải dùng thuốc đúng liều chỉ định, dùng đều đặn và vào một giờ nhất định trong ngày, dùng thuốc đủ thời gian theo 2 giai đoạn tấn công và duy trì, thời gian điều trị bệnh ít nhất là 6 tháng đối với những trường hợp lao thông thường [1].

Hầu hết tất cả các loại thuốc có hiệu lực tốt và được dùng thận trọng nhưng cũng có thể gây ra các phản ứng có hại không mong muốn. Các ADR của thuốc chống lao khá phổ biến, gây ra nhiều khó khăn trong điều trị.

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), một loại thuốc có ADR là “có bất kỳ phản ứng nào đối với một loại thuốc độc hại và ngoài ý muốn, xảy ra ở liều lượng thường được sử dụng với người dự phòng, chẩn đoán hoặc điều trị bệnh, hoặc để điều chỉnh chức năng sinh lý” [2].

Việc sử dụng các phác đồ điều trị nhiều thuốc trong bệnh lao có ADR ở các mức độ nghiêm trọng khác nhau, chẳng

hạn như có thể gây thiếu máu do ức chế hoặc phá hủy hồng cầu và sự thay đổi về các chỉ số huyết học đóng vai trò quan trọng trong cung cấp những dấu hiệu để chẩn đoán, đánh giá tiên lượng và theo dõi điều trị trên lâm sàng bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR. Do đó, các tác giả thực hiện đề tài này với mục tiêu nghiên cứu đặc điểm một số chỉ số huyết học và hình thái tế bào máu ngoại vi trên bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR được điều trị tại Bệnh viện Phổi Trung ương từ tháng 1/2021 đến tháng 6/2021.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

134 bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR.

Các tiêu chuẩn chọn bệnh nhân: Những bệnh nhân từ 17 tuổi trở lên, mới được chẩn đoán mắc lao phổi từ tháng 1/2021 đến tháng 6/2021, đang dùng thuốc chống lao hàng 1 và 2.

Tiêu chuẩn loại trừ: Các bệnh nhân có bệnh hệ thống hay mắc bệnh về máu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang (tại thời điểm bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR nhập viện).

*Tác giả liên hệ: Email: nihbt.nlh2010@gmail.com

Characteristics of haematological and morphology in pulmonary tuberculosis patients using drugs with ADR at the National Lung Hospital from January 2021 to June 2021

Trong Thanh Vo^{1*}, Kim Cuong Nguyen²,
Thi Vuong Pham¹

¹National Lung Hospital,
463 Hoang Hoa Tham Street, Vinh Phuc Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

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

Received 8 November 2021; revised 8 December 2021; accepted 13 December 2021

Abstract:

Background: ADR (Adverse drug reactions) is also known as an adverse drug effect. ADRs of anti-tuberculosis drugs are quite common, causing changes in haematological tests. **Objective:** to study the characteristics of some haematological index and peripheral blood cell morphology in pulmonary tuberculosis patients with tuberculosis drugs with ADR who were treated at the National Lung Hospital from January 2021 to June 2021. **Subjects and methods:** 134 patients with pulmonary tuberculosis were diagnosed with tuberculosis drugs with ADR at the National Lung Hospital using a cross-sectional descriptive study. **Results** showed that the mean erythrocyte index was $3.69 \pm 0.92 \times 10^{12}/l$ in men and $3.81 \pm 0.74 \times 10^{12}/l$ in women, mean haemoglobin was 102.42 ± 26.44 g/l in men and 96 ± 22.81 g/l in women. The rate of anaemia was 73.47% in men and 61.11% in women. Average white blood cell count was $11.88 \pm 6.38 \times 10^9/l$, average platelet index was $371.45 \pm 198.16 \times 10^9/l$. **Common morphology:** rouleaux cells, target cells and hypochromic RBCs. Neutrophils increase segmentation and granulocytosis. Giant platelets. **Conclusion:** pulmonary tuberculosis patients with tuberculosis drugs with ADR have anaemia, appearance of granulocytosis, giant platelets, rouleaux cells, target cells and hypochromic RBCs.

Keywords: platelets, pulmonary tuberculosis, red blood cells, tuberculosis drugs with ADR, white blood cells.

Classification number: 3.2

Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Từ tháng 1/2021 đến tháng 6/2021 tại Bệnh viện Phổi Trung ương.

Các chỉ số nghiên cứu:

Thông tin chung: tuổi, giới tính.

Chỉ số tế bào máu ngoại vi: số lượng hồng cầu ($\times 10^{12}/l$); nồng độ huyết sắc tố (g/l); số lượng bạch cầu ($\times 10^9/l$); số lượng tuyệt đối bạch cầu đoạn trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu mono ($\times 10^9/l$); số lượng tiểu cầu ($\times 10^9/l$).

Hình thái tế bào hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu trên tiêu bản nhuộm giemsa.

Thu thập dữ liệu và nghiên cứu các biến: Bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR trong nghiên cứu này được xác định từ hồ sơ bệnh án, bởi điều tra viên 1 (bác sỹ Khoa Huyết học và Truyền máu) và được xác minh bởi điều tra viên 2 (bác sỹ Khoa Lao hô hấp). Thiếu máu được định nghĩa khi nồng độ hemoglobin (Hb) dưới 130 g/l ở nam hoặc dưới 120 g/l ở nữ [3]. Giảm bạch cầu được định nghĩa khi số lượng bạch cầu ít hơn $4 \times 10^9/l$ [3]. Giảm tiểu cầu được định nghĩa khi số lượng tiểu cầu ít hơn $150 \times 10^9/l$ [3].

Vật liệu và phương tiện nghiên cứu:

Chuẩn bị mẫu và đo lường các biến số: Mẫu máu tĩnh mạch từ các khoa lâm sàng được cho vào ống nghiệm nhựa có sẵn chất chống đông EDTA-K2 (1,85 mg/ml) để tổng phân tích tế bào máu ngoại vi. Kéo 2 lam máu đàn từ mẫu máu trong ống nghiệm nhựa có sẵn chất chống đông EDTA-K2 để làm tiêu bản nhuộm giemsa xem hình thái của các tế bào máu ngoại vi và đếm tỷ lệ % các thành phần bạch cầu. Mẫu xét nghiệm máu ngoại vi thực hiện đúng theo quy trình kỹ thuật được phê duyệt bởi Giám đốc và Hội đồng Khoa học và Đạo đức của Bệnh viện Phổi Trung ương.

Dụng cụ: máy đếm tế bào tự động XN1000i (Sysmex, Nhật Bản) để xét nghiệm các chỉ số tế bào máu ngoại vi; kính hiển vi OLYMPUS BX43.

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê y học trên chương trình SPSS 20.0. Các biến số định lượng được trình bày theo giá trị trung bình và độ lệch chuẩn ($\pm SD$). Các biến số định tính được trình bày theo tỷ lệ %.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm về tuổi và giới

Đặc điểm về tuổi và phân bố theo giới tính của nhóm bệnh nhân nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Phân bố tuổi trung bình và giới tính của nhóm bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR.

Nhóm	Bệnh nhân		
	$\bar{X} \pm SD$	53,14 $\pm$ 16,88	
Tuổi	Tuổi thấp nhất	17	
	Tuổi cao nhất	87	
Giới tính	Nam	Số lượng (n)	98
		Tỷ lệ (%)	73,13
	Nữ	Số lượng (n)	36
		Tỷ lệ (%)	26,87
	Tỷ lệ nam:nữ		2,72:1

Kết quả bảng 1 cho thấy, độ tuổi trung bình của các bệnh nhân là 53, trong đó bệnh nhân có tuổi thấp nhất là 17 và cao nhất là 87. 98 bệnh nhân là nam (chiếm 73,13%) và 36 bệnh nhân là nữ (chiếm 26,87%), tỷ lệ nam:nữ là 2,72:1.

3.2. Đặc điểm tế bào máu ngoại vi

Các chỉ số hồng cầu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR:

Bảng 2. Các chỉ số hồng cầu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR.

Chỉ số		Bệnh nhân ($\bar{X} \pm SD$)	Thấp nhất	Cao nhất
Số lượng hồng cầu ($\times 10^{12}/l$)	Nam	3,69 $\pm$ 0,92	1,77	5,32
	Nữ	3,81 $\pm$ 0,74	2,03	5,15
Lượng huyết sắc tố (Hb) (g/l)	Nam	102,42 $\pm$ 26,44	55	152
	Nữ	96 $\pm$ 22,81	65	146

Kết quả bảng 2 cho thấy, số lượng hồng cầu và huyết sắc tố của các bệnh nhân ADR thuốc lao trong nghiên cứu đều giảm so với giới hạn bình thường.

Đặc điểm thiếu máu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR:

Bảng 3. Đặc điểm thiếu máu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR.

Đặc điểm	Nam (n=98)		Nữ (n=36)	
	n	%	n	%
Tỷ lệ thiếu máu	72	73,47	22	61,11

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ thiếu máu ở nam cao hơn ở nữ, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Thay đổi hình thái dòng hồng cầu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR:

Bảng 4. Thay đổi hình thái dòng hồng cầu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR.

Hình thái	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Hồng cầu nhược sắc	19	14,18
Hồng cầu chuỗi tiền	35	26,12
Hồng cầu hình bia	32	23,88

Tỷ lệ bệnh nhân có hồng cầu chuỗi tiền cao nhất là 26,12%, tiếp đến là hồng cầu hình bia (chiếm 23,88%), thấp nhất là hồng cầu nhược sắc (chiếm 14,18%) (bảng 4).

Các chỉ số bạch cầu, tiểu cầu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR:

Bảng 5. Các chỉ số bạch cầu, tiểu cầu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR (n=134).

Chỉ số	Bệnh nhân ($\bar{X} \pm SD$)	Thấp nhất	Cao nhất
Số lượng bạch cầu ($\times 10^9/l$)	11,88 $\pm$ 6,38	1,71	22,51
Bạch cầu đoạn trung tính ($\times 10^9/l$)	8,73 $\pm$ 5,69	0,17	18,41
Bạch cầu Lymphocyte ($\times 10^9/l$)	1,37 $\pm$ 0,53	0,09	4,89
Bạch cầu Monocyte ($\times 10^9/l$)	1,5 $\pm$ 0,83	0,08	3,6
Số lượng tiểu cầu ($\times 10^9/l$)	371,45 $\pm$ 198,16	25	979

Trong các chỉ số về bạch cầu được thu thập, số lượng bạch cầu, bạch cầu đoạn trung tính, bạch cầu monocyte của các bệnh nhân nghiên cứu đều tăng (bảng 5).

Bảng 6. Thay đổi về các chỉ số bạch cầu, tiểu cầu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR.

Trình trạng	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)	($\bar{X} \pm SD$) (g/l)
Bạch cầu đoạn trung tính $> 8,0 \times 10^9/l$	47	35,07	12,56 $\pm$ 4,33
Bạch cầu đoạn trung tính $< 4,0 \times 10^9/l$	7	5,22	2,63 $\pm$ 1,27
Số lượng tiểu cầu $< 150 \times 10^9/l$	24	17,91	125,2 $\pm$ 111,56
Số lượng tiểu cầu $> 450 \times 10^9/l$	12	8,95	651,25 $\pm$ 141,45

Kết quả bảng 6 cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân ADR thuốc lao có tăng bạch cầu đoạn trung tính là 35,07%, giảm tiểu cầu là 17,91%.

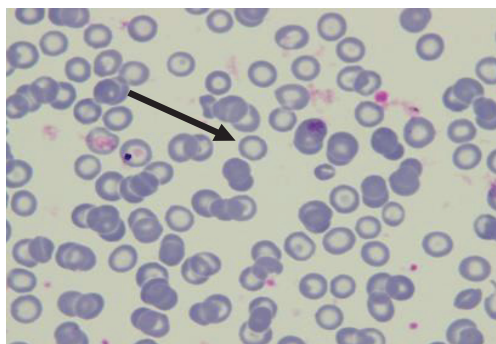
Bảng 7. Thay đổi về hình thái bạch cầu, tiểu cầu của bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR.

Hình dạng	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Bạch cầu đoạn trung tính tăng hạt đặc hiệu	7	5,22
Bạch cầu đoạn trung tính tăng đoạn nhân	6	4,48
Tiểu cầu chưa trưởng thành	33	24,63

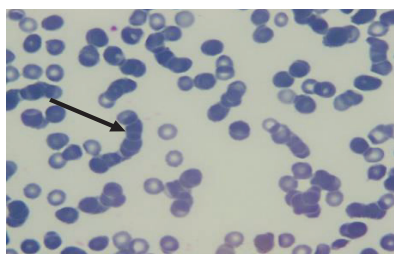
Ở bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR, tỷ lệ có tiểu cầu chưa trưởng thành (tiểu cầu không lồ) khá cao (chiếm 24,63%), bạch cầu đoạn trung tính tăng hạt đặc hiệu và tăng đoạn nhân lần lượt là 5,22 và 4,48% (bảng 7).

3.3. Đặc điểm về hình thái tế bào học máu ngoại vi trên các bệnh nhân sử dụng thuốc lao có ADR

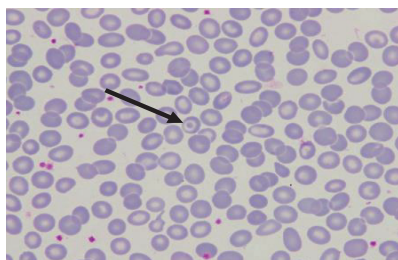
Các hình thái dòng hồng cầu được thể hiện ở hình 1-3.



Hình 1. Hồng cầu nhược sắc.

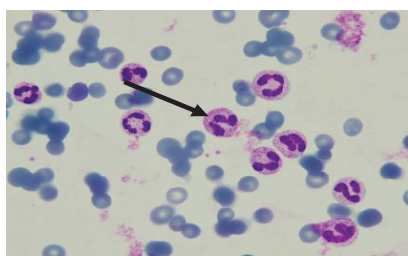


Hình 2. Hồng cầu chuỗi tiền.



Hình 3. Hồng cầu hình bia.

Các hình thái dòng bạch cầu được thể hiện ở hình 4 và 5.

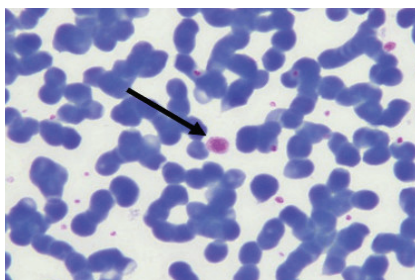


Hình 4. Bạch cầu đoạn trung tính tăng hạt đặc hiệu.



Hình 5. Bạch cầu đoạn trung tính tăng chia đoạn.

Hình ảnh tiểu cầu chưa trưởng thành được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Tiểu cầu chưa trưởng thành.

4. Bàn luận

4.1. Về tuổi và giới tính của bệnh nhân nghiên cứu

Tuổi trung bình của bệnh nhân là $53,14 \pm 16,88$, tuổi nhỏ nhất là 17, lớn nhất là 87. Có 98 bệnh nhân nam (73,13%) và 36 bệnh nhân nữ (26,87%). Trong 134 trường hợp bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR điều trị tại Bệnh viện Phổi Trung ương, các tác giả nhận thấy, tỷ lệ bệnh nhân nam cao gấp 2,72 lần bệnh nhân nữ. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của M. Banerjee và cs (2015) [4] trên 227 bệnh nhân lao phổi tại Ấn Độ, có 179 bệnh nhân nam (chiếm 78,85%) và 48 bệnh nhân nữ (chiếm 21,15%). Kết quả này có thể do thói quen sinh hoạt của nam giới dùng nhiều chất kích thích (thuốc lá, thuốc lào, rượu bia...) nhiều hơn nữ giới, đã làm ảnh hưởng đến sức khỏe, đặc biệt là hệ thống miễn dịch của cơ thể bị suy yếu nên tỷ lệ tái hoạt động của bệnh lao cao hơn.

4.2. Về đặc điểm các chỉ số tế bào máu của bệnh nhân lao phổi

Bệnh nhân lao phổi trong nghiên cứu có số lượng hồng cầu và nồng độ Hb trung bình của nam và nữ đều giảm so với người bình thường. Bên cạnh đó, bệnh nhân nam bị thiếu máu (73,47%) cao hơn bệnh nhân nữ (61,11%) (bảng 3). Năm 2013, nghiên cứu của P.J. Yaranal và cs (2013) [5] cũng cho kết quả tương tự.

Thiếu máu ở bệnh nhân lao phổi do sự xâm nhập của vi khuẩn dẫn đến việc hoạt hóa các tế bào lympho T và đại thực bào làm sản sinh các cytokines như interferon gamma (INF-gamma), alpha (TNF-alpha), interleukin-1 (IL-1) và IL-6. Các cytokine này sẽ làm cho sắt chuyển vào dự trữ trong hệ thống liên võng nội mô, dẫn đến sự giảm nồng độ sắt trong huyết tương, do đó hạn chế sự tổng hợp Hb, ức chế sự tăng sinh tế bào gốc hồng cầu và sản xuất erythropoietin làm ức chế tủy xương gây thiếu máu. Ngoài ra, TNF-alpha trực tiếp gây hại hồng cầu và làm giảm tuổi thọ của tế bào hồng cầu. Vì vậy, thiếu máu do nhiễm trùng về cơ bản là thiếu máu thiếu sắt, kết hợp với khả năng tăng sinh dòng hồng cầu để bù đắp cho thiếu máu.

Số lượng bạch cầu trung bình của bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR tăng, trong đó bạch cầu đoạn trung tính, bạch cầu monocyte của các bệnh nhân nghiên cứu đều tăng (bảng 5 và 6).

Sau khi thực bào vi khuẩn, đại thực bào phân hủy vi khuẩn và trình diện kháng nguyên cho các tế bào lympho (chủ yếu là T-CD4); các tế bào T-CD4 sau khi nhận được tín hiệu các kháng nguyên, chúng trở thành các tế bào hoạt hóa và tiết ra IL-2 khởi động một loạt các phản ứng miễn dịch tiếp theo, giúp cơ thể tiêu diệt vi khuẩn lao. Do đó, một mặt bạch cầu lympho đáp ứng miễn dịch trung gian qua tế bào và để lại dấu ấn miễn dịch, sau khi thực hiện chức năng thì bị giảm. Mặt khác, vi khuẩn lao vào cơ thể cũng gây nên tình trạng nhiễm trùng, nên bạch cầu mono tăng để thực bào kháng nguyên vi khuẩn.

Trong nghiên cứu của S. Iqbal và cs (2015) [6], 22,4% bệnh nhân có số lượng bạch cầu trên 11,0 g/l; 72,4% bệnh nhân tăng bạch cầu trung tính, chỉ có 27,6% có số lượng bạch cầu trung tính dưới trung bình.

Đối với biểu hiện giảm tiểu cầu, nhiều cơ chế phối hợp được đưa ra như độc tính miễn dịch của thuốc và các cơ chế tự miễn khác, tình trạng xơ hóa tủy, tạo u hạt trong tủy và cường lách [7]. Nguyên nhân giảm số lượng tiểu cầu có thể còn do hiện tượng miễn dịch do quá trình sản xuất kháng thể kháng tiểu cầu, dẫn đến gây kết dính tiểu cầu, hoạt hóa bề mặt dẫn đến hiện tượng thực bào tiểu cầu [8]. Ngoài ra, giảm số lượng tiểu cầu còn do thuốc chống lao gây ra sau 6-7 ngày đối với người dùng thuốc lần đầu tiên và trong vòng vài giờ ở những bệnh nhân nhạy cảm [9].

4.3. Về đặc điểm hình thái tế bào máu của bệnh nhân lao phổi có ADR thuốc lao

Các tỷ lệ hình thái trên tiêu bản nhuộm giemsa máu ngoại vi của bệnh nhân lao phổi có ADR thuốc lao được thể hiện ở bảng 4 và 7. Các hình ảnh được thể hiện ở hình 1-6 cho thấy, nhiều bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR trong nghiên cứu của chúng tôi có hình thái hồng cầu bất thường. Các dạng hình thái hồng cầu thường gặp bao gồm: hồng cầu nhược sắc với MCHC giảm dưới 320 g/l, khoảng sáng giữa hồng cầu lớn hơn 1/3 tế bào và nhạt màu có 19 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 14,18%; hồng cầu hình bia (tăng tỷ số diện tích bề mặt hồng cầu so với thể tích) với hình dạng giống bia bắn, thường nhược sắc, dễ vỡ do giảm thẩm thấu, biến loạn màng hồng cầu; hồng cầu chuỗi tiền với nhiều hồng cầu kết thành cọc: xuất hiện từng đám như đồng tiền xu do xơ hóa tủy, gây tăng sinh tủy khác hoặc hội chứng loạn sinh tủy (myelodysplastic syndromes), thiếu hụt sắt có 35 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 26,12%. Về hình thái bạch cầu chủ yếu trong nghiên cứu của chúng tôi là có các bạch cầu đoạn trung tính tăng chia đoạn trên 5 đoạn chiếm 4,48%; đôi khi có các bạch cầu đoạn trung tính tăng hạt đặc hiệu (tỷ lệ 24,63%). Hình thái tiểu cầu chủ yếu là xuất hiện tiểu cầu khổng lồ chiếm tỷ lệ 24,63%.

Sở dĩ trên bệnh nhân lao phổi có nhiều hình thái hồng cầu như vậy có thể là do quá trình viêm mạn tính, rối loạn hấp thu, thiếu sắt kéo dài, ức chế tủy xương, rối loạn tổng hợp Hb trong tủy... Đối với bệnh nhân giảm bạch cầu hạt trung tính trong lao, bên cạnh nguyên nhân do suy tủy nhiều tác giả cũng đề xuất thêm cơ chế giảm bạch cầu hạt do nguyên nhân tự miễn [10].

5. Kết luận

Nghiên cứu trên 134 bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR vào điều trị tại Bệnh viện Phổi Trung ương, chúng tôi có được kết luận như sau:

1. Chỉ số hồng cầu trung bình: $3,69 \pm 0,92 \times 10^{12}/l$ ở nam và $3,81 \pm 0,74 \times 10^{12}/l$ ở nữ. Lượng huyết sắc tố trung bình: $102,42 \pm 26,44$ g/l ở nam và $96 \pm 22,81 \times 10^{12}/l$ ở nữ. Tỷ lệ thiếu máu 73,47% ở nam và 61,11% ở nữ.

2. Chỉ số bạch cầu trung bình: $11,88 \pm 6,38 \times 10^9/l$.

3. Chỉ số tiểu cầu trung bình: $371,45 \pm 198,16 \times 10^9/l$.

4. Hình thái thường gặp: hồng cầu chuỗi tiền, hình bia và nhược sắc; bạch cầu trung tính tăng đoạn nhân, tăng hạt đặc hiệu và tiểu cầu khổng lồ.

Tỷ lệ có thay đổi hình thái của các tế bào máu ngoại vi trên các bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR khá cao, do đó các bệnh nhân lao phổi trước khi điều trị bằng thuốc chống lao nên được làm xét nghiệm huyết đồ để tiên lượng có thể xảy ra phản ứng có hại của thuốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.V. Nhung (2015), *Guidelines for Tuberculosis Management*, Medical Publishing House, 180pp (in Vietnamese).
- [2] World Health Organization (2012), *A Practical Handbook on the Pharmacovigilance of Antituberculosis Medicines*, who.int/docs/default-source/documents/tuberculosis/a-practical-handbook-on-the-pharmacovigilance-of-medicines-used-in-the-treatment-of-tuberculosis.pdf?sfvrsn=6e5fc0cf_5, accessed 18 August 2021.
- [3] World Health Organization (2011), *Haemoglobin Concentrations for the Diagnosis of Anaemia and Assessment of Severity*, <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-NMH-NHD-MNM-11.1>, accessed 18 August 2021.
- [4] M. Banerjee, B.L. Chaudhary, S. Shukla (2015), "Hematological profile among pulmonary tuberculosis patients in tertiary care hospital", *International Journal of Bioassays*, **4**(5), pp.3900-3902.
- [5] P.J. Yaranal, T. Umashankar, S.G. Harish (2013), "Hematological profile in pulmonary tuberculosis", *International Journal of Health and Rehabilitation Sciences*, **2**(1), pp.50-55.
- [6] S. Iqbal, U. Ahmed, M.A. Khan (2015), "Haematological parameters altered in tuberculosis", *Pak. J. Physiol.*, **11**(1), pp.13-16.
- [7] A.M. Hakawi, A.A. Alrajhi (2006), "Tuberculosis of the bone marrow: Clinico-pathological study of 22 cases from Saudi Arabia", *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **10**(9), pp.1041-1044.
- [8] H.A. Shareef, N.R.M. Amin (2012), "Abnormalities of hematological parameters in newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients in Kirkuk city", *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences*, **5**(20), pp.1486-1492.
- [9] S.S. Shaharir, N.R. Tumian, A.B.Y. Lin, et al. (2013), "Disseminated tuberculosis masquerading primary myelodysplastic syndrome", *J. Infect. Dev. Ctries*, **7**(3), pp.286-288, DOI: 10.3855/jidc.2691.
- [10] J.Y. Wang, P.R. Hsueh, S.K. Wang, et al. (2007), "Disseminated tuberculosis: A 10-year experience in a medical center", *Medicine*, **86**(1), pp.39-46, DOI: 10.1097/MD.0b013e318030b605.

Hesperidin bảo vệ tế bào HEK293 trong mô hình tổn thương thận cấp *in vitro*

Vũ Thị Thu*, Ngô Thị Hải Yến

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 10/5/2022; ngày chuyển phản biện 13/5/2022, ngày nhận phản biện 27/5/2022, ngày chấp nhận đăng 1/6/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, tế bào biểu mô thận HEK293 được sử dụng để gây mô hình bệnh thiếu máu thận cấp *in vitro*. Hoạt tính sinh học của Hesperidin (Hes) được đánh giá thông qua tỷ lệ sống của tế bào HEK293 và hàm lượng lipid màng trong ty thể (cardiolipin). Kết quả cho thấy, Hes (nồng độ 4-32 μM) làm tăng đáng kể khả năng sống của tế bào HEK293 ở nhóm mô hình bệnh so với đối chứng ($p < 0,05$). Đặc biệt, nhóm tế bào được tiền xử lý với Hes (nồng độ 4 và 8 μM) trước giai đoạn thiếu oxy - tái cung cấp oxy có hàm lượng cardiolipin cao hơn so với nhóm tế bào mô hình bệnh nhưng không được xử lý với Hes. Kết quả thu được đã bước đầu chỉ ra rằng, Hes có thể là hoạt được tiềm năng trong việc bảo vệ tế bào HEK293 và ty thể của tế bào này chống lại tổn thương do thiếu oxy - tái cung cấp oxy.

Từ khóa: cardiolipin, HEK293, Hesperidin, ty thể.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Tổn thương thận cấp (acute kidney injury) liên quan đến sự suy giảm đột ngột (vài giờ đến vài ngày) mức lọc cầu thận, dẫn đến tích tụ độc tố trong máu [1]. Các nghiên cứu dịch tễ học đã chứng minh rằng, tổn thương thận cấp thường phát triển thành bệnh thận mạn tính và là yếu tố tăng tiến triển của bệnh thận giai đoạn cuối, do vậy chi phí điều trị là rất lớn [2]. Có nhiều nguyên nhân gây tổn thương thận cấp, trong đó có thể kể đến tổn thương thiếu máu cục bộ thận hay còn gọi là tổn thương thiếu oxy [3]. Trong giai đoạn thiếu hay nhồi máu cục bộ, giảm lượng máu nuôi dưỡng mô làm mô bị tổn thương [4]. Do vậy, việc tái tưới máu kịp thời sau nhồi máu là cần thiết để cứu vùng mô, tế bào bị tổn thương do thiếu máu cục bộ. Tuy nhiên, việc tái thông dòng máu, tái cung cấp oxy cũng có thể làm trầm trọng hơn những tổn thương trước đó [5]. Cho đến nay, sinh lý bệnh của tổn thương thận cấp do thiếu máu - tái tưới máu vẫn đang tiếp tục được làm rõ. Bên cạnh đó, nghiên cứu sàng lọc hoạt được mới có tác dụng phòng và giảm tổn thương do thiếu máu - tái tưới máu luôn được các nhà khoa học quan tâm và phát triển.

Ty thể là bào quan sinh năng lượng chính của tế bào và đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh lý bệnh thiếu máu - tái tưới máu thận [6]. Do vậy, duy trì ổn định chức năng ty thể là cần thiết để giảm thiểu tổn thương đối với tế bào biểu mô thận cũng như hạn chế tiến triển của bệnh. Thực tế, nghiên cứu sàng lọc được chất có tác dụng bảo vệ thận có cơ chế tác động nhắm đích ty thể đã đạt được một số thành tựu nhưng cũng rất cần tiếp tục được mở rộng nghiên cứu hơn nữa [3].

Hes là một flavanon glycosid (flavanon-7-rhamnoglucosid) và chiếm hàm lượng cao trong vỏ của quả thuộc chi Cam chanh [7]. Hes được chứng minh là có nhiều tác dụng sinh học như: kháng viêm [8], kháng virus [9], chống oxy hóa [10] và nấm [11]. Hes cũng được ghi nhận là có vai trò quan trọng trong cải thiện khả năng ghi nhớ [12], bảo vệ tế bào thần kinh trước ảnh hưởng của methotrexate [13], bảo vệ một số cơ quan trước tổn thương thiếu máu - tái tưới máu [14, 15]. Tuy nhiên, cơ sở khoa học về tác dụng bảo vệ hướng đích ty thể của Hes trong mô hình bệnh thiếu máu thận *in vitro* sử dụng tế bào HEK293 còn chưa rõ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tác dụng của Hes trong mô hình bệnh thận cấp *in vitro* (thiếu oxy - tái cung cấp oxy, HR) bằng việc phân tích tỷ lệ sống của tế bào HEK293 cũng như thành phần lipid màng ty thể của tế bào này.

2. Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, vật liệu

Dòng tế bào biểu mô phôi thận người HEK293 (ATCC® - USA) được cung cấp bởi Trường Đại học Inje, Hàn Quốc. He ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$) được cung cấp bởi Viện Dược liệu có độ tinh khiết 95% (HPLC, tính theo % diện tích đỉnh) [16]. Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Khoa học Sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. Hóa chất, thiết bị

Môi trường nuôi tế bào Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Mỹ); đệm phosphate buffered saline (PBS, Gibco, Mỹ); huyết thanh phôi bê (Fetal bovine serum, FBS, Gibco, Mỹ); kit phân tích tế bào (Cell Counting Kit-8, CCK-8,

*Tác giả liên hệ: Email: vtthu2015@gmail.com

Hesperidin exerts protective effects on HEK293 cells in an acute kidney injury model *in vitro*

Thi Thu Vu*, Thi Hai Yen Ngo

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

Received 10 May 2022; revised 27 May 2022; accepted 1 June 2022

Abstract:

In this research, HEK293 cells were subjected to a hypoxia-reoxygenation (HR) model *in vitro*. The protective effects of hesperidin (Hes) were evaluated by assessing the cell viability value and the mitochondrial cardiolipin content. In contrast to the HR-subjected cell group, Hes (concentrations of 4-32 μM) significantly improved the HEK293 cell viability value ($p < 0.05$). Moreover, the group of cells pretreated with Hes (concentrations of 4 and 8 μM) before the HR phase had higher cardiolipin content than the group of disease model cells but not treated with Hes. These preliminary results showed that Hes could be a potential compound in protecting HEK293 cells and their mitochondria against HR injury.

Keywords: cardiolipin, HEK293, hesperidin, mitochondria.

Classification number: 3.5

Dojindo, Nhật Bản); chất nhuộm chỉ thị cardiolipin màng ty thể 10-N-nonyl acridin orange (NAO, Invitrogen, Mỹ); kháng sinh Penicillin-Streptomycin (PS, Gibco, Mỹ); dung môi Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma, Mỹ); đĩa nuôi cấy 60x15 mm, 90x20 mm, đĩa 96 giếng trong (SPL-Life Sciences, Hàn Quốc), đĩa 96 giếng đen (Corning, Mỹ); tủ ấm CO₂; kính hiển vi soi ngược Axiovert (Carl Zeiss, Đức); máy đọc đĩa 96 giếng Spectramax plus 384, Tristar 2; các thiết bị, vật tư tiêu hao khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi tế bào HEK293: tế bào biểu mô thận người HEK293 được nuôi trong môi trường DMEM 4,5 g/l glucose có bổ sung 10% FBS và 1% PS ở 37°C và 5% CO₂. Môi trường nuôi được thay mới sau 2 ngày cấy chuyển. Mẫu tế bào được cấy chuyển khi mật độ che phủ đĩa nuôi đạt khoảng 80%.

Mô hình bệnh thận cấp *in vitro* bằng CoCl₂: Mô hình bệnh thận cấp *in vitro* (thiếu oxy - tái cung cấp oxy, HR) được tạo bằng cách sử dụng CoCl₂ [17, 18]. Tế bào HEK293 được nuôi với mật độ 10⁴ tế bào/giếng. Sau 24 giờ nuôi, mẫu tế bào tiếp tục được chia thành 2 nhóm như sau:

1) Nhóm đối chứng: tế bào HEK293 được nuôi trong điều kiện bình thường (DMEM, 10% FBS, 1% PS, 37°C và 5% CO₂) trong 48 giờ tiếp theo.

2) Nhóm thử nghiệm: Tế bào HEK293 được nuôi trong môi trường chứa CoCl₂ nồng độ 25-800 μM trong 24 giờ để mô phỏng điều kiện thiếu oxy. Tiếp đó, nhóm tế bào này được chuyển sang điều kiện nuôi bình thường (DMEM, 10% FBS, 1% PS, 37°C và 5% CO₂) trong 24 giờ để mô phỏng giai đoạn tái cung cấp oxy. Hiệu quả hoạt động của mô hình được đánh giá bằng cách phân tích khả năng sống của tế bào (kit CCK-8).

Đánh giá khả năng sống của tế bào bằng kit CCK-8: Tỷ lệ sống của tế bào được xác định gián tiếp thông qua kit CCK-8 với nguyên lý là WST-8 (theo hướng dẫn sử dụng). Các mẫu tế bào ở các nhóm thí nghiệm được ủ với dung dịch CCK-8 trong 1-4 giờ, ở 37°C. Mẫu tế bào được đo bằng máy đọc đĩa ở bước sóng hấp thụ 450 nm [19]. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá thành phần cardiolipin: Cardiolipin được đo gián tiếp bằng kit huỳnh quang NAO. Tế bào HEK293 được nuôi trong đĩa 96 giếng thành đen, đáy kính trong (10⁴ tế bào/giếng, 37°C, 5% CO₂). Các mẫu tế bào HEK293 được nhuộm NAO nồng độ 0,1 μM (ex/em: 495/519 nm) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau bước rửa bằng PBS, mật độ huỳnh quang NAO được xác định bằng máy đọc đĩa 96 giếng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá tác dụng của Hes đối với khả năng sống của tế bào HEK293 ở điều kiện bình thường: Tế bào HEK293 được nuôi trong đĩa 96 giếng trong (mật độ 10⁴ tế bào/giếng). Sau 24 giờ nuôi, môi trường cũ được loại bỏ, tế bào tiếp tục nuôi trong môi trường chứa Hes ở các nồng độ 2-128 μM trong 24 giờ. Tại cuối thời gian thí nghiệm, tỷ lệ tế bào sống ở các nồng độ thử nghiệm của Hes được đánh giá bằng kit CCK-8. Trong nghiên cứu này, Hes được hòa tan trong DMSO và được bổ sung vào môi trường nuôi ở các nồng độ lựa chọn. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá tác dụng của Hes đối với tế bào HEK293 trong điều kiện thiếu oxy - tái cung cấp oxy: Trong thí nghiệm này, các mẫu tế bào được chia thành các nhóm sau:

1) Nhóm đối chứng: Tế bào HEK293 được nuôi liên tục trong điều kiện thường trong 72 giờ.

2) Nhóm thử nghiệm: sau 24 giờ nuôi bình thường, tế bào HEK293 tiếp tục được chia thành: i) Nhóm DMSO (CoCl₂ + DMSO 0,1%): tế bào được nuôi trong môi trường có chứa DMSO 0,1%. Sau 24 giờ nuôi, CoCl₂ (300 μM) được bổ sung vào môi trường nuôi trong 24 giờ tiếp theo. Sau đó, môi trường chứa CoCl₂ bị loại bỏ, tế bào tiếp tục được nuôi ở điều kiện bình thường trong 24 giờ. ii) Nhóm Hes (CoCl₂ + DMSO 0,1% + Hes): trong giai đoạn tiền xử lý, tế bào HEK293 được nuôi trong môi trường DMEM chứa Hes ở dải nồng độ 2-64 μM trong 24 giờ. Sau đó, các mẫu tế bào HEK293 này tiếp tục được nuôi trong môi trường có chứa CoCl₂ (300 μM) trong 24 giờ tiếp theo. Sau 24 giờ nuôi mô phỏng giai đoạn tái cung cấp oxy, tỷ lệ sống của tế bào được đánh giá bằng kit CCK-8. Hàm lượng cardiolipin màng trong ty thể được đánh giá bằng kit NAO. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

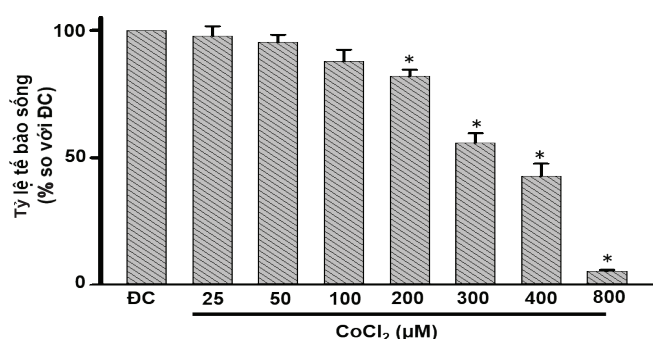
2.4. Xử lý số liệu

Các phần mềm Excel 2016 và Origin 8.5 được sử dụng để xử lý thống kê. Số liệu được trình bày dưới dạng $X \pm SD$ (X : giá trị trung bình, SD : độ lệch chuẩn). Sự khác biệt được phân tích bằng Anova, Tukey's test, $p < 0,05$ phản ánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (giá trị p lấy theo hai phía).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hiệu quả hoạt động của mô hình bệnh thận cấp *in vitro*

Trong nghiên cứu này, mô hình thiếu máu thận cấp (HR) *in vitro* được thiết lập bằng cách sử dụng CoCl_2 nhằm mô phỏng điều kiện thiếu oxy. Ảnh hưởng của CoCl_2 ở các nồng độ khác nhau được đánh giá thông qua tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong điều kiện HR (hình 1).

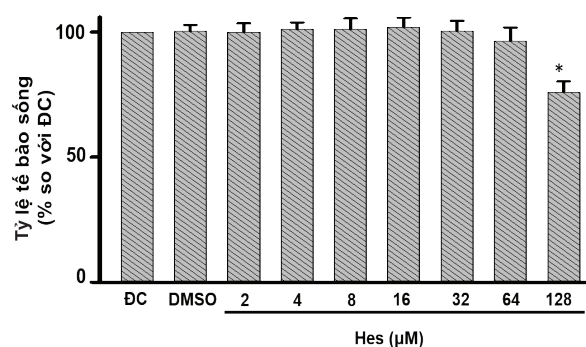


Hình 1. Tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong môi trường chứa CoCl_2 . ĐC (đối chứng): tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường; CoCl_2 : tế bào được nuôi trong môi trường có CoCl_2 ở nồng độ 25-800 μM trong 24 giờ; *: $p < 0,05$ so với ĐC.

Kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy, tỷ lệ sống của nhóm tế bào HEK293 khi được nuôi 24 giờ trong môi trường có CoCl_2 (nồng độ 200-800 μM) giảm mạnh so với tỷ lệ này được ghi nhận ở nhóm tế bào được dùng làm đối chứng ($p < 0,05$). So với nhóm đối chứng (100%), tỷ lệ sống của tế bào HEK293 khi được nuôi trong môi trường chứa CoCl_2 200 và 800 μM lần lượt là $82,04 \pm 2,51\%$ và $5,53 \pm 1,59\%$. Sự giảm tỷ lệ sống này có thể liên quan đến tác động của CoCl_2 trong việc làm tăng quá trình sản sinh gốc oxy tự do, giảm điện thế màng ty thể, hoạt hóa enzyme caspase-3, kích thích sự chết theo chương trình của tế bào, từ đó gây tổn thương và gây chết tế bào [20, 21]. Tương tự nghiên cứu trước đây [17, 18], kết quả nghiên cứu thể hiện mô hình HR gây bởi CoCl_2 hoạt động hiệu quả và có thể sử dụng để nghiên cứu sàng lọc các hợp chất có tác dụng bảo vệ tế bào HEK293 trong điều kiện bệnh lý. Dựa vào kết quả thu được, nồng độ CoCl_2 (300 μM) được lựa chọn để gây mô hình bệnh trong các phân tích tiếp theo.

3.2. Tác dụng của Hes đối với tế bào HEK293 trong điều kiện bình thường

Tác dụng của Hes đối với tế bào HEK293 trong điều kiện bình thường được đánh giá qua kết quả tỷ lệ tế bào sống trong môi trường nuôi có chứa Hes nồng độ 2-128 μM (hình 2).

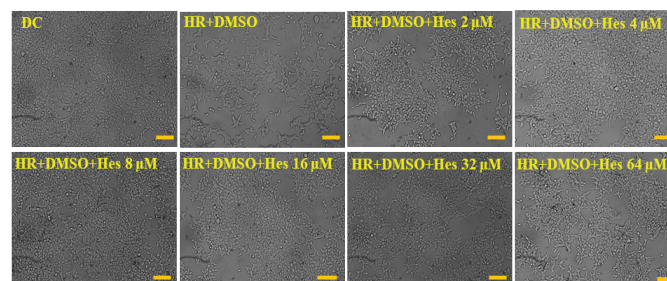


Hình 2. Tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong môi trường nuôi bình thường có chứa Hes. ĐC: tế bào được nuôi trong điều kiện thường; DMSO: tế bào được nuôi trong môi trường có chứa DMSO 0,1%; Hes: tế bào được nuôi trong môi trường có chứa Hes ở nồng độ 2-128 μM ; *: $p < 0,05$ so với ĐC.

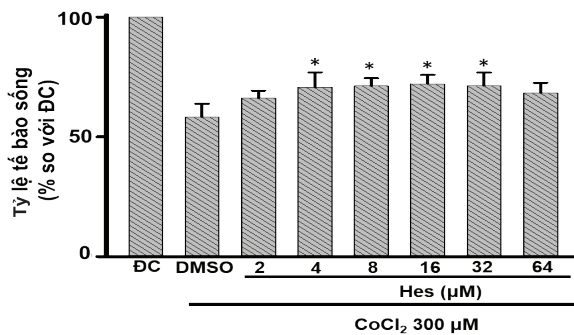
Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong các nhóm DMSO và Hes (nồng độ 2-64 μM) khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ này ở nhóm đối chứng ($p > 0,05$). Điều này thể hiện Hes 2-64 μM gần như không gây độc đối với tế bào HEK293. Hơn nữa, việc sử dụng DMSO 0,1% không ảnh hưởng tới kết quả phân tích thí nghiệm. Ngược lại, khi được nuôi trong môi trường có bổ sung Hes ở nồng độ 128 μM , tỷ lệ sống của nhóm tế bào HEK293 giảm còn $75,9 \pm 4,35\%$ so với đối chứng (100%, $p < 0,05$). Điều này chứng tỏ, Hes ở nồng độ cao (128 μM) gây độc tế bào HEK293. Trên cơ sở kết quả này, dải nồng độ 2-64 μM của Hes được chọn dùng cho các phân tích sâu hơn về tác dụng của hợp chất đối với tế bào HEK293 trong mô hình HR.

3.3. Tác dụng của Hes đối với tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong mô hình bệnh thận cấp *in vitro*

Trong giai đoạn thiếu máu, sự thiếu oxy là nguyên nhân chủ yếu gây tổn thương và chết tế bào. Trong nghiên cứu này, tác dụng của Hes đối với HEK293 trong mô hình thiếu máu thận HR *in vitro* được xác định thông qua phân tích sự thay đổi tỷ lệ sống của tế bào (hình 3 và 4).



Hình 3. Hình ảnh tế bào HEK293 trong mô hình bệnh thận thiếu oxy - tái cung cấp oxy và xử lý Hes. ĐC: tế bào được nuôi trong điều kiện thường; HR+DMSO: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1%; HR+DMSO+Hes: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1% và bổ sung Hes nồng độ 2-64 μM . Ảnh được chụp bởi vật kính 10X, thước đo 100 μm .



Hình 4. Tỷ lệ sống của tế bào HEK293 trong mô hình bệnh thận thiếu oxy - tái cung cấp oxy và xử lý Hes. ĐC: tế bào được nuôi trong điều kiện thường; DMSO: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1%; Hes: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1% và bổ sung Hes nồng độ 2-64 μM; *: $p < 0,05$ so với DMSO; số lần lặp lại thí nghiệm là 3.

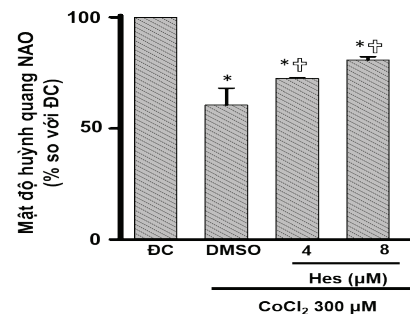
Tương tự kết quả ảnh chụp hình thái mẫu tế bào (hình 3), nhóm DMSO có tỷ lệ tế bào sống giảm còn $58,39 \pm 5,4\%$ so với đối chứng ($p < 0,05$, hình 4). Tiền xử lý với Hes ở các nồng độ 2, 4, 8, 16, 32 và 64 (μM) trong 24 giờ trước khi giai đoạn thiếu oxy - tái cung cấp oxy giúp tỷ lệ sống của tế bào HEK293 tăng, với các giá trị lần lượt là $66,20 \pm 3,09$, $70,71 \pm 6,19$, $71,29 \pm 3,14$, $72,18 \pm 3,64$, $71,41 \pm 3,16$ và $64,98 \pm 1,04\%$. Như vậy, tỷ lệ sống tăng và có khác biệt đáng kể khi mẫu tế bào được tiền xử lý với Hes ở các nồng độ 4, 8, 16 và 32 μM ($p < 0,05$). Mặt khác, tỷ lệ sống của tế bào trong các mẫu được bổ sung Hes ở nồng độ 4, 8, 16 và 32 μM là khá tương đương ($p > 0,05$). Tương tự với các nghiên cứu gần đây về Hes [16, 19], Hes ở nồng độ 4 và 8 μM tiếp tục được dùng để phân tích điều kiện tác động tối ưu của hợp chất.

Kết quả thu được cho thấy, Hes có tiềm năng trong việc bảo vệ tế bào HEK293 chống lại những tổn thương thận cấp trong mô hình bệnh sử dụng CoCl_2 . Điều này có thể được lý giải do Hes có tác dụng chống oxy hóa [10], chống viêm và chống lại sự chết theo chu trình của tế bào [22]. Tác dụng của Hes đối với tế bào HEK293 là khá tương đồng với tác dụng bảo vệ của hoạt động này đối với tế bào cơ tim chuột H9C2 trong nghiên cứu trước đây [16, 19]. Khả năng bảo vệ tế bào H9C2 trong điều kiện thiếu oxy - tái cung cấp oxy của Hes là do hợp chất này có tác dụng bảo tồn cấu trúc, chức năng ty thể và giảm sự hình thành gốc oxy tự do. Kết quả công bố về tỷ lệ tế bào sống cũng khẳng định vai trò của Hes trong việc cải thiện tổn thương gây ra bởi thiếu máu - tái tưới máu thận *in vivo* [23]. Nghiên cứu này đã cung cấp dẫn liệu về khả năng bảo vệ của Hes chống lại tổn thương thận do thiếu máu - tái tưới máu gây ra thông qua con đường tín hiệu TLR-4/NF-κB / iNOS [23]. Gần đây, vai trò chống oxy hóa của Hes cũng được công bố trong nghiên cứu về thiếu máu - tái tưới máu thận *in vivo* [24]. Nhóm chuột mô hình bệnh được bổ sung Hes có mức biểu hiện các enzyme có tác dụng chống oxy hóa cao hơn nhóm chuột mô hình bệnh không được bổ sung Hes [24]. Trong nghiên cứu hiện tại, vai trò của Hes trong việc bảo vệ tế bào HEK293 chống lại tổn thương do HR

bước đầu được làm rõ. Kết quả thu được có thể là cơ sở tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn để xác định cơ chế sinh học của hoạt động này trong mô hình bệnh lý thận cấp.

3.4. Tác dụng của Hes đối với ty thể tế bào HEK293 trong mô hình bệnh thận cấp *in vitro*

Vai trò của Hes đối với ty thể của tế bào HEK293 được đánh giá thông qua hàm lượng lipid (cardiolipin) tham gia cấu trúc màng trong ty thể. Hàm lượng cardiolipin được đo gián tiếp dựa vào giá trị mật độ huỳnh quang NAO (hình 5).



Hình 5. Mật độ huỳnh quang NAO của tế bào HEK293. ĐC: tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường; DMSO: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1%; Hes: tế bào mô hình HR được nuôi trong điều kiện có DMSO 0,1% và bổ sung Hes nồng độ 2-64 μM; *: $p < 0,05$ so với ĐC; *: $p < 0,05$ so với DMSO; số lần lặp lại thí nghiệm là 3.

Cardiolipin là phospholipid đóng vai trò quan trọng đối với việc duy trì ổn định cấu trúc và hoạt động chức năng năng ty thể [25]. Trong bệnh thiếu máu - tái tưới máu thận, sự tăng stress oxy hóa ty thể dẫn đến sự oxy hóa cardiolipin, qua đó ảnh hưởng tới hoạt động của chuỗi vận chuyển điện tử và qua đó làm rối loạn hoạt động chức năng ty thể [26], thậm chí có thể gây chết tế bào. Do vậy, việc bảo toàn thành phần cardiolipin có vai trò quan trọng giúp giảm thiểu tổn thương đối với ty thể và tế bào thận trong bệnh thiếu máu tái tưới máu.

Kết quả cho thấy, giá trị mật độ huỳnh quang NAO của nhóm tế bào được tiền xử lý với Hes ở nồng độ 4 và 8 μM tăng và có giá trị lần lượt là $72,57 \pm 1,13\%$ và $80,79 \pm 1,43\%$ (% so với đối chứng, hình 4). Các giá trị này là cao hơn đáng kể so với nhóm DMSO ($60,51 \pm 7,66\%$, $p < 0,05$). Như vậy, Hes ở các nồng độ 4 và 8 μM có khả năng bảo tồn cardiolipin màng ty thể trong tổn thương gây ra do HR, qua đó làm tăng khả năng chống oxy hóa và bảo toàn hiệu quả hoạt động của chuỗi vận chuyển điện tử [26, 27]. Bên cạnh đó, kết quả cũng chỉ ra rằng, tỷ lệ mật độ huỳnh quang NAO của nhóm tế bào được tiền xử lý với Hes 8 μM cao hơn so với nhóm tế bào được tiền xử lý với Hes 4 μM (hình 4). Tuy nhiên, sự khác biệt này là không đáng kể ($p > 0,05$). Kết quả này khá phù hợp với sự thay đổi tỷ lệ sống của tế bào HEK293 ở trên.

Như vậy, kết quả cho thấy Hes có khả năng bảo vệ tế bào biểu mô thận HEK293 và ổn định cấu trúc màng ty thể. Tuy nhiên, nghiên cứu hiện tại chưa đánh giá cơ chế tác động ở cấp độ phân

tử của Hes trong việc bảo vệ tế bào HEK293 chống lại tổn thương HR *in vitro*.

4. Kết luận

Nghiên cứu này bước đầu đã cung cấp số liệu về vai trò của Hes đối với tế bào HEK293 trong mô hình thiếu máu thận cấp *in vitro*. Hes ở nồng độ 4 và 8 μM có tác dụng làm giảm tỷ lệ tế bào HEK293 trong điều kiện thiếu oxy - tái cung cấp oxy thông qua việc bảo toàn thành phần cardiolipin màng ty thể. Kết quả có thể là tiền đề cho các nghiên cứu đánh giá sâu hơn về cơ chế tác dụng của Hes trong mô hình bệnh liên quan.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Trung tâm Khoa học Sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội đã tạo điều kiện để thực hiện nghiên cứu; chân thành cảm ơn GS Han Jin đã tặng nhóm nghiên cứu mẫu tế bào HEK293, PGS.TS Phương Thiện Thương và TS Nguyễn Thị Hà Ly đã cung cấp tinh chất Hes, TS Phạm Thị Bích và ThS Nguyễn Trung Chức đã hỗ trợ chuẩn bị một số điều kiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S.J. Han, H.T. Lee (2019), "Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury", *Kidney Res. Clin. Pract.*, **38**(4), pp.427-440, DOI: 10.23876/j.krcp.19.062.

[2] G. Clermont, C.G. Acker, D.C. Angus, et al. (2002), "Renal failure in the ICU: Comparison of the impact of acute renal failure and end-stage renal disease on ICU outcomes", *Kidney Int.*, **62**(3), pp.986-996, DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00509.x.

[3] N. Pabla, A. Bajwa (2021), "Role of mitochondrial therapy for ischemic reperfusion injury and acute kidney injury", *Nephron*, **146**(3), pp.253-258, DOI: 10.1159/000520698.

[4] K.R. Thomson, A.C. Venbrux, K.P.J. Murphy, et al. (2020), *Image-Guided Interventions*, Elsevier Health Sciences, 1072pp.

[5] M. Malek, M. Nematbakhsh (2015), "Renal ischemia/reperfusion injury: from pathophysiology to treatment", *Journal of Renal Injury Prevention*, **4**(2), pp.20-27, DOI: 10.12861/jrip.2015.06.

[6] J.L. Martin, A.V. Gruszczuk, T.E. Beach, et al. (2019), "Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury", *Pediatr. Nephrol.*, **34**(7), pp.1167-1174, DOI: 10.1007/s00467-018-3984-5.

[7] J.J. Peterson, J.T. Dwyer, G.R. Beecher, et al. (2006), "Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: A compilation and review of the data from the analytical literature", *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**(1), pp.S66-S73, DOI: 10.1016/j.jfca.2005.12.006.

[8] S. Ansoorge, D. Reinhold, U. Lendeckel (2003), "Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells", *Z. Naturforsch C. J. Biosci.*, **58**(7-8), pp.580-589, DOI: 10.1515/znc-2003-7-823.

[9] R.K. Saha, T. Takahashi, T. Suzuki (2009), "Glucosyl hesperidin prevents influenza A virus replication in vitro by inhibition of viral sialidase", *Biol. Pharm. Bull.*, **32**(7), pp.1188-1192, DOI: 10.1248/bpb.32.1188.

[10] P.K. Wilmsen, D.S. Spada, M. Salvador (2005), "Antioxidant activity of the flavonoid Hesperidin in chemical and biological systems", *J. Agric. Food Chem.*, **53**(12), pp.4757-4761, DOI: 10.1021/jf0502000.

[11] J.A. del Rio, P. Gómez, A.G. Baidez, et al. (2004), "Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*", *J. Agric. Food Chem.*, **52**(7), pp.1913-1917, DOI: 10.1021/jf035038k.

[12] A. Aranarochana, S. Kaewngam, T. Anosri, et al. (2021), "Hesperidin reduces memory impairment associated with adult rat hippocampal neurogenesis triggered by valproic acid", *Nutrients*, **13**(12), DOI: 10.3390/nu13124364.

[13] J.U. Welbat, S. Naewla, W. Pannangrong, et al. (2020), "Neuroprotective effects of Hesperidin against methotrexate-induced changes in neurogenesis and oxidative stress in the adult rat", *Biochemical Pharmacology*, **178**, DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114083.

[14] E. Celik, H. Oguzturk, N. Sahin, et al. (2016), "Protective effects of Hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats", *Arch. Med. Sci.*, **12**(5), pp.928-934, DOI: 10.5114/aoms.2015.47697.

[15] M. Pashai, S.N.S. Toutouchi, M. Rameshrad, et al. (2016), "The effects of Hesperidin on ischemia/reperfusion induced arrhythmias and infarct size in isolated rat heart", *Pharm. Sci.*, **22**(2), pp.68-75, DOI: 10.1517/PS.2016.12.

[16] V.T. Thu, P.T. Thuong (2021), "Hesperidin extracted from *Citrus reticulata* Blanco protects cardiac mitochondria against hypoxia/reoxygenation injury", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **37**(4), pp.40-47, DOI: 10.25073/2588-1140/vnunst.5328.

[17] N.T.H. Yen, D.T.Dau, P.T. Bich, et al. (2019), "Designing and evaluating the effectiveness of hypoxia chamber applied in myocardial hypoxia-reoxygenation model *in vitro*", *Vietnam Journal of Physiology*, **23**(3), pp.1-8 (in Vietnamese).

[18] X. Ge, L. Zhao, L. He, et al. (2012), "Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2, Flk-1/KDR) protects HEK293 cells against CoCl₂-induced hypoxic toxicity", *Cell Biochemistry and Function*, **30**(2), pp.151-157, DOI: 10.1002/cbf.1829.

[19] N.T.H. Yen, H.L. Phuong, N.T.H. Ly, et al. (2020), "Evaluating the protective effects of Hesperidin on H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation injury *in vitro*", *The 4th National Scientific Conference on Biological Research and Education in Vietnam*, pp.630-637 (in Vietnamese).

[20] A. Lan, X. Liao, L. Mo, et al. (2017), "Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells", *PLOS ONE*, **25**(4), pp.615-619, DOI: 10.1371/journal.pone.0025921.

[21] N.K. Rana, P. Singh, B. Koch (2019), "CoCl₂ simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis", *Biological Research*, **52**(1), DOI: 10.1186/s40659-019-0221-z.

[22] H. Parhiz, A. Roohbakhsh, F. Soltani, et al. (2015), "Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An updated review of their molecular mechanisms and experimental models", *Phytotherapy Research*, **29**(3), pp.323-331, DOI: 10.1002/ptr.5256.

[23] X. Meng, M. Wei, D. Wang, et al. (2020), "The protective effect of Hesperidin against renal ischemia-reperfusion injury involves the TLR-4/NF- κ B/iNOS pathway in rats", *Physiol. Int.*, **107**(1), pp.82-91, DOI: 10.1556/2060.2020.00003.

[24] W.S. Park, M.S. Park, S.W. Kang, et al. (2019), "Hesperidin shows protective effects on renal function in ischemia-induced acute kidney injury (Sprague-Dawley Rats)", *Transplantation Proceedings*, **51**(8), pp.2838-2841, DOI: 10.1016/j.transproceed.2019.02.055.

[25] J. Dudek (2017), "Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **5**(90), pp.1-17, DOI: 10.3389/fcell.2017.00090.

[26] G.P.V. Paradies, V. Paradies, V.D. Benedictis, et al. (2014), "Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics", *Biochimica et Biophysica Acta. (BBA) - Bioenergetics*, **1837**(4), pp.408-417, DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.10.006.

[27] D. Wang, L. Liu, X. Zhu, et al. (2014), "Hesperidin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a mouse model of alzheimer's disease", *Cellular and Molecular Neurobiology*, **34**(8), pp.1209-1221, DOI: 10.1007/s10571-014-0098-x.

Tế bào gốc từ tủy xương: Đặc điểm, tiềm năng và ứng dụng trong điều trị biến chứng bệnh tiểu đường

Nguyễn Ngọc Hiếu^{1*}, Nguyễn Chí Trường², Nguyễn Chí Toàn¹, Nguyễn Văn Hương³,
Ngô Thị Minh Thu¹, Lâm Phạm Phước Hùng⁴

¹Trường Đại học Duy Tân, 254 Nguyễn Văn Linh, phường Thạc Gián, quận Thanh Khê, TP Đà Nẵng, Việt Nam

²Bệnh viện Đa khoa Quảng Ngãi, Lê Hữu Trác, phường Nghĩa Lộ, TP Quảng Ngãi, tỉnh Quảng Ngãi, Việt Nam

³Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, 300A Nguyễn Tất Thành, phường 13, quận 4, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Bệnh viện Đa khoa TP Hồ Chí Minh, 2 Nguyễn Thông, phường Võ Thị Sáu, quận 3, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/3/2021; ngày chuyển phản biện 8/3/2021; ngày nhận phản biện 5/4/2021; ngày chấp nhận đăng 9/4/2021

Tóm tắt:

Tiểu đường (Diabetes mellitus - DM) là một bệnh mạn tính không lây, đang gia tăng nhanh chóng, nhất là ở những nước đang phát triển và trở thành gánh nặng bệnh tật toàn cầu. Điều làm cho bệnh DM trở nên nghiêm trọng chính là các biến chứng của nó. Trong y học tái tạo, liệu pháp tế bào gốc được đánh giá là một phương pháp mới điều trị hiệu quả các biến chứng của DM. Tế bào gốc có nguồn gốc từ tủy xương (Bone marrow - BM) được xem là một ứng cử viên sáng giá trong liệu pháp này. Tuy nhiên, bản thân BM cũng bị ảnh hưởng bởi bệnh lý DM vì nó có thể phát triển một bệnh lý vi mạch và bệnh thần kinh tương tự như các mô khác của cơ thể. Bài báo tổng quan này cung cấp một số thông tin về đặc điểm của các loại tế bào gốc từ BM và vai trò của chúng ở bệnh DM: chúng bị ảnh hưởng như thế nào bởi sự toàn vẹn của BM, tiềm năng và ứng dụng của tế bào gốc từ BM trong điều trị các biến chứng của DM. Trên cơ sở đó, nhóm tác giả đề xuất một số phương pháp mới để tối ưu hóa liệu pháp tế bào gốc.

Từ khóa: biến chứng tiểu đường, tế bào gốc, tiểu đường, tủy xương.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

DM là một rối loạn chuyển hóa đặc trưng bởi đường huyết cao. Tăng đường huyết mạn tính gây ra các biến chứng khó lường, có tỷ lệ tử vong cao, bệnh DM được coi là một trong những căn bệnh nguy hiểm nhất hiện nay. Trên toàn thế giới hiện có khoảng 387 triệu người mắc bệnh DM, dự kiến năm 2030 tỷ lệ tử vong do căn bệnh này sẽ đứng thứ 7 trên toàn thế giới. Ở Việt Nam, 10 năm trở lại đây, bệnh nhân DM tăng khoảng 5,54% và ngày càng trẻ hóa [1].

Tăng đường huyết mạn tính gây ra các biến chứng như tim mạch, động mạch ngoại biên, loét, suy thận mạn... làm tăng tỷ lệ tử vong cũng như gánh nặng bệnh tật. Hiện nay, với sự phát triển của nền y học hiện đại, đã có nhiều phương pháp mới được nghiên cứu trong điều trị các biến chứng DM nhưng vẫn chưa mang lại hiệu quả cao. Liệu pháp dựa trên tế bào gốc có nhiều hứa hẹn trong việc điều trị các biến chứng DM. Gần đây, trên thế giới có nhiều công trình công bố tiềm năng của tế bào gốc có nguồn gốc từ BM trong điều trị một số biến chứng DM và mang lại hiệu quả đáng kể [2].

Trong bài tổng quan này, chúng tôi tóm tắt ngắn gọn về đặc điểm của tế bào gốc từ BM và những thành tựu ứng dụng tế bào gốc có nguồn gốc từ BM trong điều trị các biến chứng DM. Chúng tôi cũng thảo luận về những ưu và nhược điểm của liệu pháp tế bào gốc từ BM, đặc biệt là những

phát hiện mới về các biến chứng thường gặp của DM cũng ảnh hưởng đến BM và gây ra những hạn chế trong việc huy động tế bào trong quá trình điều trị. Cuối cùng, chúng tôi đề xuất một số giải pháp khả thi để cải thiện phương pháp trị liệu bằng tế bào hiện tại.

2. Tế bào gốc có nguồn gốc từ BM và các ổ (niches) tế bào gốc

BM là nguồn chứa tế bào gốc đa tiềm năng của con người (HPSCs) trong cơ thể người trưởng thành, cung cấp một vi môi trường cụ thể để duy trì trạng thái “gốc” của tế bào. Ở đây, chúng tôi cung cấp cái nhìn tổng quan ngắn gọn về quần thể tế bào và tổ chức của chúng trong các ổ của BM.

2.1. Tế bào gốc tạo máu (HSC)

HSC là một quần thể không đồng nhất, có thể tạo ra bất kỳ tế bào máu nào. Chúng được định nghĩa là tế bào gốc trưởng thành, đa tiềm năng và có khả năng tự đổi mới. Dựa trên khả năng khôi phục lại quần thể tế bào máu khi ghép vào động vật được chiếu xạ, 2 quần thể HSC khác nhau đã được xác định là HSC ngắn hạn short-term HSCs (ST-HSC) và HSC dài hạn long-term HSCs (LT-HSC) [3]. Ở người, CD34 là dấu ấn đặc trưng của HSCs và được sử dụng để chọn lọc quần thể HSCs cho các thử nghiệm liệu pháp tế bào lâm sàng. Việc chọn lọc tế bào máu có CD3⁺ và kháng nguyên Lin⁻ cho phép thu được lượng tế bào mang hoạt tính tiền thân hay tính gốc cao nhất. Hơn nữa, các quần thể thu

*Tác giả liên hệ: Email: ngochieu0707@gmail.com

Bone marrow-derived stem cells: Characters, potentials, and applications in the treatments of diabetic complications

Ngoc Hieu Nguyen^{1*}, Chi Truong Nguyen²,
Chi Toan Nguyen¹, Van Huong Nguyen³,
Thi Minh Thu Ngo¹, Pham Phuoc Hung Lam⁴

¹Duy Tan University,

254 Nguyen Van Linh Street, Thac Gian Ward, Thanh Khe District, Da Nang City, Vietnam

²Quang Ngai Provincial General Hospital,

Le Huu Trac Street, Nghia Lo ward, Quang Ngai city, Quang Ngai province, Vietnam

³Nguyen Tat Thanh University,

300A Nguyen Tat Thanh Street, Ward 13, District 4, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Ho Chi Minh City Hospital of Dermato Venereology,

2 Nguyen Thong Street, Vo Thi Sau Ward, District 3, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 3 March 2021; revised 5 April 2021; accepted 9 April 2021

Abstract:

Diabetes mellitus (DM) has become one of the most prevalent non-communicable diseases affecting people around the world, growing rapidly, especially in developing countries, and becoming a global health and economic burden. The main complications of DM make it serious for patients. In regenerative medicine, stem cell therapy is highly regarded as a new method of effective treatment of complications of DM. Stem cells derived from bone marrow (BM) are considered to be a bright candidate for this therapy. However, BM itself is affected by diabetic pathologies, as affected BM could develop pathological micro-vessels and neuropathy similar to the tissues of the body. In this review, the authors provide information about the characteristics of BM stem cells, assessing the role of BM stem cells in DM: how they are affected by the integrity of the BM, potential, and how they can be used to treat these diabetic complications. Finally, the authors propose new methods for optimising stem cell therapies.

Keywords: bone marrow (BM), diabetes mellitus (DM), diabetic complications, stem cell.

Classification number: 3.5

được sau đó có thể được làm giàu hơn nữa bằng cách chọn lọc Thy1⁺ (một dấu ấn cơ bản của tế bào gốc). Bổ sung thêm chọn lọc CD38⁺, CD45⁺ và CD49⁺ để có thể giúp nhận dạng được LT-HSCs. A.P. Kusumbe và cs (2014) [4] đã chứng minh, BM HSCs tham gia trực tiếp vào quá trình tạo mạch mới, thay vì chuyển đổi một loại tế bào này sang loại tế bào khác, có mối liên hệ giữa các tế bào tạo máu và tế bào mạch máu.

2.2. Tế bào gốc trung mô (MSC)

MSC là một quần thể tế bào đa tiềm năng đặc trưng trong BM cũng như trong một số mô trưởng thành khác.

Chúng có hình dạng giống nguyên bào sợi, có khả năng tăng sinh cao, điều hòa miễn dịch và biệt hóa thành các dòng tế bào chuyên biệt như tế bào xương, sụn..., ngoài ra MSC còn có tiềm năng biệt hóa thành tế bào thần kinh và nội mô [3]. Chúng thường biểu hiện các dấu ấn của tế bào trung mô như CD44, CD90, CD49, CD54, CD105, CD73, âm tính với các dấu ấn tế bào tạo máu như CD45, CD14, CD11b và các dấu ấn tế bào nội mô như CD144, glycoprotein đa sắc tố (von Willebrand factor - vWf) và protein bám dính tế bào mạch máu 1 (Vascular cell adhesion molecule 1 - VCAM-1) [5]... Từ đó cho thấy MSC có nhiều tiềm năng ứng dụng trong y học tái tạo.

2.3. Tế bào tiền thân nội mô (EPC)

Các EPC là những tế bào tạo mạch, lần đầu tiên được phát hiện vào năm 1997. Xác định EPC là một tập hợp con của tế bào bạch cầu/đơn nhân có thể nhận biết với các marker nội mô, như CD31, KDR hoặc vWf [6]. Chúng được coi là một quần thể khác của các EPC trưởng thành (Endothelial colony forming cell - ECFC), không có nguồn gốc từ tủy và giống với các tế bào nội mô, có khả năng chúng bắt nguồn từ các tế bào tiền thân liên quan đến mạch máu. Vai trò của EPC chủ yếu là paracrine hơn là biệt hóa thành các tế bào tạo mạch [7]. EPC đã được nghiên cứu rộng rãi trên lâm sàng nhờ vai trò hỗ trợ của chúng trong quá trình tạo mạch.

3. Hiệu quả điều trị các biến chứng DM bằng tế bào gốc có nguồn gốc từ BM

3.1. Bệnh võng mạc trong DM

Bệnh võng mạc trong DM (Diabetic retinopathy - DR) là nguyên nhân chính gây suy giảm thị lực ở người trưởng thành trong độ tuổi lao động ở các nước phương Tây. Cơ chế chính của DR có liên quan đến việc mất pericyte (một loại tế bào cung cấp môi trường chống viêm và ổn định cho các tế bào nội mô võng mạc của con người). Trong giai đoạn đầu, DM làm suy yếu khả năng tự làm mới của pericyte và sự tồn tại của tế bào nội mô, dẫn đến thiếu oxy ở vi môi trường võng mạc. Điều này kích hoạt sự di chuyển của yếu tố kích thích giảm oxy 1α (Hypoxia inducible factor - 1α - HIF-1α), từ đó dẫn đến biểu hiện của tăng yếu tố tăng trưởng nội mạch A (VEGF-A). Sản xuất VEGF-A kéo dài kích thích tân sinh mạch, hình thành sẹo nguyên bào sợi và gây rò rỉ thành mạch, dẫn đến bệnh võng mạc DM (PDR) [8].

Liệu pháp tế bào đã được đề xuất như một phương pháp mới để điều trị PDR cho DM, trong đó MSCs được coi như một trong những ứng cử viên sáng giá nhất. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra sự tương đương giữa các MSCs và pericyte, qua đó giúp MSC trở thành tế bào thay thế đầy tiềm năng. Hơn nữa, MSCs có nguồn gốc BM có khả năng biệt hóa thành các tế bào nhận kích thích ánh sáng và biểu mô sắc tố võng mạc trong *in vitro* và *in vivo*. Điều này được coi là quan trọng cho sự thoái hóa thần kinh, bao gồm phản ứng

tế bào thần kinh đệm, kích hoạt vi tế bào thần kinh đệm và tế bào thần kinh chết theo chương trình, diễn ra ở giai đoạn đầu của DR. Giai đoạn đầu tiên I/II của thử nghiệm lâm sàng sử dụng MSCs trong điều trị viêm võng mạc sắc tố, L. Qu và cs (2017) [9] đã cho thấy, ghép MSC BM điều trị bệnh võng mạc sắc tố sau 6 tuần điều trị nhận thấy biệt hóa tế bào nhận kích thích ánh sáng tốt, kích hoạt microglia và gliosis của các tế bào Müller đã được ức chế. Trong nghiên cứu lâm sàng, R.C. Siqueira và cs (2015a) [10] đã chứng minh sự cải thiện tốt trong điều trị bệnh nhân, tuy nhiên chỉ trong một thời gian ngắn, vì sau 12 tháng điều trị chúng không còn hiệu quả.

Bên cạnh các MSC, CD34⁺ và HSC cũng được xem như một nhân tố thay thế lý tưởng. Ghép các tế bào CD34⁺ cho thấy tương tự như MSCs, khả năng phục hồi mạch máu võng mạc và tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh. Quan trọng hơn, ghép tế bào CD34⁺ có nguồn gốc BM là an toàn và dung nạp tốt về lâu dài [9]. S.S. Park và cs (2012) [11] đã cho thấy, tế bào CD34⁺ sau 8 tháng kể từ khi ghép không có dấu hiệu của khối u nội nhãn hoặc phát triển mô bất thường. E. Moisseiev và cs (2016) [12] ghép tế bào CD34⁺ HSC sau 4 tuần nhận thấy tế bào võng mạc phục hồi nhanh, ngoài ra họ còn nhận thấy có sự thay đổi biểu hiện hơn 300 gen, chủ yếu là những gen điều hòa chức năng của tế bào nhận kích thích ánh sáng và chết tế bào theo chương trình. Những cơ sở đó đã cho thấy tiềm năng thử nghiệm lâm sàng ở những bệnh nhân bị mù không hồi phục từ các bệnh lý võng mạc khác nhau, bao gồm cả DR. Trước đây, R.C. Siqueira và cs (2015b) [13] đã điều trị cho bệnh nhân bị phù điểm vàng của võng mạc liên quan đến thoái hóa điểm vàng võng mạc, quan sát thấy sự cải thiện trong biểu hiện thị giác của bệnh nhân.

3.2. Bệnh cơ tim trong DM (DCM)

DCM được đặc trưng bởi tăng khối lượng cơ và độ dày thành thất trái liên quan đến phì đại tế bào cơ tim. Tương tự như các biến chứng DM khác, DCM có thể bắt nguồn từ sự thay đổi chuyển hóa liên quan đến tăng đường huyết mạn tính. Kháng insulin dẫn đến sự chuyển đổi từ quá trình chuyển hóa oxy hóa glucose sang quá trình oxy hóa axit béo tự do, đòi hỏi nhiều oxy hơn. Những yếu tố này gây ra thiếu máu cơ tim chuyển hóa yếm khí, từ đó tạo ra nhiều chất chuyển hóa lactate và axit dẫn đến tích tụ lipid, thay đổi sự co bóp cơ tim và apoptosis [14]. Stress oxy hóa gia tăng và sự hình thành sản phẩm glycat hóa bền vững (AGE) góp phần gây xơ hóa và tế bào chết theo chương trình, trong khi sự xuất hiện của rối loạn chức năng nội mô biểu hiện là thay đổi tính thấm và tăng bạch cầu, dẫn đến phù và viêm cơ tim [14].

Liệu pháp tế bào có thể sẽ mang lại lợi ích cho DCM thông qua các cơ chế tái tạo, pro-angiogen, chống xơ hóa và viêm. Trong *in vitro* và *in vivo*, MSC có khả năng biệt hóa thành tế bào cơ tim. Trong nghiên cứu ghép MSC ở chuột bị suy tim, MSC kích thích, tăng đáng kể mật độ mao mạch

và giảm collagen trong cơ tim, dẫn đến giảm áp lực cuối tâm trương thất trái. Ngoài ra, nghiên cứu này còn cho thấy, tình trạng xơ hóa đã giảm đáng kể, các chỉ số của tim được cải thiện. Bên cạnh đó, MSCs bảo vệ tế bào cơ tim khỏi bị apoptosis bằng cách điều hòa các protein 14-3-3 và p-Ask1 hay làm giảm tải nhiễm tế bào miễn dịch [15]. Gần đây, tế bào BM từ các bệnh nhân bị nhồi máu đã chứng minh rằng di chuyển theo hướng SDF-1 làm phong phú thêm cho các tế bào với hoạt động chữa bệnh [16]. Ngoài ra, các EPC có nguồn gốc BM không chỉ thúc đẩy quá trình tân mạch mà còn chống xơ hóa cơ tim của bệnh nhân DM bằng cách ức chế paracrine của miR-155. Y. Cheng và cs (2012) [17] cho rằng, EPC cải thiện chức năng tim bệnh thông qua giảm collagen tuýp I, Bax, caspase-3 và p67phox, đồng thời làm tăng biểu hiện của Bcl-2 và mangan superoxide effutase (MnSOD). EPC làm giảm biểu hiện Caspase-3 và tăng biểu hiện của các gen Bcl2, VEGF và bFGF, từ đó sửa chữa cơ tim DM type 1 [18].

Cho đến nay, liệu pháp tế bào BM đã được thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân suy tim cấp tính hoặc mạn tính, cho các kết quả khác nhau. Tuy nhiên, vẫn chưa có thử nghiệm lâm sàng nào được thực hiện với các tế bào BM để điều trị DCM.

3.3. Bệnh thận trong DM

Bệnh thận trong DM là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến bệnh thận giai đoạn cuối (ESRD) trên toàn thế giới. Thận bị biến đổi do phì đại cầu thận, dày màng đáy, giãn nở nội mạc, teo ống, xơ hóa kẽ và dày thành động mạch. Những thay đổi hình thái là do tăng đường huyết mạn tính và tăng stress oxy hóa. Rối loạn chức năng của thận là yếu tố quan trọng gây ra bệnh lý.

Liệu pháp tế bào BM đã được thử nghiệm trên các mô hình động vật của bệnh thận DM với kết quả đầy hứa hẹn. Vào năm 2006, một nghiên cứu đã báo cáo rằng, ghép MSCs ở mô hình chuột T1DM giúp cải thiện kiểm soát trao đổi chất cũng như hình thái cầu thận, dày lên các mesangial và giảm thâm nhiễm đại thực bào. Các nghiên cứu trên lâm sàng cũng cho thấy hiệu quả của MSCs trong điều trị. Eirin và A. Lerman (2014) [19] chỉ ra rằng, ghép MSCs cải thiện vi mạch ở vùng vỏ và tủy thận bằng cách giảm xơ hóa vi mạch, tân tạo vi mạch mới. D.K. Packham và cs (2016) [20] cho thấy, ghép MSC vào bệnh nhân bị bệnh thận DM đã làm giảm tốc độ giảm mức lọc cầu thận của bệnh nhân và làm ổn định mức lọc cầu thận. Cơ chế của liệu pháp MSCs bao gồm ức chế stress oxy hóa thông qua cải thiện độ nhạy insulin dẫn đến kiểm soát trao đổi chất tốt hơn [21]. Hơn nữa, các MSCs có nguồn gốc từ BM làm giảm sự xâm nhập của đại thực bào bằng cách điều hòa các cytokine, như protein có ái lực hóa học với bạch cầu đơn nhân (Monocyte chemotactic protein 1 - MCP-1), interleukin 1β (IL-1β), IL-6 và yếu tố hoại tử khối u alpha (Tumor necrosis factor α-TNF-α) [3]. Ngoài ra, VEGF và protein chống apoptotic bcl2, TGF-β và

yếu tố pro-apoptotic Bax được điều hòa. Ức chế trong con đường truyền tín hiệu TGF có liên quan đến giảm xơ hóa, cơ chế này có thể do osteogenic protein-1 được tiết ra [22]. Qua đó có thể thấy rằng, các tế bào BM có tiềm năng lớn trong điều trị bệnh thận do DM.

3.4. Bệnh thần kinh trong DM (DNP)

DNP là một biến chứng phổ biến của DM và gắn liền với các biến chứng mạch máu. Các nghiên cứu liệu pháp tế bào tiền lâm sàng cho thấy kết quả đầy hứa hẹn trong điều trị DNP. Trong một mô hình chuột T1DM, MSCs cải thiện tình trạng giảm trương lực và cải thiện tốc độ dẫn truyền thần kinh, lưu lượng máu thần kinh và tỷ lệ sợi cơ, mao mạch trong cơ bắp. MSCs tiết ra hàng loạt các cytokine chống viêm, điều hòa miễn dịch, cùng với các yếu tố NGF, VEGF và IGF-1 [3]. Trong mô hình chuột T1DM, ghép EPC đã tăng VEGF, bFGF và protein onco-gen thuộc họ gen onco-gen liên quan đến tăng sinh của tế bào Schwann và tế bào nội mô. Điều thú vị là các EPC được ghép có xu hướng colocalize gần vasa nervorum. Khác với các quần thể tế bào BM khác, các tế bào đơn nhân có nguồn gốc BM (MNC) đã tái tạo thần kinh ngoại biên ở mô hình chuột DNP. Về biến chứng, nhiều nghiên cứu *in vivo* cho thấy sự huy động tế bào nội mô như một phương pháp điều trị thay thế cho liệu pháp tế bào cổ điển. Trong một mô hình chuột của DNP, việc ghép G-CSF vào màng bụng đã cải thiện chức năng thần kinh, ngăn ngừa teo sợi trục và mô liên kết, chủ yếu là do sự kích hoạt tế bào gốc BM. Tuy nhiên, không có bằng chứng về biệt hóa tế bào BM thành tế bào thần kinh đã được quan sát, do đó paracrine tiết ra bởi các tế bào được ghép vào [23].

3.5. Các biến chứng mạch máu lớn

Thiếu máu cục bộ chi nghiêm trọng (CLI) giai đoạn cuối của bệnh động mạch ngoại biên (PAD) gây ra bởi sự tắc nghẽn nghiêm trọng của mạch máu làm giảm lưu lượng máu nuôi dưỡng chi dẫn đến hoại tử và nguy cơ cắt cụt chi cao. Phẫu thuật bắc cầu hoặc thông mạch qua da là tiêu chuẩn vàng để điều trị CLI, nhưng chỉ giảm triệu chứng tạm thời. Hơn nữa, khoảng 1/3 số bệnh nhân mắc CLI không thể được tái thông mạch do bệnh đa mạch hoặc do tắc nghẽn mạch máu cỡ nhỏ [24]. Do đó, liệu pháp gen và tế bào đã được đề xuất như là một phương pháp bổ sung hoặc thay thế có thể cho phẫu thuật nong mạch.

Các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng khác nhau đã được thực hiện trong những năm gần đây, chủ yếu sử dụng các MNC hoặc EPC có nguồn gốc BM. Tổng hợp đánh giá hiệu quả về các thử nghiệm lâm sàng gần đây bằng MNC có nguồn gốc BM ở bệnh nhân CLI mang đến những hiệu quả nhất định trong điều trị. Mặt khác, các nghiên cứu sử dụng ghép tự thân các tế bào gốc có nguồn gốc BM cho thấy, các tế bào BM được dung nạp tốt và cải thiện các triệu chứng thiếu máu cục bộ ở bệnh nhân mắc bệnh DM, kéo dài thời gian sống, không cắt cụt và tiến hành chữa lành

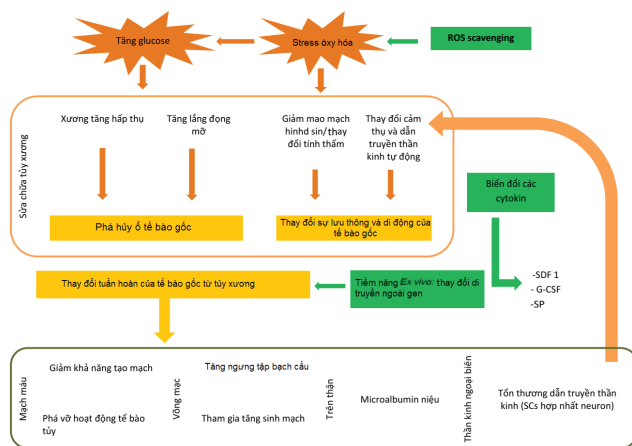
vết thương hoàn toàn [25]. Một nghiên cứu ngẫu nhiên, đối chứng giả dược, pha I/II gần đây cho thấy, các MSC cải thiện chỉ số huyết áp tâm thu cổ chân - cánh tay (ABPI) ở bệnh nhân mắc CLI [26].

Các tế bào gốc có nguồn gốc BM cũng đã được nghiên cứu kỹ lưỡng trong các thử nghiệm lâm sàng để điều trị đột quỵ hoặc điều trị nhồi máu cơ tim cấp tính (AMI). Mặc dù có sự khác biệt về thời gian ghép tế bào sau khi khởi phát đột quỵ, theo dõi ngắn hạn và điều kiện nuôi cấy tế bào, tất cả các nghiên cứu đã cho thấy sự cải thiện chức năng của mạch máu đáng kể, không có tác dụng phụ [27]. Tuy nhiên, số lượng người tham gia vào các nghiên cứu này hạn chế, liên quan đến khả năng sinh học của tế bào gốc BM ở người bị DM, do vậy cần nghiên cứu thêm để đưa ra kết luận chuyên sâu hơn [28]. Trong điều trị AMI, phần lớn các thử nghiệm lâm sàng đã sử dụng BM MNCs, kết quả thu được đã chứng minh BM MNCs an toàn về lâu dài và cải thiện mạch máu được đánh giá cao [29].

4. Phục hồi chức năng BM để cải thiện liệu pháp tế bào gốc của các biến chứng DM

BM cũng bị ảnh hưởng bởi các biến chứng của DM. Các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng đã chỉ ra DM gây suy giảm cả về số lượng và chất lượng các tế bào gốc trong BM. Tuy nhiên, các tổn thương ban đầu ở cấp độ mô gốc, trước khi các tế bào được huy động vào tuần hoàn ngoại vi là do quá trình sửa chữa đặc biệt của tất cả các thành phần trong ổ - tuỷ xương [30]. Những thay đổi này dẫn đến sự gián đoạn của cân bằng nội môi tế bào gốc, cung cấp một cơ chế và giải thích các biến chứng ngoại biên.

DM đặt ra những thách thức lớn đối với các liệu pháp tế bào gốc. Vì vậy, các tác giả đề xuất một số định hướng để cải thiện những tồn tại sao cho phù hợp và hiệu quả trong điều trị (hình 1). Thực hiện một nghiên cứu như vậy sẽ phức tạp bởi sự cần thiết của xâm lấn để thu nhận BM. Ngoài ra, việc phân tích các tế bào lưu thông có thể được sử dụng như một điểm cuối thay thế. Nghiên cứu trên các mô hình thí nghiệm đã chỉ ra rằng, khi xảy ra thiếu máu cục bộ, việc loại bỏ p66^{Shc} giúp bảo vệ khỏi tổn thương tim do angiotensin II gây ra, cải thiện sự hình thành mạch máu thay thế, giảm apoptosis của cơ tim, bảo tồn sự tăng sinh tế bào xung quanh và biệt hóa trong *in vitro* của stress oxy hóa cao [31]. Quản lý con đường này bằng các chất ức chế đặc hiệu protein kinase C β (PKC β), enzyme chịu trách nhiệm cho quá trình phosphoryl hóa/kích hoạt p66^{Shc} đã được chứng minh là làm giảm rối loạn chức năng mạch máu ở động vật mắc bệnh DM, cung cấp một chiến lược mới trong điều trị biến chứng mạch máu [32]. Thật vậy, chất ức chế PKC β LY333531, còn được gọi là ruboxistaurin, đang được nghiên cứu nâng cao trong các thử nghiệm lâm sàng để điều trị DR (DM). Sẽ rất hấp dẫn khi nghiên cứu các chất ức chế PKC β có lợi trong việc ngăn chặn và phục hồi chức năng của tế bào gốc BM trong DM hay không.



Hình 1. Cơ chế chịu trách nhiệm tái tạo BM dưới sự tăng đường huyết mạn tính, stress oxy hóa và các ứng dụng điều trị tiềm năng [33].

Thiamine pyrophosphate là đồng phân của transketolase, enzyme giới hạn tỷ lệ chuyển glyceraldehyd 3-phosphate và fructose 6-phosphate từ glycolysis thành nhánh không bị oxy hóa của con đường pentose phosphate. Thiếu thiamine đã được báo cáo trong bệnh DM và khắc phục khiếm khuyết bằng cách bổ sung thiamine hoặc dẫn xuất của nó. Benfotiamine đã được chứng minh có tác dụng chống lại bệnh thận DM và bệnh lý vi mạch võng mạc [34]. Nhiều nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra rằng việc bổ sung benfotiamine đã ngăn ngừa bệnh lý của bệnh nhân DM. Hơn nữa, benfotiamine làm giảm căng thẳng oxy hóa và tổn thương oxy hóa DNA trong các tế bào BM. Điều quan trọng là những tác động này có liên quan đến việc ngăn ngừa sự suy giảm HSC cả về số lượng tuyệt đối và tỷ lệ tương đối so với tổng số tế bào BM và ức chế apoptosis. Do đó, các nghiên cứu lâm sàng sử dụng benfotiamine đang được mong đợi. Hơn nữa, các chiến lược tương tự có thể hữu ích để chống lại bệnh lý thần kinh và những bệnh liên quan đến kích thích chemokine.

Mobilopathy cũng có thể có lợi bằng cách sử dụng các cytokine khác thay thế G-CSF. Trong một nghiên cứu hồi cứu, G.P. Fadini và cs (2015) [35] quan sát thấy rằng, G-CSF không có khả năng huy động tế bào gốc ở bệnh nhân mắc DM đã bị loại bỏ khi được sử dụng cùng với pleraxifor, một chất đối kháng SDF-1/CXCR4.

Để mang lại hiệu quả trong việc điều trị, tế bào gốc được phân lập từ *ex vivo* có thể giúp khôi phục toàn bộ tiềm năng tái tạo của chúng. Liệu pháp gen có thể là một cách khả thi để giúp phục hồi chức năng của tế bào gốc. Ngoài ra, có thể điều hòa trước tế bào gốc từ BM để cải thiện tiềm năng tái tạo của chúng.

5. Vai trò của ty thể trong MSC đối với quá trình sửa chữa tổn thương mô

Ty thể có nhiều vai trò quan trọng, trong đó nổi bật nhất là sản xuất ATP cho tế bào. Hơn nữa, ty thể cũng tham gia

trung gian vào con đường tín hiệu của ROS, apoptosis, tín hiệu calcium, tổng hợp heme và steroid [36]. Chính vì vai trò quan trọng của ty thể trong chuyển hóa năng lượng tế bào nên các bất thường trong quá trình trên sẽ dẫn tới những biến đổi ở tế bào và cơ thể. Năm 1975, lần đầu tiên sự suy giảm chức năng của ty thể được đề cập ở bệnh nhân bất dung nạp glucose [37], tuy vậy vai trò thật sự của ty thể trong DM vẫn còn nhiều bàn cãi. Một số nghiên cứu trên người và động vật gặm nhấm chỉ ra rằng, giảm hoạt động chức năng enzyme ty thể xuất hiện ở bệnh nhân béo phì và những người đề kháng insulin [38]. Vì vậy, nhiều nghiên cứu được tiến hành theo nguyên lý vận chuyển ty thể của MSC vào mô tổn thương như một cách ghép MSC mới. BM-MSC truyền ty thể của chúng cho tế bào biểu mô tổn thương ở phổi, từ đó gia tăng ATP trong các tế bào biểu mô. BM-MSC cũng truyền ty thể cho các tế bào cơ tim giúp ngăn chặn apoptosis hay giáng hóa ở mô cơ tim thiếu máu hay tái lập trình tế bào cơ tim thành tế bào giống tế bào tiền thân [39]. Đối với hệ thần kinh, ty thể truyền vào cũng bảo vệ tế bào vỏ não bị thiếu máu [40]. Từ đó cho thấy, ty thể trong MSC đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều trị, cần nghiên cứu thêm để làm sáng tỏ hơn vai trò của ty thể.

Tóm lại, liệu pháp tế bào gốc từ BM cho thấy nhiều tiềm năng trong điều trị các biến chứng của DM. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tái tạo của chúng, đặc biệt là nghiên cứu môi trường phục hồi tính toàn vẹn tế bào gốc từ BM ở bệnh nhân DM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H.D. Nguyen, N.T.M. Thu, V.T. Thom, et al. (2020), "O-YD03: A study of the prevalence of risk factors for diabetes in children in Binh Dinh, Vietnam", *Proceedings of 2020 Vietnam National Conference on Biotechnology*, 995pp.
- [2] G.P. Fadini, S. Cicilioti, M. Albiero (2017), "Concise review: Perspectives and clinical implications of bone marrow and circulating stem cell defects in diabetes", *Stem Cells*, **35**(1), pp.106-116, DOI: 10.1002/stem.2445.
- [3] S. Babovic, C.J. Eaves (2014), "Hierarchical organization of fetal and adult hematopoietic stem cells", *Exp. Cell Res.*, **329**(2), pp.185-191, DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.08.005.
- [4] A.P. Kusumbe, S.K. Ramasamy, R.H. Adams (2014), "Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone", *Nature*, **507**(7492), pp.323-328, DOI: 10.1038/nature13145.
- [5] M. Dominici, K.L. Blanc, I. Mueller, et al. (2006), "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement", *Cytotherapy*, **8**(4), pp.315-317, DOI: 10.1080/14653240600855905.
- [6] A. Desai, A. Glaser, D. Liu, et al. (2009), "Microarray-based characterization of a colony assay used to investigate endothelial progenitor cells and relevance to endothelial function in humans", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **29**(1), pp.121-127, DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.174573.
- [7] M. Zhang, J. Rehman, A.B. Malik (2014), "Endothelial progenitor cells and vascular repair", *Curr. Opin. Hematol.*, **21**(3), pp.224-228, DOI: 10.1097/MOH.0000000000000041.
- [8] F. Semeraro, A. Cancarini, R. dell'Omo, et al. (2015), "Diabetic retinopathy: Vascular and inflammatory disease", *J. Diabetes Res.*, **2015**, DOI: 10.1155/2015/582060.

- [9] L. Qu, L. Gao, H. Xu, et al. (2017), "Combined transplantation of human mesenchymal stem cells and human retinal progenitor cells into the subretinal space of RCS rats", *Sci. Rep.*, **7**(1), DOI: 10.1038/s41598-017-00241-5.
- [10] R.C. Siqueira, A. Messias, K. Messias, et al. (2015a), "Quality of life in patients with retinitis pigmentosa submitted to intravitreal use of bone marrow-derived stem cells (Reticell-clinical trial)", *Stem Cell Res. Ther.*, **6**(1), DOI: 10.1186/s13287-015-0020-6.
- [11] S.S. Park, S. Caballero, G. Bauer, et al. (2012), "Long-term effects of intravitreal injection of GMP-grade bone-marrow-derived CD34⁺ cells in NOD-SCID mice with acute ischemia-reperfusion injury", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**(2), pp.986-994, DOI: 10.1167/iops.11-8833.
- [12] E. Moisseiev, Z. Smit-McBride, S. Oltjen, et al. (2016), "Intravitreal administration of human bone marrow CD34⁺ stem cells in a murine model of retinal degeneration", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **57**(10), pp.4125-4135, DOI: 10.1167/iops.16-19252.
- [13] R.C. Siqueira, A. Messias, V.P. Gurgel, et al. (2015b), "Improvement of ischaemic macular oedema after intravitreal injection of autologous bone marrow-derived haematopoietic stem cells", *Acta Ophthalmol.*, **93**(2), pp.e174-e176, DOI: 10.1111/aos.12473.
- [14] H. Bugger, E.D. Abel (2014), "Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy", *Diabetologia*, **57**(4), pp.660-671, DOI: 10.1007/s00125-014-3171-6.
- [15] X. Dong, F. Zhu, Q. Liu, et al. (2014), "Transplanted bone marrow mesenchymal stem cells protects myocardium by regulating 14-3-3 protein in a rat model of diabetic cardiomyopathy", *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **7**(7), pp.3714-3723.
- [16] R. Ascione, J. Rowlinson, E. Avolio, et al. (2015), "Migration towards SDF-1 selects angiogenic-expressing bone marrow monocytes endowed with cardiac reparative activity in patients with previous myocardial infarction", *Stem Cell Res. Ther.*, **6**(1), DOI: 10.1186/s13287-015-0028-y.
- [17] Y. Cheng, S. Guo, G. Liu, et al. (2012), "Transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates myocardial interstitial fibrosis and cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats", *Int. J. Mol. Med.*, **30**(4), pp.870-876, DOI: 10.3892/ijmm.2012.1083.
- [18] M. Ali, A. Mehmood, M.S. Anjum, et al. (2015), "Diazoxide preconditioning of endothelial progenitor cells from streptozotocin-induced type 1 diabetic rats improves their ability to repair diabetic cardiomyopathy", *Mol. Cell Biochem.*, **410**(1-2), pp.267-279, DOI: 10.1007/s11010-015-2560-6.
- [19] A. Eirin, L.O. Lerman (2014), "Mesenchymal stem cell treatment for chronic renal failure", *Stem Cell Res. Ther.*, **5**(4), pp.1-8, DOI: 10.1186/s13287-014-0028-2.
- [20] D.K. Packham, I.R. Fraser, P.G. Kerr, et al. (2016), "Allogeneic mesenchymal precursor cells (MPC) in diabetic nephropathy: A randomized, placebo-controlled, dose escalation study", *EBioMedicine*, **12**, pp.263-269, DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.09.011.
- [21] S. Lv, J. Cheng, A. Sun, et al. (2014a), "Mesenchymal stem cells transplantation ameliorates glomerular injury in streptozotocin induced diabetic nephropathy in rats via inhibiting oxidative stress", *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **104**(1), pp.143-154, DOI: 10.1016/j.diabres.2014.01.011.
- [22] S. Lv, G. Liu, A. Sun, et al. (2014b), "Mesenchymal stem cells ameliorate diabetic glomerular fibrosis *in vivo* and *in vitro* by inhibiting TGF- β signalling via secretion of bone morphogenetic protein 7", *Diab. Vasc. Dis. Res.*, **11**(4), pp.251-261, DOI: 10.1177/1479164114531300.
- [23] K.S. Kim, Y.S. Song, J. Jin, et al. (2015), "Granulocyte-colony stimulating factor as a treatment for diabetic neuropathy in rat", *Mol. Cell Endocrinol.*, **414**, pp.64-72, DOI: 10.1016/j.mce.2015.07.014.
- [24] M.H. Criqui, V. Aboyans (2015), "Epidemiology of peripheral artery disease", *Circ. Res.*, **116**(9), pp.1509-1526, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303849.
- [25] R.J. Powell, W.A. Marston, S.A. Berceli, et al. (2012), "Cellular therapy with Ixmyelocel-T to treat critical limb ischemia: The randomized, double-blind, placebo-controlled Restore-CLI trial", *Mol. Ther.*, **20**(6), pp.1280-1286, DOI: 10.1038/mt.2012.52.
- [26] P.K. Gupta, A. Chullikana, R. Parakh, et al. (2013), "A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia", *J. Transl. Med.*, **11**, DOI: 10.1186/1479-5876-11-143.
- [27] H. Jeong, H.W. Yim, Y.S. Cho, et al. (2014), "Efficacy and safety of stem cell therapies for patients with stroke: A systematic review and single arm meta-analysis", *Int. J. Stem Cells*, **7**(2), pp.63-69, DOI: 10.15283/ijsc.2014.7.2.63.
- [28] K. Prasad, A. Sharma, A. Garg, et al. (2014), "Intravenous autologous bone marrow mononuclear stem cell therapy for ischemic stroke: A multicentric, randomized trial", *Stroke*, **45**(12), pp.3618-3624, DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.007028.
- [29] G. Spinetti, D. Cordella, O. Fortunato, et al. (2013), "Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: Implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway", *Circ. Res.*, **112**(3), pp.510-522, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300598.
- [30] A. Natalicchio, F. Tortosa, R. Labarbuta, et al. (2015), "The p66Shc redox adaptor protein is induced by saturated fatty acids and mediates lipotoxicity-induced apoptosis in pancreatic beta cells", *Diabetologia*, **58**(6), pp.1260-1271, DOI: 10.1007/s00125-015-3563-2.
- [31] L. Wei, Z. Yin, Y. Yuan, et al. (2010), "A PKC- β inhibitor treatment reverses cardiac microvascular barrier dysfunction in diabetic rats", *Microvasc. Res.*, **80**(1), pp.158-165, DOI: 10.1016/j.mvr.2010.01.003.
- [32] H.P. Hammes, X. Du, D. Edelstein, et al. (2003), "Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy", *Nat. Med.*, **9**(3), pp.294-299, DOI: 10.1038/nm834.
- [33] G. Mangialardi, P. Madeddu (2016), "Bone marrow-derived stem cells: A mixed blessing in the multifaceted world of diabetic complications", *Curr. Diab. Rep.*, **16**(5), DOI: 10.1007/s11892-016-0730-x.
- [34] A. Daiber, F.D. Lisa, M. Oelze, et al. (2017), "Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function", *Br. J. Pharmacol.*, **174**(12), pp.1670-1689, DOI: 10.1111/bph.13403.
- [35] G.P. Fadini, M. Fiala, R. Cappellari, et al. (2015), "Diabetes limits stem cell mobilization following G-CSF but not plerixafor", *Diabetes*, **64**(8), pp.2969-2977, DOI: 10.2337/db15-0077.
- [36] P.R. Angelova, A.Y. Abramov (2016), "Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology", *Free Radic. Biol.*, **100**, pp.81-85, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.005.
- [37] E.O. Ansah, U. Banerjee (2009), "Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation", *Nature*, **461**, pp.537-541, DOI: 10.1038/nature08313.
- [38] M.N. Islam, S.R. Das, M.T. Emin, et al. (2012), "Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury", *Nature Medicine*, **18**(5), pp.759-765, DOI: 10.1038/nm.2736.
- [39] Y. Zhang, Z. Yu, D. Jiang, et al. (2016), "iPSC-MSCs with high intrinsic MIRO1 and sensitivity to TNF- α yield efficacious mitochondrial transfer to rescue anthracycline-induced cardiomyopathy", *Stem Cell Reports*, **7**(4), pp.749-763, DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.08.009.
- [40] V.A. Babenko, D.N. Silachev, L.D. Zorova, et al. (2015), "Improving the post-stroke therapeutic potency of mesenchymal multipotent stromal cells by cocultivation with cortical neurons: The role of crosstalk between cells", *Stem Cells Transl. Med.*, **4**(9), pp.1011-1020, DOI: 10.5966/sctm.2015-0010.

Nghiên cứu nguồn gốc phát sinh các đợt lộc trong mối quan hệ với năng suất giống cam sành Bồ Hạ trồng tại Thái Nguyên

Tổng Hoàng Huyền¹, Nguyễn Tiến Dũng^{2*}, Nguyễn Văn Duy², Bùi Quang Đăng¹,
Bùi Trí Thức², Nguyễn Thị Tinh², Ngô Xuân Bình²

¹Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, đường Vĩnh Quỳnh, quận Thanh Trì, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, Xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/3/2022; ngày chuyển phản biện 25/3/2022; ngày nhận phản biện 22/4/2022; ngày chấp nhận đăng 26/4/2022

Tóm tắt:

Trên đối tượng giống cam sành Bồ Hạ 4 năm tuổi trồng tại Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, kết quả nghiên cứu vật hậu cho thấy, có 4 đợt lộc theo mùa vụ hình thành nên 4 đợt cành chủ yếu, liên quan đến năng suất quả là cành vụ xuân, hè, thu và đông. Trong đó, 2 loại cành có ảnh hưởng quan trọng trong giai đoạn mang quả là vụ xuân hình thành loại cành quả (cành mang hoa và quả) và vụ thu với chức năng là nguồn cành mẹ của cành quả năm tiếp sau. Những năm cây ra nhiều quả (năm được mùa), cành vụ xuân chiếm tỷ lệ rất cao, trong khi tỷ lệ cành vụ thu rất thấp. Ngược lại, những năm cây ít quả (năm mất mùa), tỷ lệ cành vụ xuân rất thấp nhưng tỷ lệ cành vụ thu rất cao. Tỷ lệ cành vụ thu và năng suất quả năm sau của giống cam sành Bồ Hạ có mối tương quan thuận tuyến tính chặt chẽ ($r=0,81$). Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học quan trọng để xây dựng các giải pháp kỹ thuật nhằm điều tiết tỷ lệ cành vụ xuân và vụ thu phù hợp, đảm bảo cây cho năng suất cao và ổn định.

Từ khóa: cam sành Bồ Hạ, cành mẹ, cành quả, năng suất quả, nguồn gốc phát sinh lộc.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Trong điều kiện vùng nhiệt đới và á nhiệt đới, cây ăn quả có múi sinh trưởng mạnh và ra nhiều đợt lộc trong một năm [1-3]. Ở giai đoạn cây chưa mang quả (non bearing stage), các đợt lộc góp phần giúp cây sinh trưởng với sinh khối tăng nhanh, tạo bộ khung tán của cây [3]. Ở giai đoạn cây cho thu hoạch quả ổn định (stable bearing stage), quá trình ra lộc của cây có tác động rõ nét đến sinh trưởng, khả năng ra hoa và năng suất quả [1, 4]. Sự phát sinh các đợt lộc vừa có tác động đến khả năng cho năng suất quả ở thời điểm hiện tại, vừa là tiền đề cho sự ra hoa kết quả năm sau [4-6]. Hiểu biết về đặc điểm sinh học làm cơ sở để tác động các biện pháp kỹ thuật điều khiển quá trình ra lộc hợp lý sẽ góp phần nâng cao năng suất, chất lượng quả cây có múi, trong đó có cây cam [6, 7]. Đây cũng chính là lý do chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu nguồn gốc phát sinh các đợt lộc liên quan đến khả năng cho năng suất ở cây cam sành Bồ Hạ” nhằm bổ sung những luận cứ khoa học cho việc quản lý vườn cây ăn quả trên một giống cây trồng đặc sản.

2. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Thí nghiệm được tiến hành trên vườn cam sành Bồ Hạ 4 năm tuổi trồng tại Vườn thí nghiệm của Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên. Các biện pháp kỹ thuật như bón phân, phòng trừ sâu bệnh, cỏ dại... được áp dụng theo quy trình hiện hành và đồng đều trên toàn bộ vườn thí nghiệm.

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

2.2. Nội dung

Nghiên cứu nguồn gốc phát sinh, mối quan hệ nội tại giữa các đợt lộc trong năm và vai trò của chúng trong việc kiến tạo năng suất ở cây cam sành Bồ Hạ trồng tại Thái Nguyên.

2.3. Phương pháp

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm bố trí trên vườn trồng sẵn 4 năm tuổi, chọn ngẫu nhiên 10 cây ở các vị trí khác nhau trong vườn, sinh trưởng bình thường, không hoặc rất ít sâu bệnh hại để theo dõi và đánh giá vật hậu [8].

Trên mỗi cây được lựa chọn, lấy 4 cành ngang tán cây đều về 4 phía (đông, tây, nam, bắc), đường kính từ 1,0 cm trở lên, đảm bảo dung lượng mẫu để xử lý thống kê ($n \geq 30$) tùy thuộc vào tính chất của từng chỉ tiêu nghiên cứu. Tiến hành đánh dấu cành ở phần sát với thân chính, tất cả các lộc mọc ra trên cành thí nghiệm được đánh dấu, ghi rõ mốc thời gian (ngày, tháng, năm) ra lộc, theo dõi tình hình ra lộc, nguồn gốc phát sinh lộc từ phần được đánh dấu trở lên. Các đợt lộc mọc trên cành thí nghiệm được quan sát và ghi chép liên tục trong 3 năm (2019, 2020 và 2021).

Chỉ tiêu theo dõi: Các đợt lộc phát sinh trong một năm, tỷ lệ các loại cành hình thành theo mùa vụ (được tính bằng tổng số cành của một vụ/tổng số cành trong 1 năm); nguồn gốc phát sinh các đợt lộc trong năm (các đợt lộc trong năm được hình thành từ những loại cành nào);

A study on the origin of the buds related to the yield of the “cam sành Bo Ha” variety grown in Thai Nguyen province

Hoang Huyen Tong¹, Tien Dung Nguyen^{2*},
Van Duy Nguyen², Quang Dang Bui¹, Tri Thuc Bui²,
Thi Tinh Nguyen², Xuan Binh Ngo²

¹Vietnam Academy of Agricultural Sciences,

Vinh Quynh Street, Thanh Tri District, Hanoi, Vietnam

²Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University,
Quyet Thang Commune, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 21 March 2022; revised 22 April 2022; accepted 26 April 2022

Abstract:

With the four-year-old “cam sành Bo Ha” cultivar grown at Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University, results conducted from the phenology showed that: 4 seasoning branches named after the time duration originated, viz spring, summer, autumn and winter branches that were accordingly developed from different buds related closely to the yield of the trees in which the spring branches considered as flower and fruit bearers and the autumn ones considered as mother branches of the proceeded fruit bearers played an important role. It is also mentioned that a high percentage of the spring branch and low ratio of autumn one was recorded in the on-season year (heavy crop). In contrast, a low ratio of spring branch and a high ratio of autumn ones, were reported in the off-season (light crop). And, what is more, there existed a closely positive linear correlation between the ratio of autumn branches and fruit yield in the following year (correlation coefficient $r=0.81$). The study's results should be of good basic for developing technical solutions to regulate the appropriate ratio of spring and autumn branches to ensure high and stable yield.

Keywords: buds origin, “cam sành Bo Ha”, fruit-bearing branches, fruit yield, mother branches.

Classification number: 4.1

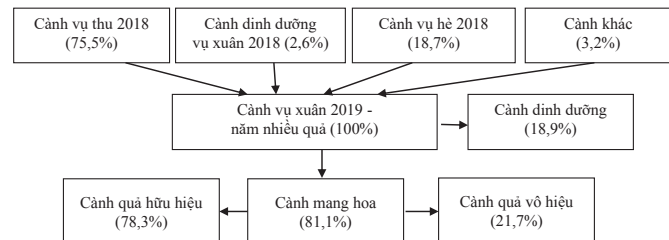
nguồn gốc sinh ra cành quả (cành mang hoa và quả); mối liên hệ giữa các đợt lộc trong năm. Đồng thời, phân tích xác định hệ số tương quan tuyến tính giữa tỷ lệ cành mẹ của cành quả với năng suất quả của cây.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nguồn gốc phát sinh và mối liên hệ giữa các đợt lộc ở cây cam sành Bồ Hạ năm được mùa (năm 2019)

Nguồn gốc phát sinh và sự hình thành các loại cành theo chức năng mang quả của lộc vụ xuân năm 2019: Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở sơ đồ 1 cho thấy, đợt lộc vụ xuân 2019 hình thành 2 loại cành chính là: cành mang hoa (thường được gọi là cành quả) chiếm 81,1% tổng số cành vụ

xuân và cành dinh dưỡng (không mang hoa) chiếm 18,9%. Trong tổng số 100% cành mang hoa, có 78,3% cành có hoa đậu thành quả (cành quả hữu hiệu) và 21,7% cành mang hoa nhưng không đậu quả (cành quả vô hiệu). Về nguồn gốc phát sinh, lộc vụ xuân năm 2019 được hình thành chủ yếu từ các loại cành phát sinh trong năm 2018, trong đó 75,5% mọc từ cành vụ thu, 2,6% mọc từ cành dinh dưỡng vụ xuân, 18,7% mọc từ cành vụ hè và chỉ có 3,2% mọc từ các loại cành khác (cành nhiều năm tuổi).



Sơ đồ 1. Nguồn gốc phát sinh cành vụ xuân năm 2019 và tỷ lệ cành vụ xuân mang quả.

Nguồn gốc phát sinh và mối liên hệ giữa các đợt lộc (vụ hè, thu, đông) ở cây cam sành Bồ Hạ năm 2019: Kết quả bảng 1 cho thấy, 2019 là năm được mùa, cây ra nhiều quả và cho năng suất cao. Xem xét với từng đợt lộc cho thấy, lộc vụ hè chủ yếu được phát sinh từ 3 loại cành, trong đó 43,1% mọc từ cành năm trước, 21,2% mọc từ cành quả vô hiệu của vụ xuân và 35,7% mọc từ cành dinh dưỡng vụ xuân cùng năm. Lộc vụ thu được hình thành chủ yếu từ 3 loại cành cùng năm, trong đó 29,5% mọc từ cành quả vô hiệu, 60,9% mọc từ cành dinh dưỡng vụ xuân và 9,6% mọc từ cành vụ hè. Lộc vụ đông cũng được hình thành chủ yếu từ 3 loại cành cùng năm, trong đó 14,3% mọc từ cành quả vô hiệu, 18,2% mọc từ cành dinh dưỡng vụ xuân và 67,5% mọc từ cành vụ hè.

Bảng 1. Nguồn gốc phát sinh các đợt lộc vụ hè, thu, đông năm 2019.

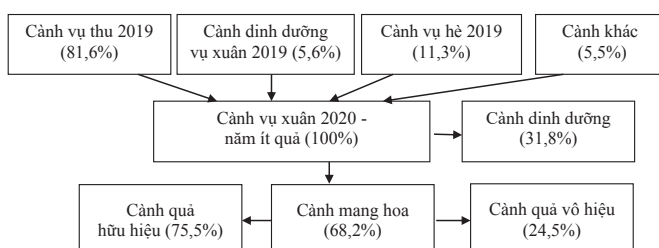
Các đợt lộc theo mùa vụ	Mọc từ cành của năm trước (%)	Mọc từ cành vụ xuân cùng năm			Mọc từ cành vụ hè cùng năm (%)	Tổng cộng (%)
		Cành quả hữu hiệu (%)	Cành quả vô hiệu (%)	Cành dinh dưỡng (%)		
Lộc vụ hè	43,1	0,0	21,2	35,7	0,0	100
Lộc vụ thu	0,0	0,0	29,5	60,9	9,6	100
Lộc vụ đông	0,0	0,0	14,3	18,2	67,5	100

Cũng từ số liệu bảng 1, chúng tôi nhận thấy, năm 2019 (năm được mùa), cây ra nhiều hoa và mang nhiều quả, cành vụ xuân là loại cành ra hoa và mang quả trong năm (yếu tố quyết định năng suất của cây cam sành Bồ Hạ) được hình thành chủ yếu từ cành vụ thu năm trước (2018). Các đợt lộc trong năm (xuân, hè, thu, đông) có mối liên hệ chặt chẽ, đợt lộc trước là nguồn gốc phát sinh ra các đợt lộc kế tiếp về sau. Do vậy, biện pháp kỹ thuật phải

tạo điều kiện thuận lợi cho các đợt lộc trực tiếp tác động đến năng suất phát triển và hạn chế các đợt lộc không có ý nghĩa, giảm tiêu hao dinh dưỡng của cây trồng.

3.2. Kết quả nghiên cứu về nguồn gốc phát sinh và mối liên hệ giữa các đợt lộc trên cây cam sành Bồ Hạ năm mất mùa (năm 2020)

Nguồn gốc phát sinh và sự hình thành các loại cành theo chức năng mang quả của lộc vụ xuân năm 2020: Kết quả sơ đồ 2 cho thấy, lộc vụ xuân năm 2020 được phát sinh chủ yếu từ các loại cành của năm trước (năm 2019), trong đó 81,6% từ cành vụ thu, 5,6% từ cành dinh dưỡng vụ xuân, 11,3% từ cành vụ hè và 5,5% từ các loại cành khác (cành nhiều năm tuổi). Phân chia theo chức năng mang quả, lộc vụ xuân 2019 làm cành quả (cành mang hoa) chiếm 68,2% và cành dinh dưỡng (cành không mang hoa) chiếm 31,8%. Trong tổng số cành mang hoa, 75,5% cành có hoa đậu thành quả (cành quả hữu hiệu), 24,5% cành mang hoa nhưng không đậu quả (cành quả vô hiệu).



Sơ đồ 2. Nguồn gốc phát sinh cành vụ xuân năm 2020 và tỷ lệ cành vụ xuân theo chức năng mang quả.

Nguồn gốc phát sinh và mối liên hệ giữa các đợt lộc (vụ hè, thu, đông) ở cây cam sành Bồ Hạ năm 2020: Kết quả bảng 2 cho thấy, năm 2020 lộc vụ hè chủ yếu được phát sinh từ 3 loại cành, trong đó 46,0% mọc từ cành năm trước, 16,2% mọc từ cành quả vô hiệu của vụ xuân và 37,8% mọc từ cành dinh dưỡng vụ xuân cùng năm. Lộc vụ thu được hình thành chủ yếu từ 3 loại cành cùng năm, trong đó 10,9% mọc từ cành quả vô hiệu, 69,5% mọc từ cành dinh dưỡng vụ xuân và 19,6% mọc từ cành vụ hè. Lộc vụ đông cũng được hình thành chủ yếu từ 3 loại cành cùng năm, lần lượt là: 17,4% mọc từ cành quả vô hiệu, 21,6% mọc từ cành dinh dưỡng vụ xuân và 61,0% mọc từ cành vụ hè.

Bảng 2. Nguồn gốc phát sinh các đợt lộc vụ hè, thu, đông năm 2020.

Các đợt lộc theo mùa vụ	Mọc từ cành của năm trước (%)	Mọc từ cành vụ xuân cùng năm			Mọc từ cành vụ hè cùng năm (%)	Tổng cộng (%)
		Cành quả hữu hiệu (%)	Cành quả vô hiệu (%)	Cành dinh dưỡng (%)		
Cành vụ hè	46,0	0,0	16,2	37,8	0,0	100
Cành vụ thu	0,0	0,0	10,9	69,5	19,6	100
Cành vụ đông	0,0	0,0	17,4	21,6	61,0	100

Tổng hợp kết quả theo dõi của cả 2 năm (2019, 2020), chúng ta có thể nhận thấy chu kỳ sinh trưởng 1 năm của cây cam sành Bồ Hạ có tính quy luật tương đối rõ nét là cành vụ xuân chủ yếu phân hóa thành các loại cành quả, còn cành vụ thu hàng năm lại có chức năng là cành mẹ của cành quả năm sau. Cũng chính vì thế, các khâu kỹ thuật nhằm thúc đẩy sự phát sinh và sinh trưởng của lộc vụ thu có ý nghĩa rất quan trọng trong việc tạo năng suất cao và ổn định của giống cam sành Bồ Hạ.

3.3. Tỷ lệ các loại cành theo chu kỳ sinh trưởng trong năm và mối tương quan giữa cành vụ thu với năng suất quả

Tỷ lệ các loại cành theo chu kỳ sinh trưởng 1 năm của cây cam sành Bồ Hạ trình bày ở bảng 3 cũng phản ánh gần đúng với quy luật ra hoa cách năm mà dân gian thường gọi “một năm ăn quả, một năm trả cành” đối với cây có múi nói chung. Các năm 2019 và 2021 được coi là năm cây ra nhiều quả (năm được mùa) và xen giữa chúng (năm 2020) là năm cây ra ít quả (năm mất mùa). Năm 2019 (năm được mùa), cành vụ xuân chiếm tỷ lệ cao nhất (73,6%), các loại cành vụ hè, thu và đông chiếm tỷ lệ rất thấp, lần lượt là 7,8, 15,4 và 3,2%. Trong khi đó, năm mất mùa (2020), cành vụ thu chiếm tỷ lệ cao nhất (61,2%), tiếp theo là cành vụ xuân (17,3%), vụ hè (16,4%) và thấp nhất là cành vụ đông (5,1%). Năm 2021 (năm được mùa), tỷ lệ các loại cành trong năm gần giống với năm 2019: cành vụ xuân chiếm tỷ lệ cao nhất (69,7%), các loại cành khác có tỷ lệ thấp: 9,2% cành vụ hè, 17,5% cành vụ thu và 3,6% cành vụ đông (bảng 3).

Bảng 3. Tỷ lệ các loại cành theo chu kỳ sinh trưởng 1 năm ở cây cam sành Bồ Hạ.

Năm*	Cành vụ xuân (%)	Cành vụ hè (%)	Cành vụ thu (%)	Cành vụ đông (%)	Tổng số (%)
2019	73,6	7,8	15,4	3,2	100
2020	17,3	16,4	61,2	5,1	100
2021	69,7	9,2	17,5	3,6	100

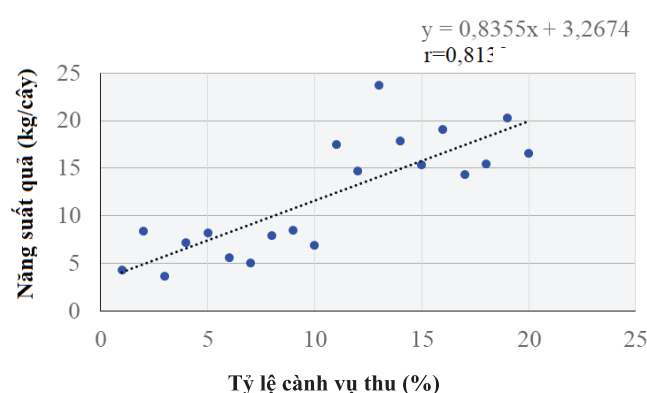
*: năm 2019 là năm sai quả (năm được mùa); năm 2020 cây ra ít quả (năm mất mùa); năm 2021 cây ra nhiều quả (năm được mùa).

Nói một cách tóm tắt, với cam sành Bồ Hạ, cành vụ xuân chiếm tỷ lệ vượt trội nhưng lại có tỷ lệ rất thấp ở những năm mất mùa, trong khi đó tỷ lệ cành vụ thu lại rất cao. Điều này có thể do năm được mùa, dinh dưỡng tập trung nuôi quả (chủ yếu trên lộc xuân) nên lộc vụ thu mọc rất ít, còn với năm mất mùa, cây không mất nhiều dinh dưỡng nuôi quả nên lộc vụ thu được hình thành với số lượng lớn, làm chức năng cành mẹ của cành quả năm sau, hệ quả là cành vụ xuân năm sau (cành quả) có cơ hội phát sinh và phát triển mạnh, cây lại bước vào năm được mùa.

Nhằm làm rõ hơn mối liên hệ giữa tỷ lệ cành vụ thu và năng suất của cây cam Bồ Hạ, chúng tôi đã tiến hành phân tích tương quan tuyến tính giữa tỷ lệ cành vụ thu năm trước và năng suất quả năm sau, số liệu theo dõi trong 2 năm và kết quả được trình bày ở bảng 4 và đồ thị 1.

Bảng 4. Tương quan giữa tỷ lệ cành vụ thu và năng suất quả.

STT (cây thí nghiệm)	Tỷ lệ cành vụ thu 2019 (%)	Năng suất quả 2020 (kg/cây)	STT (cây thí nghiệm)	Tỷ lệ cành vụ thu 2020 (%)	Năng suất quả 2021 (kg/cây)
1	10,1	4,3	11	62,7	17,5
2	20,2	8,4	12	50,5	14,7
3	9,5	3,7	13	80,6	23,7
4	17,6	7,2	14	65,8	17,9
5	19,7	8,2	15	57,3	15,4
6	12,4	5,6	16	66,1	19,1
7	13,9	5,1	17	55,7	14,3
8	18,6	7,9	18	57,6	15,5
9	21,5	8,5	19	77,5	20,3
10	14,6	6,9	20	60,6	16,6



Đồ thị 1. Phân tích tương quan giữa tỷ lệ cành vụ thu và năng suất quả ở cây cam sành Bồ Hạ. Mức độ tương quan tuyến tính giữa tỷ lệ cành vụ thu (biến x) và năng suất quả (biến y) được xác định theo giá trị hệ số tương quan (r) như sau: $r > 0,8$: tương quan chặt chẽ; $r = 0,6 - < 0,8$: tương quan mức độ tương đối chặt chẽ; $r = 0,4 - < 0,6$: tương quan mức trung bình; $r < 0,4$: tương quan không chặt.

Kết quả phân tích cho thấy, tỷ lệ cành vụ thu năm trước và năng suất quả năm tiếp sau của các cây cam thí nghiệm có mối tương quan tuyến tính thuận chặt chẽ ($r = 0,81$). Theo đó, 2019 là năm cây ra nhiều quả (năm được mùa), tỷ lệ cành vụ thu rất thấp dẫn đến vụ quả tiếp theo (năm 2020) năng suất giảm sút rõ rệt (năm mất mùa). Cũng trong năm 2020 (năm mất mùa), tỷ lệ cành vụ thu rất cao đã làm cho vụ quả năm liền kề (2021) được mùa rõ rệt. Như vậy, với giống cam sành Bồ Hạ, sự phát sinh cành vụ thu năm trước có ý nghĩa rất quan trọng đối với việc ra hoa và năng suất quả năm sau. Tỷ lệ cành vụ thu càng lớn thì năm sau cây càng sai quả và cho năng suất cao. Đây chính là cơ sở khoa học quan trọng để xây dựng các biện pháp kỹ thuật nhằm điều tiết tỷ lệ cành vụ thu hợp lý đảm bảo cây cho năng suất cao và ổn định qua các năm.

4. Kết luận

1. Giống cam sành Bồ Hạ trồng tại Thái Nguyên có 4 đợt lộc một năm, phát sinh kế tiếp nhau, tạo nên 4 loại cành chủ yếu, liên quan đến năng suất quả là cành vụ xuân, hè, thu và đông. Trong đó, 2 loại cành có ảnh hưởng quan trọng trong giai đoạn mang quả là cành vụ xuân hình thành loại cành quả (cành mang hoa và quả) và cành vụ thu với chức năng là nguồn cành mẹ của cành quả năm tiếp theo.

2. Xu hướng chung là năm được mùa, cây có tỷ lệ cành vụ xuân rất cao, tỷ lệ cành vụ thu rất thấp, còn năm mất mùa thì ngược lại, ít cành vụ xuân và nhiều cành vụ thu.

3. Tỷ lệ cành vụ thu năm trước và năng suất quả năm tiếp sau của giống cam sành Bồ Hạ có mối tương quan thuận chặt chẽ ($r = 0,81$), chứng tỏ cành vụ thu có tầm quan trọng đặc biệt, do vậy cần có biện pháp canh tác hợp lý để nâng cao và ổn định năng suất cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Chapot (1975), "The citrus plant", *Citrus Technical Monograph*, Springer, 4, pp.6-13.
- [2] J. Aular, M.C. Cásaes, W. Natale (2017), "Factors affecting citrus fruit quality: Emphasis on mineral nutrition", *Cientifica Jaboticabal*, 45, pp.64-72, DOI: 10.15361/1984-5529.2017v45n1p64-72.
- [3] W. Reuther (1978), *The Citrus Industry*, UCANR Publications, USA, 362pp.
- [4] D.X. Truong (2003), *Research on Growth Characteristics, the Relationship of Buds and Pollen Source to Yield and Fruit Quality on Pummelo Grapefruit (C. Grandis)*, Master's thesis in agricultural sciences, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry - TUAF (in Vietnamese).
- [5] N.X. Binh (2004), "Research on characteristics and growth relationships between buds on grapefruit trees (*C. grandis*)", *Science and Technology Journal of Agriculture of Rural Development*, 1, pp.66-68 (in Vietnamese).
- [6] C.T. Dat (2021), *Research on Agronomic Characteristics and Technical Measures to Improve Productivity and Quality in Da Xanh Grapefruit Trees in Thai Nguyen*, Doctoral thesis in agricultural sciences, Vietnam Academy of Agricultural Sciences (in Vietnamese).
- [7] P.V. Con (2004), *Measures to Control the Growth, Development, Flowering, and Fruiting of Fruit Trees*, Agricultural Publisher, 160pp (in Vietnamese).
- [8] N.T. Huan, N.X. Binh (2005), "Research on some biological characteristics related to the ability to yield and quality fruit on persimmon trees (*Dyospyros Kaki L.*)", *Science and Technology Journal of Agriculture of Rural Development*, 2, pp.40-43 (in Vietnamese).

Kết quả phục tráng giống lúa Tẻ đỏ của Điện Biên

Phạm Văn Tính^{*}, Nguyễn Phi Long¹, Bùi Thị Huy Hợp², Lê Thị Ngoan¹, Phạm Thị Bích¹, Nguyễn Đức Trung¹

¹Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Lúa thuần, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, xã Liên Hồng, TP Hải Dương, tỉnh Hải Dương, Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển hội nhập Khoa học và Công nghệ quốc tế, 39 Trần Hưng Đạo, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/11/2021; ngày chuyển phản biện 26/11/2021; ngày nhận phản biện 17/12/2021; ngày chấp nhận đăng 22/12/2021

Tóm tắt:

Tẻ đỏ là giống lúa mùa địa phương đang được gieo trồng tại một số huyện của tỉnh Điện Biên như Tuần Giáo, Mường Chà, Tủa Chùa... Giống lúa này có hàm lượng dinh dưỡng cao, khả năng chịu hạn tốt và chống chịu được một số sâu bệnh hại chính như: đạo ôn, bạc lá, rầy nâu. Tẻ đỏ được người dân địa phương ưa chuộng và đánh giá là giống tiềm năng, có thể là một trong các giải pháp kỹ thuật để thích ứng với biến đổi khí hậu, giúp gia tăng giá trị kinh tế cho người trồng tại vùng núi phía Bắc. Quá trình phục tráng giống lúa Tẻ đỏ được thực hiện từ năm 2018 đến 2020. Kết quả theo dõi trên đồng ruộng đã lựa chọn và thu được 200 cá thể có cùng thời gian trổ và chín để đánh giá các chỉ tiêu trong phòng. Từ số liệu đo đếm trong phòng, đối chiếu với bản mô tả gốc, đã chọn ra 30 cá thể có các tính trạng nông sinh học, hình thái đúng nguyên bản, đạt yêu cầu làm G_1 (vụ thứ hai). Các cá thể G_1 được gieo theo dòng trong vụ mùa 2018 có cùng thời gian sinh trưởng và nhiều tính trạng nông sinh học khá đồng đều, từ trong số đó đã chọn lọc và thu được 10 dòng G_1 tốt nhất để so sánh dòng ở G_2 (vụ thứ ba). Kết quả so sánh đã chọn lọc được 6 dòng đạt tiêu chuẩn. Lượng hạt giống từ thí nghiệm chọn dòng G_2 được hỗn lại có khối lượng 400 kg. Kết quả kiểm định đồng ruộng và trong phòng của Trung tâm Khảo kiểm nghiệm giống, sản phẩm cây trồng quốc gia đã xác nhận và cấp chứng chỉ cho lô hạt giống này đạt tiêu chuẩn hạt giống siêu nguyên chủng.

Từ khóa: biến đổi khí hậu, Điện Biên, giống lúa Tẻ đỏ, hạt giống siêu nguyên chủng, phục tráng, Việt Nam.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Mở đầu

Ở Việt Nam, từ lâu gạo nương vẫn được xem là một đặc sản truyền thống, nhiều phong tục văn hóa lâu đời của người dân vùng núi gắn liền với việc canh tác và sử dụng lúa nương [1]. Tẻ đỏ Điện Biên là giống lúa mùa đặc sản có giá trị hàng hoá cao và hiện được canh tác tại các huyện Tuần Giáo, Mường Chà, Tủa Chùa..., tỉnh Điện Biên trên các chân ruộng bậc thang, trên nương và ven suối. Giống lúa Tẻ đỏ có thời gian sinh trưởng dài, khả năng đẻ nhánh khỏe, cứng cây, bông to dài, hạt gạo bán thon, ít bạc bụng, vỏ gạo màu đỏ nâu..., chất lượng gạo cao, chứa các vitamin và vi lượng như B_1 , B_2 , B_6 , Fe, Mg, Ca... Tẻ đỏ là giống lúa thích ứng với nhiều loại đất và các tiểu vùng khí hậu khác nhau tại Điện Biên, khả năng chịu hạn tốt, chống chịu được một số sâu bệnh hại chính như: đạo ôn, bạc lá, rầy nâu... [2]. Do canh tác lâu năm chưa được chọn lọc phục tráng, không được đầu tư nghiên cứu về kỹ thuật canh tác nên năng suất và chất lượng của giống lúa này đều bị giảm.

Giai đoạn 2018-2020, trong khuôn khổ của nhiệm vụ “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen giống lúa Tẻ mèo Sơn La và Tẻ đỏ Điện Biên”, giống Tẻ đỏ của Điện Biên đã được phục tráng thành công. Việc phục tráng thành công giống lúa Tẻ đỏ có ý nghĩa quan trọng trong sản xuất, không những góp phần nâng cao chất lượng hạt giống lúa này phục vụ nhu cầu sản xuất lúa gạo chất lượng cao của Điện Biên mà với những đặc tính quý như khả năng chịu

hạn và chống chịu sâu bệnh tốt, việc phục tráng này còn góp phần phát triển các giải pháp kỹ thuật thích ứng biến đổi khí hậu [3], đặc biệt cho khu vực miền núi phía Bắc nước ta.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

- Hạt giống lúa Tẻ đỏ của Điện Biên thu thập ngoài sản xuất của nông dân.

- Giống đối chứng cho đánh giá G_0 (vụ thứ nhất) và G_1 (vụ thứ hai) lấy từ kho lạnh do Trung tâm Tài nguyên Thực vật lưu giữ, có đánh giá và mô tả các tính trạng gốc ban đầu.

- Giống đối chứng cho đánh giá G_2 (vụ thứ ba) lấy từ nguồn chưa phục tráng.

2.2. Phương pháp

Phục tráng giống được tiến hành theo Tiêu chuẩn ngành 10TCN 395-2006 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn [4], gồm 3 bước, tương ứng với 3 vụ:

- *Vụ thứ nhất (G_0):* Gieo hạt giống thu thập, cấy 1 dảnh/khóm. Khi lúa đẻ nhánh rõ, cắm que đánh dấu các cá thể đúng nguyên bản. Hàng tuần quan sát các tính trạng đặc trưng, loại bỏ cây sinh trưởng kém, bị sâu bệnh, phân ly... Trước khi thu hoạch 1-2 ngày, đánh giá lần cuối, loại bỏ cây không đạt yêu cầu. Cắt sát gốc những cá thể đạt yêu cầu, đeo thẻ đánh số thứ tự, đo đếm và chọn lọc trong phòng.

^{*}Tác giả liên hệ: Email: ttluathuan@gmail.com

Result of purification for the Te do rice variety of Dien Bien province

Van Tinh Pham^{1*}, Phi Long Nguyen¹,
Thi Huy Hop Bui², Thi Ngoan Le¹,
Thi Bich Pham¹, Duc Trung Nguyen¹

¹Inbred Rice Research and Development Center, Field Crops Research Institute,
Lien Hong Commune, Hai Duong City, Hai Duong Province, Vietnam

²Center for Vietnam Science and Technology Internationalization Promotion,
39 Tran Hung Dao Street, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 22 November 2021; revised 17 December 2021; accepted 22 December 2021

Abstract:

Te do is a local rice variety planted in some districts of Dien Bien province (Tuan Giao, Muong Cha, Tua Chua...). This variety has high nutritional content, very good drought tolerance and is resistant to some major pests and diseases such as rice blasts, leaf blight, and brown planthopper. Te do is considered to have great potential in the set of varieties to be included in the agricultural production technology solutions to adapt to climate change, and at the same time increase economic value for growers in the northern mountainous region of Vietnam. The purification process of this rice variety was carried out from 2018 to 2020. From the results of monitoring in the field, 200 individuals (with the same flowering and maturing day) were selected for further laboratory evaluation; then, 30 G_1 lines with the same total growth duration and many similar traits were selected for the next growing season. After evaluation of 30 G_1 lines, 10 satisfactory G_1 lines were selected for the next growing season (G_2). In the G_2 generation, the best 6 qualified lines were selected from the 10 initial evaluation lines and the seeds of these 6 lines were mixed to get 400 kg which was tested and certified as registered seeds by the Center for Testing of Variety, the National Plant based on the national technical regulations on the quality of rice seeds.

Keywords: breeder seed, climate change, Dien Bien, purification, Te do rice variety, Vietnam.

Classification number: 4.1

Đo đếm các tính trạng số lượng của từng cá thể G_0 . Tính giá trị trung bình ($\bar{X}$), độ lệch chuẩn so với giá trị trung bình (s) theo các công thức sau:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n}} \quad (n \geq 25)$$

trong đó: x_i là giá trị đo đếm của cá thể (hoặc dòng) thứ i (từ 1... n); n là tổng số cá thể được đánh giá.

Chọn các cá thể có giá trị nằm trong khoảng $\bar{X} \pm s$, hạt của chúng (hạt G_0) cho vào túi riêng, ghi số, phơi khô, bảo quản cẩn thận để gieo ở vụ tiếp theo.

- *Vụ thứ 2 (G_1):* Gieo riêng hạt của từng cá thể G_0 , cấy thành dòng, mỗi dòng cấy 1 ô, cắm thẻ đánh dấu ở đầu mỗi ô để theo dõi.

+ Theo dõi định kỳ 7 ngày/lần: Đánh dấu dòng có cây khác dạng do phân ly, sinh trưởng phát triển kém, nhiễm sâu bệnh... Trước khi thu hoạch 1-2 ngày, đánh giá lần cuối, loại bỏ các dòng không đạt. Các dòng đạt tiêu chuẩn tiến hành lấy mẫu cây (mỗi dòng 10 cây ngẫu nhiên theo phương pháp đường chéo 5 điểm), cắt sát gốc, đeo thẻ, đo đếm trong phòng giống như đánh giá G_0 . Loại bỏ các dòng có giá trị trung bình của bất cứ tính trạng số lượng nào nằm ngoài độ lệch chuẩn.

+ Thu hoạch toàn ô các dòng đạt yêu cầu, phơi khô, làm sạch, tính năng suất, loại bỏ dòng có năng suất thấp, dòng có hạt gạo lật khác màu và không thơm.

- *Vụ thứ ba (G_2):* Lượng hạt giống của mỗi dòng G_1 chia làm 2 phần: phần nhỏ để dự phòng, phần còn lại được gieo cấy trên ruộng so sánh và ruộng nhân sơ bộ.

+ Ruộng so sánh: Chọn ruộng đồng đều, cấy các dòng theo phương pháp tuần tự không nhắc lại, diện tích 10 m²/ô, các ô cách nhau 30 cm. Hàng tuần theo dõi các tính trạng của từng dòng, đánh dấu dòng có cây khác dạng do phân ly, dòng sinh trưởng phát triển kém, nhiễm sâu bệnh... Trước khi thu hoạch 1-2 ngày, đánh giá lần cuối để chọn dòng đạt yêu cầu. Thu 10 cây mẫu về đo đếm (như làm ở vụ thứ hai). Căn cứ vào số liệu đo đếm, loại bỏ các dòng có giá trị trung bình của bất cứ tính trạng số lượng nào nằm ngoài độ lệch chuẩn.

+ Ruộng nhân: Sau khi cấy so sánh, cấy hết số mạ còn lại ở ruộng nhân. Tiến hành kiểm định đồng ruộng vào thời kỳ trổ 50% và trước thu hoạch để phát hiện cây khác dạng. Khử bỏ cây khác giống do lẫn cơ giới, loại bỏ các dòng có cây khác dạng.

+ Thu hoạch, tính năng suất của các dòng được chọn, loại bỏ các dòng có năng suất thấp, dòng có hạt gạo lật khác màu, dòng không thơm.

+ Kiểm tra chất lượng gieo trồng của từng dòng được chọn, hỗn các dòng đạt yêu cầu thành lô hạt siêu nguyên chủng. Lấy mẫu gửi phòng kiểm nghiệm, đóng bao và gắn tem nhãn theo quy định, bảo quản cẩn thận để sản xuất hạt giống nguyên chủng ở vụ sau.

Các chỉ tiêu theo dõi, đánh giá ở các giai đoạn được thực hiện theo bảng 1.

Bảng 1. Bảng mô tả các tính trạng đặc trưng của giống lúa Tê đơ Điện Biên.

TT	Tính trạng	Giai đoạn	Biểu hiện	Điểm/số lượng
1	Lá mầm: màu	10	Xanh	3
2	Lá gốc (lá dưới cùng): màu bẹ lá	40	Xanh	1
3	Lá: mức độ xanh	40	Xanh đậm	3
4	Lá: sắc tố antoxian	40	Không có	1
5	Lá: sự phân bố của sắc tố antoxian	40	-	-
6	Bẹ lá: sắc tố antoxian	40	Không có	1
7	Bẹ lá: mức độ sắc tố antoxian của bẹ lá	40	-	-
8	Lá: lông ở phiến lá	40	ít	3
9 (*)	Lá: tai lá	40	Không có	1
10 (*)	Lá: sắc tố antoxian của tai lá	40	Không có	1
11	Lá: gôi lá (cổ lá)	40	Có	9
12	Lá: sắc tố antoxian của gôi lá (cổ lá)	40	Không có	1
13	Lá: thìa lia	40	Có	9
14	Lá: hình dạng của thìa lia	40	Nhọn	2
15	Lá: màu sắc của thìa lia	40	Trắng	1
16	Lá: độ dày lá	40	Dày	7
17	Lá: chiều dài phiến lá (cm)	50, 60	Dài (34,4-42,8 cm)	7
18	Lá: chiều rộng phiến lá (cm)	50, 60	Trung bình (1-2 cm)	5
19 a (*)	Lá đồng: trạng thái phiến lá (quan sát sớm)	60	Nửa thẳng	2
19 b (*)	Lá đồng: trạng thái phiến lá (quan sát muộn)	90	Nửa thẳng	3
20	Khóm: trạng thái (chỉ với lúa nổi)	40	-	-
21	Khóm: góc thân (thể cây)	40	Đứng ($\leq 30^\circ$)	1
22 (*)	Thời gian trổ (giống cảm quang): số ngày từ gieo đến 50% số cây có bông trổ	55	100-105 ngày	5
23	Bất dục dục	55	Không có	1
24	Vỏ trấu: màu sắc (trừ vỏ hạt)	65, 90	Khía nâu	3
25 (*)	Hạt thóc: màu của vỏ hạt	80, 90	Tím	5
26 (*)	Hoa: màu sắc vòi nhụy	65	Tím nhạt	4
27	Thân: đường kính thân (mm)	65	Trung bình (6-9 mm)	5
28 (*)	Thân: chiều cao (không tính bông, trừ lúa nổi) (cm)	70	Trung bình (90-109 cm)	7
29 (*)	Thân: sắc tố antoxian của đốt	70	Không có	1
30	Thân: mức độ sắc tố antoxian của đốt	70	-	-
31	Thân: sắc tố antoxian của lông	70	Không có	1
32 (*)	Bông: chiều dài trục chính (cm)	72, 90	Trung bình (26-30 cm)	5
33 (*)	Bông: trạng thái trục chính	90	Võng	5
34	Bông: số bông/cây	70	Trung bình	5
35 a	Bông: màu râu (quan sát sớm)	60	-	-
35 b	Bông: màu râu (quan sát muộn)	90	-	-
36 (*)	Hạt: mức độ lông của vỏ trấu	60, 80	Trung bình	5
37	Bông: mức độ rụng hạt	90	Khó vừa	3

38	Bông: râu	90	Không có	1
39 (*)	Bông: sự phân bố của râu	90	-	-
40	Bông: chiều dài của râu dài nhất (cm)	90	-	-
41	Bông: gié thứ cấp	90	Có	9
42	Bông: mức độ gié thứ cấp	90	Ít	1
43 (*)	Bông: trạng thái của bông	90	Đứng	1
44	Bông: thoát cỏ bông	90	Thoát hoàn toàn	7
45	Thời gian chín: số ngày từ gieo đến chín	90	Trung bình	5
46	Lá: sự tàn lá	92	Trung bình	5
47 (*)	Mây hạt: chiều dài (mm)	92	Ngắn (<1,5 mm)	3
48 (*)	Mây hạt: màu sắc	90	Vàng	2
49	Hạt thóc: khối lượng 1000 hạt (g)	92	Trung bình	5
50	Hạt thóc: chiều dài (mm)	92	Trung bình	3
51	Hạt thóc: chiều rộng (mm)	92	Trung bình	5
52	Hạt thóc: phản ứng với phenol của vỏ trấu	92	-	-
53	Hạt thóc: màu sắc với phenol	92	-	-
54 (*)	Hạt gạo lật: chiều dài (mm)	92	Trung bình	3
55	Hạt gạo lật: chiều rộng (mm)	92	-	-
56 (*)	Hạt gạo lật: dạng hạt (D/R)	92	Bầu	3
57	Hạt gạo lật: màu sắc	92	Đỏ	6
58	Nội nhũ: dạng	92	Không dính	3
59	Nội nhũ: hàm lượng amylose	92	Cao	6
60	Hạt gạo xát (đã bóc vỏ cám): độ bạc bụng. Chỉ với giống nội nhũ dạng không sập	92	-	-
61	Nhiệt độ hoá hồ	92	Cao	-
62	Hạt gạo lật: hương thơm	92	Không thơm	1
63	Phân loài phụ (<i>Indica/Japonica</i>)	<i>Indica</i>		

Nguồn: Trung tâm Tài nguyên Thực vật năm 2017. (*): tính trạng được sử dụng cho tất cả các giống trong mỗi vụ khảo nghiệm và luôn có trong bản mô tả giống, trừ khi trạng thái biểu hiện của tính trạng trước đó hoặc điều kiện môi trường làm cho nó không biểu hiện được; a,b: cùng một tính trạng phân theo các thời điểm quan sát, đánh giá khác nhau.

- Bảng mô tả các tính trạng đặc trưng của giống được xây dựng theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định của giống lúa [5].

- Phương pháp theo dõi các chỉ tiêu theo hệ thống tiêu chuẩn đánh giá cây lúa của IRRI 2013 [6].

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trong vụ mùa (từ tháng 6/2018 đến tháng 12/2020) tại thị trấn Tuần Giáo, huyện Tuần Giáo, tỉnh Điện Biên.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được đo đếm và xử lý theo chương trình Excel 2013.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Một số đặc điểm nông sinh học của giống lúa Tẻ đỏ Điện Biên

Tẻ đỏ là giống lúa cảm quang có khả năng đẻ nhánh trung bình, kiểu hình cây gọn, cứng, chịu thâm canh trung bình, chịu hạn tốt khi gieo trên nương, thời gian sinh trưởng 135-138 ngày trong vụ mùa, được gieo cấy 1 vụ/năm (bảng 2).

Bảng 2. Một số đặc điểm nông sinh học chính của giống lúa Tẻ đỏ Điện Biên.

Chỉ tiêu		Giống lúa Tẻ đỏ	
		Vụ mùa 2018	Vụ mùa 2019
Chiều cao cây (cm)		124,3	122,2
Dạng hình cây		V gọn	V gọn
Dạng lá		To dài, xiên	To dài, xiên
Số bông/cây		5,70	5,83
Số hạt/bông		142,3	146,8
Tỷ lệ lép (%)		27,3	25,1
Chiều dài bông (cm)		25,7	27,1
Màu sắc lá		Xanh	Xanh
Màu tai lá		Tím	Tím
Khối lượng 1000 hạt (g)		26,7	26,8
Hạt gạo lật	Chiều dài (mm)	7,28	7,30
	Chiều rộng (mm)	3,03	3,04
Dạng hạt (gạo lật)		Bán thon	Bán thon
Màu hạt thóc		Khía nâu	Khía nâu
Độ thuần đồng ruộng (điểm)		3	3
Độ dài giai đoạn trổ (ngày)		7	7
Độ thoát cỏ bông (điểm)		5	5
Độ rụng hạt (điểm)		5	3
Độ tàn lá (điểm)		5	5
Thời gian sinh trưởng (ngày)		135	138

3.2. Kết quả phục tráng giống lúa Tẻ đỏ Điện Biên

Kết quả đánh giá và chọn lọc thế hệ G_0 (vụ thứ nhất): Vụ mùa năm 2018, hạt giống đã thu thập trong dân được gieo và cấy trên 1 ô có diện tích 500 m², cấy 1 dảnh/khóm, mật độ 20 khóm/m², bên cạnh cấy 1 ô giống đối chứng để đối chiếu các tính trạng so với nguyên bản (bảng 1). Khi lúa đẻ nhánh rõ, tiến hành quan sát, cầm que đánh dấu các cá thể đúng nguyên bản, sinh trưởng khỏe, đồng đều. Hàng tuần theo dõi rút bỏ que ở các cây xấu (không đúng nguyên bản, bị sâu bệnh...). Khi lúa chín, chọn được 200 cá thể có cùng thời gian từ lúc gieo đến trổ và chín. Cắt sát gốc, đeo thẻ, đánh số đem về phòng để đo

đếm các tính trạng. Kết quả trung bình các tính trạng như sau: chiều cao thân là 98,6 cm; chiều dài bông là 25,8 cm; số bông hữu hiệu đạt 5,7 bông/cây; số hạt chắc/cây đạt 395,1 hạt; khối lượng 1000 hạt đạt 26,43 g; năng suất cả thể đạt 10,42 g/cây (bảng 3). Từ số liệu đo đếm 200 cây khác nhau, đã chọn ra 30 cây có các giá trị tính trạng nằm trong phạm vi lựa chọn để đánh giá ở vụ thứ hai (G_1).

Bảng 3. Tham số thống kê một số tính trạng chính của 200 cá thể G_0 giống lúa Tẻ đỏ Điện Biên.

Tính trạng	Tham số	Cao nhất	Thấp nhất	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Phạm vi lựa chọn ($\bar{X} \pm s$)
Thời gian từ gieo đến trổ (ngày)	100	100	100	0	100	100
Thời gian từ gieo đến chín (ngày)	138	138	138	0	138	138
Chiều cao thân (cm)	112,4	86,3	98,58	3,98	94,60	102,56
Chiều dài bông (cm)	33,5	13,2	25,75	3,49	22,24	29,24
Số bông/cây	7,0	5,0	5,7	0,65	5,05	6,35
Số hạt chắc/cây	639	256	395,07	104,46	290,61	499,53
Khối lượng 1000 hạt (g)	27,8	23,8	26,43	0,93	25,49	27,36
Năng suất cả thể (g/cây)	16,36	6,68	10,42	2,67	7,75	13,09

Đánh giá và chọn lọc thế hệ G_1 (vụ thứ hai): Vụ mùa 2019, gieo riêng hạt của 30 cá thể G_0 , cấy mỗi cá thể thành 1 dòng theo phương pháp tuần tự (không nhắc lại), mỗi dòng cấy 6 hàng, mỗi hàng 30 cây, cách 10 dòng cây 1 ô đối chứng. Hàng tuần quan sát, phát hiện, đánh dấu các dòng sinh trưởng kém, xuất hiện cây phân ly, bị sâu bệnh... Khi lúa chín, đánh giá lần cuối để chọn dòng đúng nguyên bản và đồng đều, loại bỏ các dòng không đạt đã đánh dấu. Lấy mẫu 10 cây ở các dòng được chọn, đo đếm các chỉ tiêu như đối với các dòng G_0 . Kết quả đánh giá được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Tham số thống kê một số tính trạng chính của 10 dòng G_1 giống lúa Tẻ đỏ Điện Biên.

Tính trạng	Tham số	Cao nhất	Thấp nhất	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Phạm vi lựa chọn ($\bar{X} \pm s$)
Thời gian từ gieo đến trổ (ngày)	100	100	100	0	100	100
Thời gian từ gieo đến chín (ngày)	138	138	138	0	138	138
Chiều cao thân (cm)	98,5	94,20	96,21	1,22	94,99	97,43
Chiều dài bông (cm)	29,60	23,20	25,39	2,44	22,95	27,83
Số bông/cây	6,0	6,0	6,0	0,00	6,0	6,0
Số hạt chắc/cây	482,0	408,0	455,10	20,74	434,36	475,84
Khối lượng 1000 hạt (g)	26,4	26,0	26,1	0,14	25,96	26,24
Năng suất ô thí nghiệm (kg/m ²)	0,32	0,27	0,30	0,01	0,28	0,31

Trên cơ sở số liệu đánh giá các tính trạng chính của G_1 đã chọn được 10 dòng để so sánh dòng và chọn lọc thế hệ G_2 .

Đánh giá và chọn lọc thế hệ G_2 (vụ thứ ba): Vụ mùa 2020 tiến hành so sánh và nhân sơ bộ 10 dòng G_2 mới chọn lọc, các dòng được cấy tuần tự cả ở ruộng so sánh và nhân dòng, đối chứng là giống Tẻ đỏ chưa phục tráng.

Bảng 5. Đặc điểm nông sinh học của 10 dòng Tè đỏ và đối chứng chưa phục tráng.

TT	Mã số dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Dạng hình cây	Màu sắc lá	Màu tai lá	Màu hạt thóc	Màu sắc gạo lật	Độ thuần đồng ruộng (điểm)	Độ thoát cỏ bông (điểm)	Độ tàn lá (điểm)
1	TĐ87	138	127,0	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
2	TĐ93	138	129,2	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
3	TĐ95	138	127,1	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
4	TĐ118	138	126,7	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
5	TĐ131	138	127,0	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
6	TĐ132	138	125,0	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
7	TĐ139	138	128,7	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
8	TĐ141	138	126,7	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
9	TĐ157	138	125,2	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
10	TĐ163	138	126,8	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	1	1	5
11	Tè đỏ chưa phục tráng (đ/c)	135-138	123,3	V gọn	Xanh	Tím	Khía nâu	Đỏ	5	1	5

Kết quả đánh giá đặc điểm nông sinh học của giống chưa phục tráng và giống được chọn lọc ở bảng 5 cho thấy, các dòng được chọn lọc có đặc điểm nông sinh học tương đồng với nguyên bản, có cùng thời gian sinh trưởng, độ thuần đồng ruộng (điểm 1) được cải thiện đáng kể so với giống chưa phục tráng (điểm 5).

Bảng 6. Một số tính trạng chính và năng suất của 6 dòng G₂ và giống chưa phục tráng.

TT	Mã số dòng	Thời gian sinh trưởng (ngày)	Chiều cao thân (cm)	Chiều dài bông (cm)	Số bông/cây	Khối lượng 1000 hạt (g)	Số hạt chắc/cây	Năng suất ô (kg/m ²)	Màu sắc gạo lật	Hương thơm
1	TĐ87	138	99,8	27,2	5	26,2	437,9	0,31	Đỏ	Không
2	TĐ95	138	100,7	26,4	5	26,2	445,3	0,32	Đỏ	Không
3	TĐ118	138	100,4	26,3	6	26,2	533,8	0,38	Đỏ	Không
4	TĐ131	138	99,7	27,3	5	26,2	433,8	0,31	Đỏ	Không
5	TĐ141	138	100,0	26,7	5	26,2	433,3	0,31	Đỏ	Không
6	TĐ163	138	99,7	27,1	5	26,2	443,9	0,32	Đỏ	Không
Tè đỏ chưa phục tráng (đ/c)		135-138	97,1	26,2	5,7	26,7	399,6	0,29	Đỏ	Không
Cao nhất		Tỉnh trên 10 dòng G2	101,8	27,50	7,00	26,30	641,42	0,43		
Thấp nhất			99,0	26,00	5,00	26,10	433,32	0,31		
Trung bình			100,13	26,81	5,70	26,21	503,86	0,35		
Độ lệch chuẩn			0,90	0,55	0,82	0,06	76,66	0,04		

Kết quả đánh giá và tham số thống kê của một số tính trạng chính và năng suất của 6 dòng G₂ sau khi đánh giá và chọn lọc so với giống chưa phục tráng được trình bày ở bảng 6. Kết quả cho thấy, thời gian sinh trưởng của tất cả các dòng G₂ của giống lúa Tè đỏ là 138 ngày; chiều cao thân trung bình là 100,13 cm (dòng có chiều cao thấp nhất là 99,0 cm và cao nhất là 101,8 cm). Chiều dài bông dao động trong khoảng 26,0-27,5 cm, trung bình là 26,81 cm. Khối lượng 1000 hạt dao động trong khoảng 26,1-26,3 g, trung bình là 26,21 g. Năng suất thực thu trung bình của các dòng đạt 0,35 kg/m², cao nhất là dòng TĐ132 đạt 0,43 kg/m², thấp nhất là 3 dòng TĐ87, TĐ131 và TĐ141 cùng đạt 0,31 kg/m².

Trong quá trình đánh giá, kiểm định trên đồng ruộng kết hợp đánh giá trong phòng đã loại 4 dòng do sự đồng đều không cao là TĐ93, TĐ132, TĐ139 và TĐ157.

Bảng 7. Mức độ nhiễm một số sâu bệnh hại chính và khả năng chống đổ của 6 dòng và đối chứng chưa phục tráng.

Chỉ tiêu	Dòng	TĐ87	TĐ95	TĐ118	TĐ131	TĐ141	TĐ163	Tè đỏ chưa phục tráng (đ/c)
Bệnh khô vằn (điểm)		1	1	1-3	1-3	3	3	3-5
Bệnh bạc lá (điểm)		1	1	1-3	1-3	1-3	1-3	3-5
Bệnh đốm nâu (điểm)		3	3	3	1-3	3	3	3
Bệnh đạo ôn (điểm)		1	1	1	1	1-3	1-3	3
Sâu cuốn lá (điểm)		3	1	1	1	1-3	1-3	5
Sâu đục thân (điểm)		3	3	3	1-3	3	3-5	5
Rầy nâu (điểm)		1	1	1	1	1-3	1-3	3
Bọ xít dài (điểm)		3	3	3	3	3-5	3-5	5
Khả năng chống đổ (điểm)		1-3	1-3	1-3	1-3	3	3	5

Kết quả đánh giá mức độ nhiễm một số sâu bệnh hại chính của các dòng Tè đỏ G₂ so với giống chưa phục tráng được trình bày ở bảng 7 cho thấy, các dòng được chọn nhiễm có khả năng chống chịu sâu bệnh tốt hơn so với giống chưa phục tráng nhiễm.

Như vậy, kết hợp giữa đánh giá trong phòng và trên đồng ruộng đã chọn được 6 trong số 10 dòng. Các dòng được chọn có các tính trạng tương đồng với nguyên bản, số hạt chắc/cây và năng suất ô (kg/m²) đều cao hơn so với giống chưa phục tráng. Hạt giống của các dòng ở ruộng nhân dòng và ruộng so sánh của 6 dòng đạt yêu cầu được hỗn thành hạt giống siêu nguyên chủng. Kết quả thu được 400 kg hạt siêu nguyên chủng giống lúa Tè đỏ Điện Biên.

4. Kết luận

Trong giai đoạn 2018-2020 triển khai thực hiện vụ: “Nghiên cứu, khai thác và phát triển nguồn gen Tẻ mèo Sơn La và Tẻ đỏ Điện Biên” (mã số: 09/2018-HĐ-NVQG), nhóm nghiên cứu đã phục tráng thành công giống lúa đặc sản Tẻ đỏ Điện Biên và sản xuất được 400 kg hạt giống siêu nguyên chủng đạt Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng hạt giống lúa [7]. Các dữ liệu của nghiên cứu này góp phần làm cơ sở để so sánh và chọn lọc, duy trì dòng thuần theo các đặc trưng phục vụ công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen ngoài sản xuất, đồng thời góp phần vào đa dạng nguồn giống cung cho các giải pháp kỹ thuật thích ứng biến đổi khí hậu cho khu vực miền núi phía Bắc Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.T. Quynh (2004), *Evaluation of Genetic Diversity of Local Rice Seed Resources in Northern Vietnam*, Doctoral thesis in agriculture, Vietnam Academy of Agricultural Sciences (in Vietnamese).
- [2] P.V. Tinh, N.P. Long, N.A. Dung, et al. (2019), “Survey and evaluation of specific agro-biological characteristics of rice varieties Tẻ Meo, Sơn La and Tẻ đỏ, Điện Biên”, *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **12(109)**, pp.63-73 (in Vietnamese).
- [3] M. Reynolds, J. Cairns, C. Stirling, et al. (2017), “Stress tolerant varieties to counter climate change”, *10 Best Bet Innovations for Adaptation in Agriculture: A Supplement to the UNFCCC NAP Technical Guidelines*, Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS), **3**, pp.25-30.
- [4] Ministry of Agriculture and Rural Development (2006), *Industry Standard 10TCN 395-2006: Pure Rice - Technical Process for Producing Pure Rice Seeds* (in Vietnamese).
- [5] Ministry of Agriculture and Rural Development (2011a), *QCVN 01- 65:2011/BNNPTNT: National Technical Regulations on Testing for Distinctness, Uniformity and Stability of Rice Varieties* (in Vietnamese).
- [6] International Rice Research Institute (2013), *Standard Evaluation System for Rice*.
- [7] Ministry of Agriculture and Rural Development (2011b), *QCVN 01- 54:2011/BNNPTNT: National Technical Regulations on Rice Seed Quality* (in Vietnamese).

Bước đầu nghiên cứu ảnh hưởng của nano coban đến một số đặc tính nông sinh học của giống Đậu tương DT96 trồng tại Vĩnh Phúc

Phan Thị Thu Hiền*, Hà Đức Chính, Phạm Phương Thu, Đỗ Thu Thảo,
Bùi Thị Thủy, Hà Đăng Chiến, Kiều Thị Hương Mai, Nguyễn Văn Đình

Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, phường Xuân Hòa, TP Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/12/2021; ngày chuyển phản biện 24/12/2021; ngày nhận phản biện 27/1/2022; ngày chấp nhận đăng 7/2/2022

Tóm tắt:

Công nghệ và vật liệu nano đã được ứng dụng thành công ở một số nước nhằm tăng sản lượng và chất lượng cây trồng. Ở Việt Nam, một số nghiên cứu đã tập trung vào đánh giá hiệu quả mang lại khi sử dụng các hạt nano kim loại ở nhiều loài cây trồng khác nhau. Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của nano coban đối với quá trình nảy mầm và một số đặc tính sinh học của giống Đậu tương (*Glycine max* L. Merr) DT96. Kết quả cho thấy, xử lý hạt giống Đậu tương DT96 với các dung dịch nano coban đã thúc đẩy tốc độ nảy mầm, làm tăng tỷ lệ nảy mầm, trong đó liều lượng 0,33 mg/kg hạt giống cho kết quả tốt (93,03%). Ngoài ra, nano coban còn làm tăng sinh trưởng của cây Đậu tương DT96, các thông số về chiều cao thân, chiều dài rễ, khối lượng khô của thân rễ... đều tăng hơn đối chứng và đạt cực đại khi xử lý với liều lượng 0,33 mg/kg hạt.

Từ khóa: chiều dài rễ, Đậu tương DT96, khối lượng thân, nano coban, tỷ lệ nảy mầm, Vĩnh Phúc.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Đậu tương là một trong những cây trồng quan trọng trong nền nông nghiệp của Việt Nam, là nguồn cung cấp protein và dầu thực vật chủ yếu cho con người, nguồn thức ăn dinh dưỡng cho gia súc, gia cầm.

Theo báo cáo của Tổng cục Thống kê, năng suất trung bình 5 năm trở lại đây của cây Đậu tương Việt Nam ở mức thấp, khoảng 15,01 tạ/ha. Điều kiện môi trường và các tác nhân sinh học, phi sinh học là nguyên nhân chính làm ảnh hưởng đến sản lượng và chất lượng của Đậu tương. Cùng với các giải pháp về cải thiện giống, chế độ dinh dưỡng, kỹ thuật canh tác... việc sử dụng các nano kim loại (Fe, Mn, Zn, Cu, Se...) cũng là một hướng đi có triển vọng để nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm cây trồng, đã và đang được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp bởi chúng tham gia vào quá trình oxy hóa - khử khác nhau và là thành phần của nhiều enzyme, protein trong thực vật [1]. Coban được xem là một nguyên tố kim loại có ích đối với thực vật bậc cao mặc dù chưa có bằng chứng về vai trò trực tiếp của nó. Coban tham gia vào quá trình tổng hợp chlorophyll, hạn chế sự phân hủy của nó trong tối, kích thích sự phát triển của cây, tham gia vào quá trình trao đổi đạm do nó được tìm thấy nhiều trong các phức hệ protein trong ty thể của tế bào. Đối với các loài cây họ đậu, coban là một yếu tố cần thiết cho một số loại vi sinh vật, đặc biệt là vi sinh vật cố định nitơ trong khí quyển, sự thiếu hụt của chúng thường làm giảm hiệu quả cố định nitơ của cây trồng [2]. Coban có tầm quan trọng rất lớn trên hoạt động và quần thể vi sinh vật cố định ni tơ khí quyển thuộc hai chi *Azotobacte* và *Nitrobacter* [3].

L.T. Thoa và cs (2017) [4] cũng đã cho thấy, coban là yếu tố cần thiết cho quá trình tổng hợp vitamin B₁₂ - vitamin cần thiết cho dinh dưỡng của con người và động vật. Trên thế giới và Việt Nam đã có một số nghiên cứu về ảnh hưởng của hạt nano kim loại đến các chỉ tiêu quang hợp, sinh trưởng và hoạt tính của các enzyme chống oxy hóa với năng suất của một số cây trồng. Tuy nhiên, đối với Đậu tương DT96 là giống có tiềm năng về năng suất cao thì việc xử lý hạt bằng nano coban có ảnh hưởng như thế nào vẫn chưa có kết quả nghiên cứu. Do vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu ảnh hưởng của nano coban đến một số đặc tính nông sinh học của giống Đậu tương DT96 trồng tại Vĩnh Phúc.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Giống Đậu tương DT96 do Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Một lượng hạt nano coban được phân tán trong nước RO bằng máy siêu âm Sonic & Materials với công suất 375 W trong 3 phút 30 giây để đạt nồng độ như mong muốn. Dung dịch nano coban được xử lý xong, cho vào các đĩa petri có chứa các hạt Đậu tương và trộn đều, để yên trong 30 phút. Giàn mỏng hạt và để khô ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ tới khi vỏ hạt khô rồi tiến hành gieo [5, 6].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm đồng ruộng theo phương pháp khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD) với 3 lần nhắc lại, 4 công thức bao gồm:

*Tác giả liên hệ: Email: phanthithuhien@hpu2.edu.vn

Effect of nano cobalt on some agro-biological characteristics of DT96 soybean cultivated in Vinh Phuc province

Thi Thu Hien Phan*, Duc Chinh Ha,
Phuong Thu Pham, Thu Thao Do, Thi Thuy Bui,
Dang Chien Ha, Thi Huong Mai Kieu, Van Dinh Nguyen

Faculty of Biology and Agricultural Engineering, Hanoi Pedagogical University 2,
Xuan Hoa Ward, Phuc Yen City, Vinh Phuc Province, Vietnam

Received 20 December 2021; revised 27 January 2022; accepted 7 February 2022

Abstract:

Nanotechnology and nanomaterials were successfully applied in several countries to increase crop yield and quality. In Vietnam, some studies have focused on evaluating the effectiveness of using metal nanoparticles in many different plants. This study showed that the utilisation of nano-cobalt proved a good impact on the seed germination and agro-biological characteristics of the DT96 soybean cultivar (*Glycine max* L. Merr). Results exhibited that the treatment of DT96 soybean seeds with cobalt nanoparticle solutions increased the germination rate and remarkably increased the germination rate, in which the dose of 0.33 mg/kg of seeds gave good results (93.03%). In addition, nano cobalt also improved the growth of DT96 soybean; stem height, root length, and dry weight of rhizomes... all increased more than the control and reached the maximum when being treated with a dose of 0.33 mg/kg of seeds.

Keywords: DT96 soybean, germination rate, nano cobalt, root length, trunk weight, Vinh Phuc.

Classification number: 4.1

- Đối chứng (ĐC): xử lý nước RO.
- Công thức 1 (CT1): xử lý hạt nano coban, nồng độ 0,17 mg/kg hạt giống.
- Công thức 2 (CT2): xử lý hạt nano coban, nồng độ 0,33 mg/kg hạt giống.
- Công thức 3 (CT3): xử lý hạt nano coban, nồng độ 100 mg/kg hạt giống.

Mỗi công thức được tiến hành 3 lần lặp lại, mỗi lần nhắc lại với diện tích 6 m². Đậu tương được trồng trong Vườn thực nghiệm của Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2. Trước khi gieo trồng, chúng tôi tiến hành khử sâu bệnh bằng vôi bột. Gieo theo hàng, mỗi hạt cách nhau 3 cm. Tiến hành chăm sóc, làm cỏ và vun gốc sau 20 ngày gieo trồng.

2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

- **Chiều cao thân:** chiều cao thân được đo bằng thước thẳng với số chia nhỏ nhất là mm, cách đo từ gốc đến đỉnh sinh trưởng của 30 cây trong mỗi ô thí nghiệm vào các thời điểm 10, 20, 30, 40 và 60 ngày sau khi trồng.

- **Chiều dài rễ:** được đo bằng thước thẳng với số chia nhỏ nhất là mm, cách đo từ gốc đến chóp rễ dài nhất của 3 cây trong mỗi ô thí nghiệm vào các thời điểm 10, 20, 30, 40 và 60 ngày sau khi trồng.

- **Khối lượng tươi - khô của thân và lá:** được xác định bằng cách cân bằng cân phân tích vào các thời điểm 10, 20, 30 và 40 ngày sau khi trồng. Mỗi ô thí nghiệm đo 3 cây ngẫu nhiên.

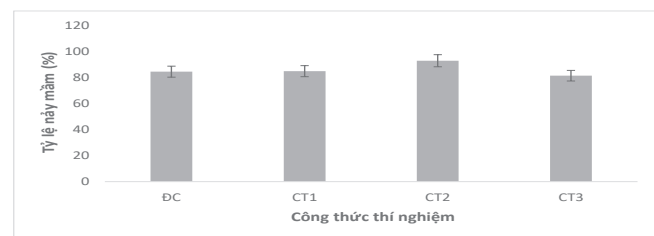
2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo tham số thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của nano coban đến tỷ lệ nảy mầm của giống Đậu tương DT96

Tỷ lệ nảy mầm cao hay thấp phụ thuộc vào chất lượng hạt giống, điều kiện sinh thái trong thời gian gieo trồng. Để đánh giá ảnh hưởng của nano coban đến sự nảy mầm của giống Đậu tương DT96, chúng tôi tiến hành đếm trực tiếp các hạt đậu nảy mầm (đã đưa được 2 lá mầm khỏi mặt đất) từ ngày thứ 2 đến thứ 4 sau khi gieo và tính tỷ lệ nảy mầm trung bình ở các công thức thí nghiệm. Kết quả về tỷ lệ nảy mầm của các công thức được thể hiện ở hình 1.



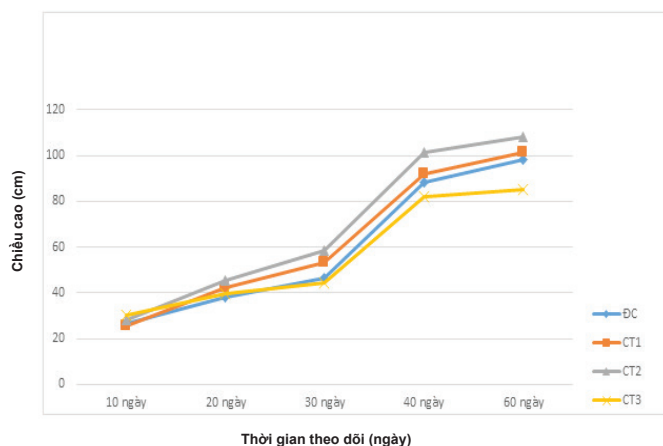
Hình 1. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của nano coban đến tỷ lệ nảy mầm của giống Đậu tương DT96.

Kết quả hình 1 cho thấy, tỷ lệ nảy mầm của CT2 cao nhất (đạt 93,03%) trong các công thức thí nghiệm, tiếp đến là ĐC (84,6%) và CT1 (83,03%) tương đương nhau, thấp nhất là CT3 (81,5%). Như vậy, xử lý nano coban với liều lượng 0,33 mg/kg hạt (CT2) có tác dụng tốt đến tỷ lệ nảy mầm, tương tự như kết quả của P.T. Hoe và cs (2018) [7]; Q.B. Ngo và cs (2014) [8] trên các giống Đậu tương giai đoạn nảy mầm, các enzym thủy phân được tổng hợp để phân hủy các chất hữu cơ dự trữ trong hạt tạo nguyên liệu cung cấp cho quá trình hô hấp hiếu khí vừa tạo năng lượng vừa cung cấp nguyên liệu để tổng hợp các tế bào phục vụ cho hạt nảy mầm, coban là một trong các nguyên tố vi lượng có thể

tham gia vào xúc tác các enzym trong giai đoạn này.

3.2. Ảnh hưởng của nano coban đến động thái tăng trưởng chiều cao cây của giống Đậu tương DT96

Sự phát triển chiều cao cây của thân chính có liên quan chặt chẽ đến khả năng đổ, số lá trên cây, sự phân hóa mầm hoa, ra hoa và tạo quả. Để đánh giá ảnh hưởng của nano coban đến động thái tăng trưởng chiều cao giống Đậu tương DT96, chúng tôi tiến hành đo chiều cao vào các thời điểm 10, 20, 30, 40 và 60 ngày sau khi trồng. Ở giai đoạn 10 và 20 ngày sau khi trồng, chiều cao cây tăng trưởng chậm và gần như không có sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm. Các giai đoạn 20-40 ngày sau khi trồng, chiều cao cây tăng trưởng nhanh, trong đó sự tăng trưởng chiều cao cây ở CT2 và CT1 cao hơn ĐC, thấp nhất là CT3. Giai đoạn 40-60 ngày sau khi trồng, chiều cao cây tăng trưởng chậm hơn so với các giai đoạn trước do phải tập trung dinh dưỡng nuôi hoa, quả với xu hướng tương tự (tốt nhất ở CT1 và CT2, kém nhất là CT3) (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của nano coban đến động thái tăng trưởng chiều cao giống Đậu tương DT96.

So sánh động thái tăng trưởng chiều cao của giống Đậu tương DT96 dưới ảnh hưởng của nano coban ở tất cả các giai đoạn cho thấy, xử lý hạt bằng nano coban với liều lượng 0,17 mg/kg hạt (CT1) và 0,33 mg/kg hạt (CT2) đã có tác động tích cực (cao hơn ĐC), còn ở liều lượng 100 mg/kg hạt, tác dụng diễn biến ngược lại. Liều lượng xử lý 0,33 mg/kg hạt đem lại hiệu quả tốt nhất, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Phan Hoàng Tuấn và cs (2017, 2018) [5, 6].

3.3. Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng tươi, khô của thân giống Đậu tương DT96

Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng tươi của thân: Khối lượng tươi, khô của thân cũng thể hiện khả năng sinh trưởng của cây trồng nói chung và Đậu tương nói riêng, phụ thuộc chủ yếu vào đặc tính của giống và các kỹ thuật chăm sóc (bảng 1). Kết quả bảng 1 cho thấy, giai đoạn từ

khi trồng đến 30 ngày, các công thức thí nghiệm chưa có sự khác biệt lớn về khối lượng tươi của thân, nguyên nhân là do giai đoạn này sản phẩm quang hợp chưa lớn do số lượng lá còn ít, đồng thời cây chủ yếu tăng trưởng về chiều cao.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng tươi của thân giống Đậu tương DT96.

Công thức	Khối lượng thân tươi (g/cây)				
	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30	Ngày 40	Ngày 60
ĐC	0,72±0,04	0,78±0,03	0,93±0,01	2,75±0,05	12,2±0,14
CT1	0,72±0,025	1,11±0,08	1,24±0,02	3,33±0,21	16,5±0,17
CT2	0,8±0,09	1,51±0,05	1,58±0,04	4,17±0,03	19,3±0,33
CT3	0,72±0,1	0,87±0,1	0,88±0,05	2,3±0,2	12,1±0,63

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=0,05$.

Ở ĐC, cây Đậu tương 10 ngày tuổi có khối lượng thân tươi đạt 0,72 g, 20 ngày là 0,78 g, 40 ngày đạt 2,75 g và cao nhất ở thời điểm 60 ngày (12,20 g). Ở CT1, khối lượng thân tươi trung bình đạt 0,72 g ở thời điểm 10 ngày, tăng lên 3,33 g ở 40 ngày và đạt 16,5 g ở 60 ngày. Ở CT2, khối lượng thân tươi trung bình tăng từ 0,8 lên 19,3 g từ ngày thứ 10 đến 60. Ở CT3 đạt 0,72 g ở 10 ngày, đến 30 ngày tăng nhẹ lên 0,88 g, đạt 2,3 g ở 40 ngày và cao nhất là 12,1 g ở 60 ngày.

Trong các công thức nghiên cứu, CT1 và CT2 có khối lượng tươi của thân cao hơn so với ĐC, trong khi CT3 thấp hơn. Điều này có thể do liều lượng nano coban quá cao đã gây ức chế quá trình phát triển thân của cây Đậu tương DT96. Giai đoạn 40-60 ngày sau khi trồng, khối lượng tươi của thân tăng rất nhanh và xu hướng cũng diễn ra tương tự, nghĩa là CT1 và CT2 có giá trị cao nhất, ĐC và CT3 tương đương nhau và kém hơn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của P.H. Tuan và cs (2018) [6]. Nghiên cứu [6] cũng cho thấy, khi xử lý hạt Đậu tương DT51 với nano coban ở liều lượng 0,17 mg/kg hạt, các thông số về chiều cao cây, chiều dài rễ, khối lượng thân, khối lượng rễ... đều cao hơn so với ĐC và cao nhất so với các liều lượng đã sử dụng. Có sự khác nhau ở liều lượng nano coban thích hợp có thể do điều kiện thổ nhưỡng của nơi canh tác khác nhau. Ngoài ra, có thể còn do sự khác nhau về bản chất di truyền của giống Đậu tương DT51 so với DT96.

Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng khô của thân: Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng khô của thân giống Đậu tương DT96 được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng khô của thân giống Đậu tương DT96.

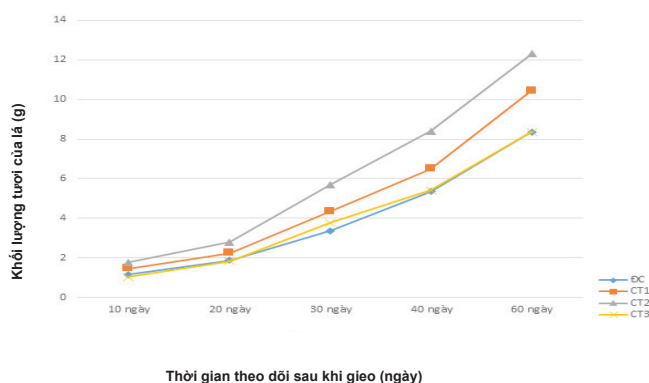
Công thức	Khối lượng thân khô (g/cây)				
	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30	Ngày 40	Ngày 60
ĐC	0,13±0,02	0,46±0,35	0,64±0,04	0,69 ^{bc} ±0,02	1,05±0,01
CT1	0,13±0,01	0,47±0,28	0,60±0,02	0,72 ^a ±0,1	1,30 ^a ±0,12
CT2	0,15±0,003	0,59±0,5	1,08±0,13	1,15±0,04	2,02±0,01
CT3	0,15±0,04	0,45±0,1	0,67 ^{bc} ±0,06	0,69±0,06	1,08±0,11

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 2 cho thấy, ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng khô trung bình của thân cây Đậu tương DT96 ở các liều lượng khác nhau là khác nhau. Ở ĐC, khối lượng thân khô trung bình ở 10-60 ngày là 0,13-1,05 g. Ở CT1, khối lượng thân khô trung bình dao động từ 0,13 g ở 10 ngày tuổi lên 0,47 g ở 20 ngày tuổi và đạt cao nhất là 1,3 g ở 60 ngày tuổi. CT2 có khối lượng thân khô trung bình đạt 0,15 g ở 10 ngày tuổi, tăng lên 1,15 g ở 40 ngày tuổi và đạt cao nhất là 2,02 g ở 60 ngày tuổi. CT3 tăng từ 0,15 g ở 10 ngày tuổi lên 1,08 g ở 60 ngày tuổi. Ở tất cả các công thức thí nghiệm, khối lượng khô của thân đều tăng cao hơn ĐC ở mức có ý nghĩa $\alpha=0,05$. Kết quả thu được của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của P.H. Tuan và cs (2018) [6] do khối lượng khô của thân tỷ lệ thuận với khối lượng tươi thu được ở mỗi công thức thí nghiệm, trong đó CT2 (liều lượng xử lý 0,33 mg/kg hạt) có khối lượng thân khô thu được cao nhất (2,02 g ở thời điểm 60 ngày tuổi). kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả thu được khi nghiên cứu trên đối tượng đậu đũa [9, 10].

3.4. Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng tươi, khô của lá giống Đậu tương DT96

Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng tươi của lá: Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng tươi của lá giống Đậu tương DT96 được trình bày ở hình 3 cho thấy, công thức ĐC, khi được 10 ngày tuổi đạt 1,15 g, sau đó tăng lên 1,87 g ở 20 ngày tuổi, 5,36 g tại thời điểm 40 ngày và đạt giá trị cực đại (8,36 g) vào lúc 60 ngày tuổi.

**Hình 3. Đồ thị đánh giá ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng tươi của lá giống Đậu tương DT96.**

CT1 có khối lượng lá tươi ở thời điểm 10 ngày tuổi đạt 1,47 g, ở 20 ngày tuổi đạt 2,25 g, đạt 4,36-6,50 g ở 30 và 40 ngày tuổi, 60 ngày tuổi đạt 10,45 g. Ở CT2, khối lượng lá tươi đạt 1,77 g ở thời điểm 10 ngày tuổi, tăng lên 5,69 g ở 30 ngày tuổi và đạt 12,3 g ở 60 ngày tuổi. CT3 đạt thấp nhất là 1,03 g ở 10 ngày tuổi, 1,30 g ở 20 ngày tuổi, tăng lên 4,41 g ở 40 ngày tuổi và cao nhất là 7,35 g ở 60 ngày tuổi.

Như vậy, tương tự như với thân chính, việc sử dụng nano coban ở liều lượng thấp (CT1 và CT2) đã làm tăng khối lượng tươi của lá so với ĐC, còn ở liều lượng cao (CT3) tác dụng ngược lại, khối lượng thấp hơn ĐC.

Ảnh hưởng của nano coban đến khối lượng khô của lá: Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nano coban đến sinh khối khô của lá giống Đậu tương DT96 được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng nano coban đến khối lượng khô của lá giống Đậu tương DT96.

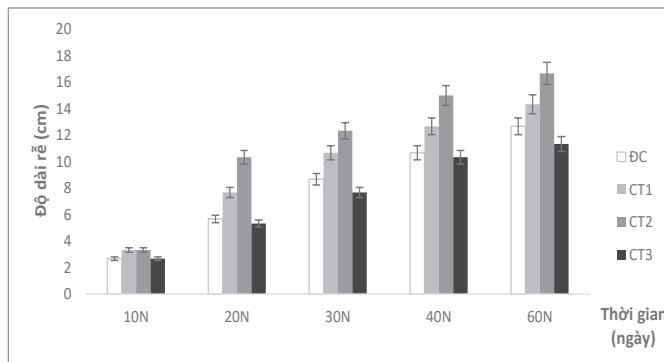
Công thức	Khối lượng lá khô (g/cây)				
	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30	Ngày 40	Ngày 60
ĐC	0,07±0,04	0,16±0,04	0,44±0,012	0,80±0,078	1,19±0,03
CT1	0,12±0,01	0,26±0,03	0,64±0,03	1,38±0,13	1,79±0,06
CT2	0,20±0,07	0,34±0,04	0,72±0,01	1,93±0,03	2,28±0,06
CT3	0,05±0,01	0,14±0,01	0,49±0,05	0,82±0,002	1,21±0,07

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=0,05$.

Ở tất cả các công thức thí nghiệm giai đoạn từ khi trồng cho đến 20 ngày sau khi trồng khối lượng khô của lá tăng chậm, khối lượng khô của lá bắt đầu tăng nhanh từ giai đoạn 20 ngày sau khi trồng và đạt cao nhất vào giai đoạn 60 ngày sau khi trồng. Đối với CT3, tất cả các giai đoạn khảo sát, khối lượng khô của lá tương đương với ĐC, sự khác biệt không lớn. Ngược lại ở CT1 và CT2, tất cả các giai đoạn khảo sát khối lượng khô của lá đều cao hơn ĐC, đặc biệt là giai đoạn 30-60 ngày sau khi trồng. Qua phân tích ảnh hưởng của xử lý nano coban đến khả năng tích lũy sinh khối tươi và khô của lá giống Đậu tương DT96 cho thấy, khi xử lý nano coban ở nồng độ thấp (0,17-0,33 mg/kg hạt) có ảnh hưởng tốt đến tích lũy sinh khối tươi và khô của lá so với ĐC. Tuy nhiên, xử lý nano coban ở CT2 có hiệu quả nhất.

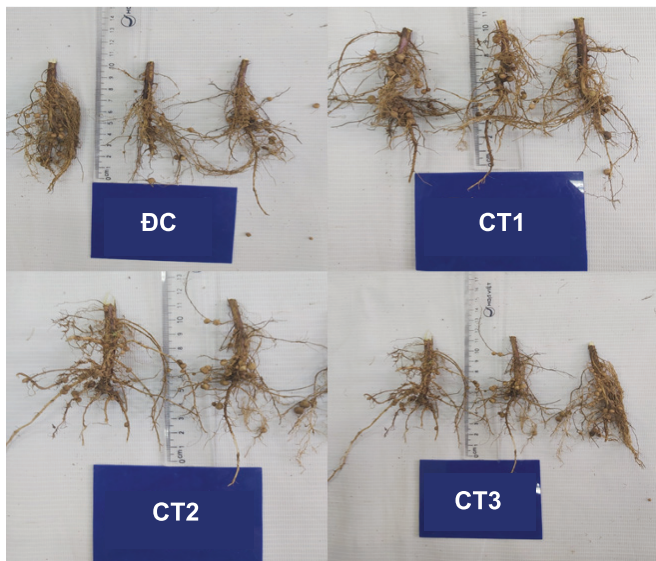
3.3. Ảnh hưởng của nano coban đến chiều dài rễ giống Đậu tương DT96

Rễ là cơ quan dưới mặt đất có vai trò vừa hút nước và muối khoáng cung cấp cho các bộ phận trên mặt đất vừa giúp tạo giá thể cho toàn bộ các phần trên mặt đất, vì vậy chúng tôi tiến hành đo chiều dài rễ qua các giai đoạn phát triển. Mỗi ô thí nghiệm tiến hành nhổ 3 cây, rửa sạch, cắt từ gốc và tiến hành đo chiều dài của rễ. Kết quả được thể hiện ở hình 4 và 5.



Hình 4. Ảnh hưởng của nano coban đến chiều dài rễ của giống Đậu tương DT96.

Từ kết quả hình 4, chúng tôi có nhận định rằng, ở thời điểm 10 và 20 ngày tuổi, chiều dài rễ trung bình ở CT1 và CT2 cao hơn các công thức còn lại. Những giai đoạn tiếp theo (30, 40 và 60 ngày tuổi) trật tự của công thức CT1 và CT2 tuy có thay đổi nhưng đều có giá trị cao hơn CT3 và ĐC, chứng tỏ việc xử lý nano coban ở mức thấp (0,17 đến 0,33 mg/kg hạt) có tác dụng tốt hơn đối với việc tăng trưởng chiều dài rễ của giống Đậu tương DT96.



Hình 5. Hình ảnh rễ của các công thức thí nghiệm ở thời điểm 30 ngày sau khi trồng.

4. Kết luận

1. Nano coban có tác động tích cực đến quá trình nảy mầm ở giống Đậu tương DT96, trong đó xử lý ở liều lượng 0,33 mg/kg hạt cho kết quả tốt nhất, tỷ lệ nảy mầm đạt 93,03%.

2. Khả năng sinh trưởng của cây Đậu tương DT96 thể hiện qua các chỉ tiêu chiều cao thân, chiều dài rễ, khối lượng tươi, khô của lá, khối lượng tươi, khô của thân rễ... có sự cải thiện đáng kể khi xử lý nano coban, trong đó liều lượng 0,33 mg/kg hạt đem lại kết quả tốt nhất.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài mã số B.2021-SP2-04. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] N.H. Hoang, T.T. Huyen, V.D. Kinh, et al. (2016), "Selection of suitable soybean varieties for winter season on two rice crop land in Thanh Hoa province", *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **4**, pp.20-24 (in Vietnamese).

[2] N.V. Manh (2020), *Research on Improving Soybean Varieties DT2008, DT96 and DDT26 by Treating Mutation of Co60 Source Gamma Rays*, Doctoral thesis, Vietnam Academy of Agricultural Sciences (in Vietnamese).

[3] L.D. Thao, N.V. Manh, P.T.B. Chung, et al. (2015), "Research for constructing intensive technique process of soybean variety DT2008 in Son La province", *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **7(61)**, pp.52-55 (in Vietnamese).

[4] L.T.Thoa, T.T. Truong (2017), "Evaluation of soybean varieties and sowing time for DT51 in Summer crop season in Hung Ha district, Thai Binh province", *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **10(83)**, pp.91-94 (in Vietnamese).

[5] P.H. Tuan, L.T. Tam, H.T.L. Anh, et al. (2017), "Effects of zero-valent cobalt nanoparticles on photosynthesis and chlorophyll a content of soybean (*Glycine max* L. Merr.) DT26", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **15(4A)**, pp.63-69, (in Vietnamese).

[6] P.H. Tuan, L.T. Tam, H.T.M. Hien, et al. (2018), "Evaluating the effect of zero-valent cobalt nanoparticles on growth and photosynthetic parameters of Soybean (*Glycine max* L. Merr.) DT51 plants at different stages", *Proceedings of the Industrial Science Conference National Biology Technology*, pp.1331-1338 (in Vietnamese).

[7] P.T. Hoe, T.M. Linh, N.T. Van, et al. (2018), "Research on the effects of nano zinc oxide and nano cobalt on the germination process of soybean seeds (*Glycine max* L. Merr.)", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **16(3)**, pp.501- 508 (in Vietnamese).

[8] Q.B. Ngo, T.H. Dao, H.C. Nguyen, et al. (2014), "Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT51)", *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, **5(1)**, DOI: 10.1088/2043-6262/5/1/015016.

[9] C.M. Balai, et al. (2005), "Effect of soil compaction, potassium and coban on growth and yield of cowpea", *Indian Journal of Pulses Research*, **18(1)**, pp.38-39.

[10] G.I. Churilov, et al. (2013), "Cuprum and coban nanoparticles influence on bull-calves growth and development", *Journal of Materials Science and Engineering. B*, **3(6B)**, pp.379-385.

Nghiên cứu ảnh hưởng của các hợp chất cao phân tử ngoại bào từ vi khuẩn lactic lên đáp ứng miễn dịch của tôm Sú (*Penaeus monodon*)

Trương Tiến Công^{1*}, Nguyễn Minh Chơn¹, Nguyễn Hữu Thanh²,
Nguyễn Phú Thọ², Trịnh Thị Lan², Nguyễn Hữu Yên Nhi², Nguyễn Thị Thúy Hằng²

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, Khu II, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 18 đường Ung Văn Khiêm, phường Đồng Xuyên, TP Long Xuyên, tỉnh An Giang, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/10/2021; ngày chuyển phản biện 28/10/2021; ngày nhận phản biện 7/12/2021; ngày chấp nhận đăng 10/12/2021

Tóm tắt:

Các hợp chất cao phân tử ngoại bào (EPS - Extracellular polymeric substances) được biết đến là một hợp chất có khả năng như prebiotic để thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn có lợi trong đường ruột của người và động vật. Để chứng minh tiềm năng prebiotic của các EPS được sản xuất từ vi khuẩn lactic, *Lactobacillus plantarum* và *Bifidobacterium bifidum*, nghiên cứu này đã đánh giá ảnh hưởng của các vi khuẩn trên với đáp ứng miễn dịch ở tôm khi lây nhiễm với vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*. Kết quả cho thấy, khẩu phần ăn có bổ sung các loại EPS khác nhau đã kích thích miễn dịch của tôm Sú đối với bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND - Acute hepatopancreatic necrosis disease), hay còn gọi là hội chứng chết sớm (EMS - Early mortality syndrome) ở tôm do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra. Việc bổ sung EPS vào thức ăn của tôm đã làm tăng đáng kể tổng số lượng bạch cầu, hoạt tính suy hô hấp cấp, hoạt tính của phenoloxidase (PO) và superoxide dismutase. Kết quả nghiên cứu cho thấy, EPS do vi khuẩn lactic sản xuất thể hiện tiềm năng như prebiotic, có thể trở thành giải pháp thay thế việc sử dụng kháng sinh trong nuôi tôm nhằm gây ức chế sự phát triển của mầm bệnh.

Từ khóa: *Bifidobacterium bifidum*, lactic, *Lactobacillus plantarum*, prebiotic, tôm Sú, *Vibrio parahaemolyticus*.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Tôm biển, đặc biệt là tôm Sú chiếm tỷ trọng lớn trong ngành nuôi trồng giáp xác [1]. Tuy nhiên, những năm gần đây dịch bệnh trên tôm xuất hiện và bùng phát ngày càng nghiêm trọng đã gây thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành nuôi tôm [2].

Các EPS của vi khuẩn với thành phần chính là các polysaccharide đã được sử dụng như một chất thay thế tự nhiên cho thuốc kháng sinh vì những lợi ích sức khỏe mà nó có thể mang lại [3]. Prebiotic là các thành phần không tiêu hóa có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn đường ruột một cách có chọn lọc và có khả năng kích thích hệ thống miễn dịch của động vật thủy sản [4]. Prebiotic được lên men bởi vi khuẩn lactic tạo ra các chất chuyển hóa khác nhau như axit béo mạch ngắn với các hoạt động chống viêm và điều hòa miễn dịch [5]. Như vậy, các EPS do vi khuẩn lactic sản xuất có tiềm năng như những prebiotic [6] có thể được sử dụng cho nuôi tôm.

Sản xuất EPS ở vi khuẩn lactic được kích thích bởi các điều kiện căng thẳng và gây sốc môi trường khác nhau như một phản ứng bảo vệ tế bào, cũng có thể tăng cường sự hình thành màng sinh học xung quanh tế bào [7]. EPS của vi khuẩn lactic thể hiện các hoạt tính sinh học đặc trưng như khả năng chống oxy hóa, kháng vi-rút, chống ung thư, chống viêm và điều hòa miễn dịch [8]. Với tiềm năng prebiotic của EPS, nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng của khẩu phần ăn chứa các loại EPS được sản xuất bởi vi khuẩn lactic dưới các điều kiện sốc môi trường khác nhau nhằm kích thích miễn dịch đối với bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra ở tôm Sú.

*Tác giả liên hệ: Email: truongtiencong68@gmail.com

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị EPS của vi khuẩn

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* VAL6 và *Bifidobacterium bifidum* VAR2 được nuôi cấy trong môi trường de Man, Rogosa và Sharpe (MRS broth) dưới các điều kiện sốc nhiệt và tăng nồng độ CO₂. Trong mỗi điều kiện, EPS được chiết xuất theo phương pháp được mô tả bởi N. Salazar và cs (2009) [9] và H.T. Nguyen và cs (2014) [10]. Kết quả 4 loại EPS đã được thu thập từ các điều kiện sốc môi trường được trình bày ở bảng 1. Hai mẫu EPS thương mại được sử dụng để so sánh là 1,3-β glucan (Sigma-Aldrich) và Immuno-LP20 (Japan), được đặt tên là Glucan và LP20.

Bảng 1. EPS sản xuất từ các điều kiện khác nhau.

Vi khuẩn	Điều kiện stress kích thích	Loại EPS
<i>L. plantarum</i>	42°C, 3 giờ	EPS <i>L. plantarum</i> temperature (EPS LPn)
<i>L. plantarum</i>	CO ₂ , 24 giờ	EPS <i>L. plantarum</i> CO ₂ (EPS LPc)
<i>B. bifidum</i>	42°C, 3 giờ	EPS <i>B. bifidum</i> temperature (EPS BFn)
<i>B. bifidum</i>	CO ₂ , 24 giờ	EPS <i>B. bifidum</i> CO ₂ (EPS BFc)

2.2. Chuẩn bị thức ăn thí nghiệm

Bổ sung lần lượt 4 g BFc, BFn, LPc, LPn, Glucan, LP 20 trong 1 kg thức ăn ban đầu (thành phần: 40% đậm, 4% chất béo, 11% độ ẩm, 13% tro, 3% xơ thô). Nghiền nát và trộn đều để được hỗn hợp thức ăn tôm có bổ sung 0,4% prebiotic.

Effect of extracellular macromolecules from lactic acid bacteria on the immune response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Tien Cong Truong^{1*}, Minh Chon Nguyen¹,
Huu Thanh Nguyen², Phu Tho Nguyen²,
Thi Lan Trinh², Huu Yen Nhi Nguyen²,
Thi Thuy Hang Nguyen²

¹Institute of Biotechnology Research and Development, Can Tho University,
Area II, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

²An Giang University, Vietnam National University, Ho Chi Minh City,
18 Ung Van Kiem Street, Dong Xuyen Ward, Long Xuyen City, An Giang Province, Vietnam

Received 25 October 2021; revised 7 December 2021; accepted 10 December 2021

Abstract:

Extracellular polymeric substances (EPS) are known as prebiotic-like compounds that promote the growth of beneficial bacteria in the intestinal tract of humans and animals. To demonstrate the prebiotic potential of EPSs produced from lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum*, this study demonstrated the influence of these bacteria on the immune response in shrimp to infection with pathogenic bacteria. *Vibrio parahaemolyticus* disease. The results showed that the diet supplemented with different types of EPS stimulated immunity of black tiger shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease, also known as early mortality syndrome in shrimp caused by *Vibrio parahaemolyticus*. The addition of EPS to shrimp feed significantly increased total white blood cell count, respiratory burst activity, phenoloxidase and superoxide dismutase activity. The study results show that EPS produced by lactic acid bacteria shows potential as a prebiotic, which can become an alternative to the use of antibiotics in shrimp farming to inhibit the growth of pathogens.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, Black tiger shrimp, lactic acid, *Lactobacillus plantarum*, prebiotic, *Vibrio parahaemolyticus*.

Classification number: 4.5

2.3. Bố trí thí nghiệm xác định các chỉ tiêu miễn dịch của tôm Sú

Tôm Sú thử nghiệm có trọng lượng trung bình $5,45 \pm 0,02$ g được thu mua từ các trại sản xuất giống ở Kiên Giang, Việt Nam. Tôm được thích nghi và cho ăn với khẩu phần cơ bản 2 lần/ngày trong 7 ngày trong bể nuôi composite ở điều kiện phòng thí nghiệm (độ mặn là 25‰ và nhiệt độ là $27 \pm 2^\circ\text{C}$). Sau khi thích nghi, tôm được bố trí ngẫu nhiên vào 24 bể nuôi (500 l, diện tích đáy tròn 1 m²) với mật số ban đầu 30 con/bể. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 8 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại

3 lần. Các thí nghiệm cho ăn bao gồm đối chứng âm (khẩu phần cơ bản và không cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh), đối chứng dương (khẩu phần cơ bản và được cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh), nhóm khẩu phần bổ sung Glucan (khẩu phần cơ bản có bổ sung 1,3-β glucan với lượng 3 g/kg thức ăn và được cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh), nhóm khẩu phần bổ sung LP20 (khẩu phần cơ bản có bổ sung LP20 với lượng 1 g/kg thức ăn và được cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh) và 4 nhóm khẩu phần bổ sung EPS (khẩu phần cơ bản được bổ sung LPn, LPc, BFn, BFc với lượng 4 g/kg thức ăn và được cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh).

Trong quá trình thử nghiệm, tôm được cho ăn với khẩu phần thí nghiệm 5-6% trọng lượng cơ thể, 5 lần mỗi ngày vào lúc 7, 10, 13, 17 và 21 giờ. Nhiệt độ nước duy trì ở $29 \pm 1^\circ\text{C}$, độ mặn là $25 \pm 0,5$ ‰, hàm lượng NH_4^+ là $0,05 \pm 0,005$ mg/l và độ pH là $8,0 \pm 0,2$.

2.4. Cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*

Cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* được thực hiện sau 2 tuần thử nghiệm cho ăn. *V. parahaemolyticus* được nuôi cấy qua đêm ở 28°C trong môi trường Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS broth). Vi khuẩn được định lượng bằng cách trải trên đĩa thạch chứa môi trường TCBS, sau đó dịch được nuôi cấy đến mật số 10^7 CFU/ml. Quá trình cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* được thực hiện bằng cách bổ sung trực tiếp vi khuẩn vào bể nuôi tôm ở mật số $5,0 \times 10^4$ CFU/ml, bể nuôi được lấy đi thức ăn thừa và nước được làm sạch phân mỗi ngày. Nhóm nghiên cứu đã khảo sát các bể nuôi thực nghiệm được bổ sung một lượng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tương ứng với các nồng độ 5×10^3 , 5×10^4 và 5×10^5 CFU/ml, quan sát, ghi nhận lượng tôm Sú chết theo thời gian. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở nồng độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây cảm nhiễm cao 5×10^5 CFU/ml lượng tôm Sú chết rất nhanh và chết hết trong 24 giờ sau khi gây cảm nhiễm, tỷ lệ tôm còn sống giảm dần và bằng 0 sau 24 giờ gây cảm nhiễm. Ngược lại, ở nồng độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây cảm nhiễm là 5×10^3 CFU/ml tỷ lệ tôm Sú còn cao và duy trì ở mức 100% sau 16 giờ đầu, sau đó tỷ lệ sống có giảm và duy trì được tỷ lệ tôm còn sống ở mức 70%. Trong khi đó, nồng độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây cảm nhiễm là 5×10^4 CFU/ml làm tỷ lệ tôm sống giảm còn 20% sau 60 giờ gây cảm nhiễm. Qua đó cho thấy, *V. parahaemolyticus* là chủng có khả năng gây bệnh cho tôm ở các mật số cảm nhiễm khác nhau sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ sống và thời gian duy trì số lượng sống sót làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.5. Phân tích miễn dịch của tôm

Để tiến hành phân tích miễn dịch của tôm, ở mỗi thí nghiệm tiến hành thu 3 con/bể/nghiệm thức. Các thông số miễn dịch của tôm được xác định trước khi gây nhiễm và ở 1, 3, 6 và 9 ngày sau khi cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*. Tổng số bạch cầu được đếm theo phương pháp được mô tả bởi C.H. Chiu và cs (2007) [11].

Hoạt tính PO được xác định dựa theo phương pháp của J. Hernández-López và cs (1996) [12] sử dụng L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) với sự có mặt của cacodylate.

Hoạt tính suy hô hấp cấp (RES - respiratory burst) được xác định bằng cách khử nitroblue tetrazolium (NBT) thành formazan, như một biện pháp tạo thành anion superoxide [13].

Hoạt tính superoxide dismutase (SOD) được xác định dựa theo phương pháp của C. Beauchamp và cs (1971) [14] sử dụng nitroblue tetrazolium (NBT) với sự có mặt của riboflavin.

2.6. Phương pháp phân tích thống kê

Sử dụng Excel để nhập, lưu trữ số liệu và sử dụng phần mềm Minitab 16 để thống kê so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phép thử Tukey với độ tin cậy 95%.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của EPS lên tổng số tế bào bạch cầu trong máu của tôm Sú

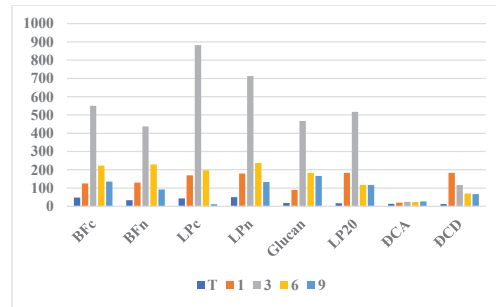
Các chất kích thích miễn dịch như β -glucan và các prebiotic có khả năng kích thích quá trình melanin hóa và quá trình thực bào thông qua sự nhận biết bởi các protein đặc biệt như LGBP (lipopolysaccharide và β -1,3-glucan-binding protein) và β GBP (β -glucan-binding protein) trên tế bào bạch cầu. Do đó, nghiên cứu đã phân tích tổng số tế bào bạch cầu trong máu của tôm và kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của EPS lên tổng số bạch cầu trước và sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Nghiệm thức	Thời gian (ngày)				
	T	1	3	6	9
BFc	47,50 ^a	125,00 ^a	550,00 ^b	222,50 ^a	135,00 ^a
BFn	32,92 ^a	129,58 ^a	437,50 ^b	229,17 ^a	91,67 ^a
LPc	42,92 ^a	169,17 ^a	881,67 ^a	197,50 ^a	105,83 ^a
LPn	50,00 ^a	179,17 ^a	713,33 ^{ab}	236,67 ^a	132,50 ^a
Glucan	18,33 ^b	90,00 ^b	466,67 ^b	183,33 ^a	166,67 ^a
LP20	16,67 ^b	183,33 ^a	516,67 ^b	116,67 ^a	116,67 ^a
ĐCA	13,67 ^c	20,00 ^c	25,00 ^d	23,33 ^a	26,67 ^c
ĐCD	12,00 ^c	183,33 ^a	116,67 ^c	70,00 ^b	66,67 ^b

T: trước khi cảm nhiễm; giá trị trung bình với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo phép thử Tukey. Đơn vị bảng: 10^3 tế bào/ml.

Theo kết quả ở bảng 2, trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*, tôm Sú ở các nghiệm thức bổ sung EPS có tổng số tế bào bạch cầu dao động trong khoảng $32,92-50,00 \times 10^3$ tế bào/ml, khác biệt không có ý nghĩa so với các nghiệm thức bổ sung prebiotic thương mại và đối chứng. Đáng chú ý, ở nghiệm thức bổ sung LPc và LPn (EPS được sản xuất bởi *L. plantarum*) có tổng số bạch cầu cao nhất (đạt $713,33-881,67 \times 10^3$ tế bào/ml) và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$) (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của EPS lên tổng số bạch cầu của tôm Sú.

3.2. Ảnh hưởng của EPS lên hoạt tính PO trong máu của tôm Sú

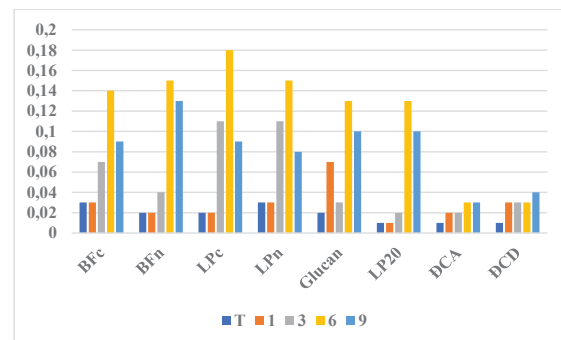
Ảnh hưởng của EPS lên hoạt tính PO trong máu của tôm Sú được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của EPS đến hoạt tính PO (490 nm) của tôm Sú trước và sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Nghiệm thức	Thời gian (ngày)				
	T	1	3	6	9
BFc	0,03 ^a	0,03 ^{ab}	0,07 ^a	0,14 ^a	0,09 ^a
BFn	0,02 ^{ab}	0,02 ^b	0,04 ^{ab}	0,15 ^a	0,13 ^a
LPc	0,02 ^{ab}	0,02 ^{ab}	0,11 ^a	0,18 ^a	0,09 ^a
LPn	0,03 ^a	0,03 ^{ab}	0,11 ^a	0,15 ^a	0,08 ^a
Glucan	0,02 ^{ab}	0,07 ^a	0,03 ^b	0,13 ^a	0,10 ^a
LP20	0,01 ^b	0,01 ^b	0,02 ^b	0,13 ^a	0,10 ^a
ĐCA	0,01 ^b	0,02 ^{ab}	0,02 ^b	0,03 ^b	0,03 ^b
ĐCD	0,01 ^b	0,03 ^{ab}	0,03 ^b	0,03 ^b	0,04 ^b

T: trước khi cảm nhiễm; trong cùng một cột, giá trị trung bình với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Đánh giá ảnh hưởng của khẩu phần chứa EPS lên hoạt tính PO cho thấy, khẩu phần ăn chứa EPS có thể kích thích làm tăng hoạt tính PO của máu tôm Sú và kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$). Hoạt tính PO sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* đạt cao nhất ở nhóm bổ sung EPS được sản xuất bởi *L. plantarum* (LPc và LPn). Tuy nhiên, không giống như tổng số tế bào bạch cầu, kết quả ghi nhận hoạt tính PO được tăng cường mạnh mẽ vào ngày thứ 6 và giảm vào ngày thứ 9 sau khi cảm nhiễm (bảng 3, hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của prebiotic đến hoạt tính PO của tôm Sú.

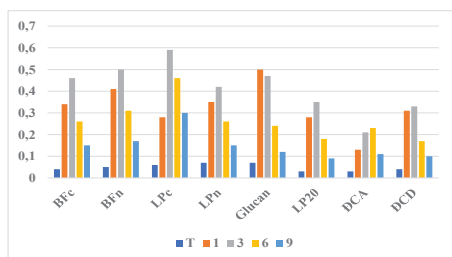
3.3. Ảnh hưởng của EPS lên hoạt tính RES trong máu của tôm Sú

Bảng 4. Ảnh hưởng của EPS đến hoạt tính RES của tôm sú trước và sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Thử nghiệm	Thời gian (ngày)				
	T	1	3	6	9
BFC	0,04 ^a	0,34 ^a	0,46 ^a	0,26 ^b	0,15 ^b
BFn	0,05 ^a	0,41 ^a	0,50 ^a	0,31 ^{ab}	0,17 ^b
LPc	0,06 ^a	0,28 ^a	0,59 ^a	0,46 ^a	0,30 ^a
LPn	0,07 ^a	0,35 ^a	0,42 ^a	0,26 ^b	0,15 ^b
Glucan	0,07 ^a	0,50 ^a	0,47 ^a	0,24 ^b	0,12 ^b
LP20	0,03 ^a	0,28 ^a	0,35 ^b	0,18 ^b	0,09 ^b
DCA	0,03 ^a	0,13 ^b	0,21 ^c	0,23 ^b	0,11 ^b
ĐCD	0,04 ^a	0,31 ^a	0,33 ^b	0,17 ^b	0,10 ^b

T: trước khi cảm nhiễm; giá trị trung bình với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả bảng 4 cho thấy, hoạt tính RES thay đổi theo chiều hướng tăng dần từ trước và sau cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*. Đến ngày thứ 3, hoạt tính RES đạt cao nhất ở nhóm bổ sung EPS được sản xuất bởi *L. plantarum* (LPn và LPc) từ 0,42 đến 0,59. Đến ngày thứ 6 và thứ 9 thì giá trị trung bình hoạt tính RES của thí nghiệm LPc khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các thí nghiệm còn lại và các đối chứng ($p < 0,05$) (hình 3).



Hình 3. Ảnh hưởng của probiotic đến hoạt tính RES của tôm Sú.

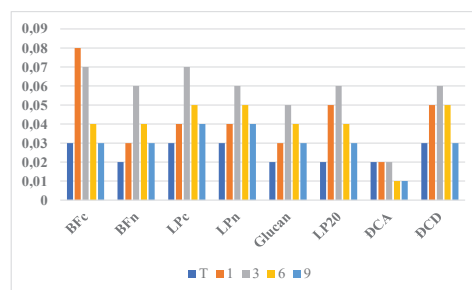
3.4. Ảnh hưởng của EPS lên hoạt tính SOD trong máu của tôm Sú

Bảng 5. Ảnh hưởng của probiotic đến hoạt tính SOD của tôm Sú trước và sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Thử nghiệm	Thời gian (ngày)				
	T	1	3	6	9
BFC	0,03 ^a	0,08 ^a	0,07 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a
BFn	0,02 ^a	0,03 ^a	0,06 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a
LPc	0,03 ^a	0,04 ^a	0,07 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a
LPn	0,03 ^a	0,04 ^a	0,06 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a
Glucan	0,02 ^a	0,03 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a
LP20	0,02 ^a	0,05 ^a	0,06 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a
DCA	0,02 ^a	0,02 ^b	0,02 ^b	0,01 ^b	0,01 ^b
ĐCD	0,03 ^a	0,05 ^a	0,06 ^a	0,05 ^a	0,03 ^a

T: trước khi cảm nhiễm; giá trị trung bình với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

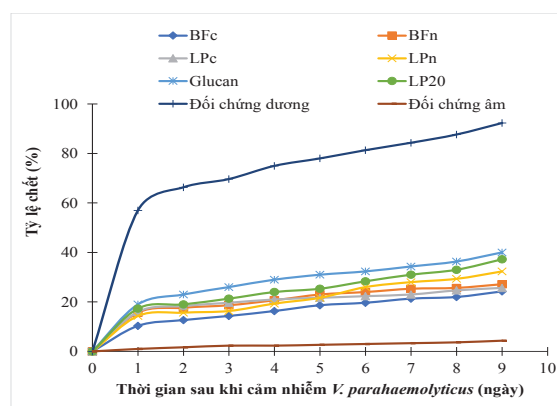
Kết quả bảng 5 và hình 4 cho thấy, hoạt tính SOD cũng có xu hướng tăng sau 3 ngày cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh, sau đó giảm vào ngày thứ 6 và 9. Nhóm khẩu phần bổ sung EPS từ LAB có hoạt tính SOD dao động 0,06-0,07, cao hơn so với sản phẩm thương mại và nhóm đối chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 4. Ảnh hưởng của probiotic đến hoạt tính SOD của tôm Sú.

3.5. Tỷ lệ chết của tôm Sú

Theo dõi tỷ lệ chết của tôm sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* cho thấy, việc áp dụng chế độ ăn có bổ sung LPn, LPc, BFn, BFC, Glucan và LP20 đã làm giảm đáng kể ($p < 0,05$) tỷ lệ chết của tôm so với đối chứng. Sau 9 ngày cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*, tỷ lệ chết tích lũy ở các nhóm LPn, LPc, BFn và BFC dao động từ 24 đến 32%. Tỷ lệ chết lần lượt là 37 và 40% ở các thí nghiệm bổ sung LP20 và Glucan. Trong khi đó, tỷ lệ chết của đối chứng dương là 92,3% (hình 5).



Hình 5. Tỷ lệ chết của tôm Sú sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

4. Bàn luận

Tăng tổng số bạch cầu giúp tăng cường khả năng miễn dịch ở động vật giáp xác. Bạch cầu là nhân tố chính gây ra các phản ứng miễn dịch tế bào (nhận biết, thực bào và melanin hóa) ở tôm [15]. Giảm và tăng tổng số bạch cầu sau khi nhiễm vi khuẩn có thể xảy ra nhanh chóng do nỗ lực bảo vệ của cơ thể. Thực tế kết quả nghiên cứu hiện tại cũng đã chứng minh tổng số tế bào bạch cầu tăng mạnh vào ngày thứ 3 sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* nhưng sau đó lại giảm vào ngày thứ 6 và 9.

Hoạt tính RES có liên quan đến hoạt động thực bào và chúng được theo dõi để xác định mức độ bảo vệ của cơ thể liên quan đến hoạt động của anion superoxide (O_2^-), được đặc trưng bởi khả năng tế bào máu giảm NBT (nitrobluetetrazolium). Kết quả nghiên cứu đã chứng minh khẩu phần ăn chứa EPS có thể làm tăng hoạt tính RES trong máu của tôm Sú.

PO là một enzyme của cơ chế bảo vệ của động vật giáp xác, là tác nhân dẫn đến sự melamin hoá các tế bào lạ để làm bất hoạt chúng và ngăn chặn sự lây lan của chúng khắp cơ thể. Sự gia tăng hoạt động PO trong các nghiệm thức bổ sung EPS càng khẳng định tác dụng có lợi của EPS từ vi khuẩn lactic đối với hệ thống miễn dịch của tôm.

SOD là một trong những enzyme bảo vệ chống oxy hóa chính được tạo ra để phản ứng với stress oxy hóa [16]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, mức độ SOD trong các nhóm tôm thí nghiệm đã tăng lên không đáng kể so với nhóm đối chứng trước và sau thí nghiệm cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*. Kết quả này cho thấy, khả năng kích thích hoạt tính SOD phụ thuộc vào đặc điểm polysaccharide được sử dụng.

Tỷ lệ chết của tôm Sú tích lũy sau khi cảm nhiễm mầm bệnh phản ánh trực tiếp tình trạng sức khỏe của tôm và hiệu suất phản ứng miễn dịch. *V. parahaemolyticus* có thể gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, hay còn gọi là hội chứng chết sớm ở tôm [17]. Trong nghiên cứu này, sau khi gây nhiễm với *V. parahaemolyticus*, tỷ lệ chết của tôm Sú được cho ăn EPS thấp hơn đáng kể so với đối chứng nhờ bổ sung EPS trong khẩu phần ăn.

Trong nghiên cứu này, EPS được sản xuất bởi vi khuẩn lactic đã được chứng minh là có thể kích thích hoặc điều chỉnh nhanh chóng các đáp ứng miễn dịch và điều này cho thấy rằng, EPS sản xuất từ vi khuẩn lactic có khả năng miễn dịch giúp tôm Sú chống lại các bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra.

5. Kết luận

2 loại EPS là LPn (được sản xuất bởi vi khuẩn lactic bằng cách gây stress nhiệt 42°C, 3 giờ) và LPc (được sản xuất bởi vi khuẩn lactic bằng cách gây stress CO_2 , 24 giờ) có khả năng tăng cường miễn dịch của tôm Sú chống lại *V. parahaemolyticus*. Trong đó, khẩu phần ăn bổ sung 2 loại EPS được sản xuất bởi vi khuẩn *L. plantarum* là LPn và LPc giúp kích thích mạnh khả năng miễn dịch ở tôm Sú. Các thông số miễn dịch như: tổng số bạch cầu, hoạt tính PO_3 , RES và SOD của LPn và LPc cho kết quả tương tự các sản phẩm đã được sản xuất thương mại như Glucan và LP20. Khả năng kích thích miễn dịch của tôm Sú bởi EPS làm giảm đáng kể tỷ lệ chết của tôm sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Những kết quả này cho thấy, EPS sản xuất từ vi khuẩn lactic khi được bổ sung vào thức ăn có vai trò là chất kích thích miễn dịch giúp tôm kháng lại bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] G. Bardera, N. Usman, M. Owen, et al. (2018), "The importance of behaviour in improving the production of shrimp in aquaculture", *Reviews in Aquaculture*, **11**(4), pp.1104-1132, DOI: 10.1111/raq.12282.

[2] D. Hou, Z. Huang, S. Zeng, et al. (2018), "Intestinal bacterial signatures of white feces syndrome in shrimp", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**(8), pp.3701-3709, DOI: 10.1007/s00253-018-8855-2.

[3] P. Paul, S.K. Ramraj, Y. Neelakandan, et al. (2011), "Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity *in vitro*", *Bioresource Technology*, **102**(7), pp.4827-4833, DOI: 10.1016/j.biortech.2010.12.118.

[4] S. Sestito, E. D'Auria, M.E. Baldassarre, et al. (2020), "The role of prebiotics and probiotics in prevention of allergic diseases in infants", *Frontiers in Pediatrics*, **8**, DOI: 10.3389/fped.2020.583946.

[5] A. Nawaz, A. Javaid, S. Irshad, et al. (2018), "The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals", *Fish & Shellfish Immunology*, **76**, pp.272-278, DOI: 10.1016/j.fsi.2018.03.004.

[6] S. Grosu-Tudor, M. Zamfir, R. Meulen, et al. (2013), "Prebiotic potential of some exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria", *Romanian Biotechnological Letters*, **18**(5), pp.8666-8676.

[7] D. Amund, L. Ouoba, J. Sutherland, et al. (2014), "Assessing the effects of exposure to environmental stress on some functional properties of *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis", *Beneficial Microbes*, **5**(4), pp.461-469, DOI: 10.3920/BM2013.0099.

[8] K. Madhuri, K.V. Prabhakar (2014), "Microbial exopolysaccharides: Biosynthesis and potential applications", *Oriental Journal of Chemistry*, **30**(3), pp.1401-1410, DOI: 10.13005/ojc/300362.

[9] N. Salazar, P. Ruas-Madiedo, S. Kolida, et al. (2009), "Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures", *International Journal of Food Microbiology*, **135**(3), pp.260-267, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.017.

[10] H.T. Nguyen, H. Razafindralambo, C. Blecker, et al. (2014), "Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying", *Biochemical Engineering Journal*, **88**, pp.85-94, DOI: 10.1016/j.bej.2014.04.005.

[11] C.H. Chiu, Y.K. Guu, C.H. Liu, et al. (2007), "Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*", *Fish Shellfish Immunol.*, **23**(2), pp.364-377, DOI: 10.1016/j.fsi.2006.11.010.

[12] J. Hernández-López, T. Gollas-Galván, F. Vargas-Albore (1996), "Activation of the phenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **113**(1), pp.61-66, DOI: 10.1016/0742-8413(95)02033-0.

[13] K.L. Bell, V.J. Smith (1993), "In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.)", *Developmental & Comparative Immunology*, **17**(3), pp.211-219, DOI: 10.1016/0145-305X(93)90040-W.

[14] C. Beauchamp, I. Fridovich (1971), "Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels", *Analytical Biochemistry*, **44**(1), pp.276-287, DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.

[15] E. Bachère, Y. Gueguen, M. Gonzalez, et al. (2004), "Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*", *Immunological Reviews*, **198**(1), pp.149-168, DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x.

[16] C.H. Liu, S.P. Yeh, C.M. Kuo, et al. (2006), "The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: Activity and gene transcription", *Fish & Shellfish Immunology*, **21**(4), pp.442-452, DOI: 10.1016/j.fsi.2006.02.003.

[17] U. Khimmakthong, P. Sukkarun (2017), "The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology", *Microbial Pathogenesis*, **113**, pp.107-112, DOI: 10.1016/j.micpath.2017.10.028.

Xác định giới tính bằng chỉ thị phân tử và vi nhân giống cây Kiwi vàng (*Actinidia chinensis*)

Nguyễn Thị Mỹ Hạnh^{1,2,3}, Hoàng Thanh Tùng¹, Hoàng Đức Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Vũ Quốc Luận¹, Huỳnh Văn Biết⁴, Huỳnh Hữu Đức⁵, Hoàng Thị Như Phương⁶, Bùi Văn Lệ⁷, Dương Tấn Nhựt^{1*}

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

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Cao đẳng nghề Đà Lạt, 109 Yersin, phường 10, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

⁴Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁵Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, số 2374 quốc lộ 1, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁶Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phù Đổng Thiên Vương, phường 8, TP Đà Lạt, Việt Nam

⁷Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/2/2022; ngày chuyển phản biện 2/3/2022; ngày nhận phản biện 28/3/2022; ngày chấp nhận đăng 31/3/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, chỉ thị phân tử liên kết giới tính được sử dụng để xác định giới tính của 8 mẫu cây Kiwi. Ngoài ra, mẫu lá đã xác định giới tính được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu cho quá trình vi nhân giống thông qua quá trình cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi và tăng sinh cụm chồi. Kết quả ghi nhận được cho thấy, phương pháp xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử trên nhiễm sắc thể Y được khuếch đại bằng cặp primer SmY1_F/R đã nhận diện thành công các mẫu Kiwi đực của loài Kiwi vàng (*Actinidia chinensis*). Ngoài ra, quá trình khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi là tối ưu khi mẫu lá được khử trùng với 200 ppm dung dịch nano bạc, trong khi đó, môi trường nuôi cấy bổ sung 20% nước dừa cho hiệu quả tăng sinh cụm chồi tốt nhất.

Từ khóa: giới tính, Kiwi vàng, nano bạc, tăng sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Kiwi vàng là một loại cây ăn quả có giá trị kinh tế cao. Quả Kiwi có vị hơi chua và ngọt thanh, là nguồn cung cấp vitamin và chất xơ dồi dào. Loài quả này cũng chứa nhiều kali, vitamin E và đặc biệt là flavonoid. Những chất dinh dưỡng này mang đến sức khỏe dẻo dai cho con người, chống lại các bệnh về tim mạch, ung thư đường ruột... Kiwi được xem là loại cây ăn quả thành công nhất trong thế kỷ XX vì nó đã được thuần hóa trong ít nhất một thế kỷ [1]. Ngoài ra, các nghiên cứu về phân loại, hệ thống, phân bố địa lý, sự đa dạng di truyền... cũng đã được thực hiện [2].

Nhân giống cây Kiwi đã được cải tiến liên tục về phương pháp và kỹ thuật nhằm đáp ứng nhu cầu về cây trồng chất lượng cao. Hiện nay, Kiwi được trồng từ hạt, cây ghép và cây *in vitro*. Việc trồng từ cây gốc ghép có ưu điểm là cho năng suất cao hơn vì đã ổn định về mặt di truyền [3]. Tuy nhiên, các loài *Actinidia* sp. hiện tại tạo ra những thách thức đối với việc nghiên cứu và lai tạo, khi tất cả các loài đã biết trong chi đều là đơn tính. Cây cái mang hoa có dạng lưỡng tính nhưng chỉ tạo ra các hạt phấn trống, trong khi cây đực có hoa đơn tính với nhiều nhị hoa bao quanh nhụy một cách thô sơ, sự phát triển bị kìm hãm trước khi kéo dài kiểu dáng hoặc bắt đầu phóng noãn. Giới tính được xác định bằng nhiễm sắc thể (X)₄XX ở cây cái và (X)₄XY ở cây đực [3].

Nhiễm sắc thể Y quyết định giới tính đực của cây, không phụ thuộc vào số lượng nhiễm sắc thể X và thể bội [4]. Các đề xuất về trình tự đặc hiệu X hoặc Y giả định trong bộ gen gợi ý rằng, một số yếu tố di truyền nhiễm sắc thể thường có thể ảnh hưởng đến việc xác định giới tính [5, 6]. Gần đây, gen mã hóa tín hiệu cytokinin *Shy Girl* (*SyGI*), nằm trên nhiễm sắc thể Y được phát hiện là ngăn chặn sự phát triển của các cơ quan hoa cái, dẫn đến sự phát triển hoa đực [7]. Một gen được đề xuất thứ hai là *Friendly Boy* (*FrBy*) cũng nằm trên nhiễm sắc thể Y, hoạt động độc lập với *SyGI* và sự biểu hiện của nó ở cây Kiwi dẫn đến sự phát triển cây đơn tính [7]. Ngoài ra, một số trình tự như *SmX*, *SmY*, *SmY1* và *SmY2* đã được sử dụng để xác định giới tính một số loài Kiwi, kết quả ghi nhận được cho thấy, *SmY1* đã xác định được giới tính đực cây Kiwi với độ chính xác lên tới 95% [8].

Giai đoạn sinh trưởng của cây Kiwi kéo dài 4-8 năm, do đó việc xác định những cây cái mang trái ở giai đoạn đầu của quá trình sinh trưởng là rất quan trọng đối với các nhà lai tạo [9]. Vì lý do này, ngoài các chỉ thị hình thái và sinh hóa, chỉ thị phân tử rất hữu ích để xác định cây cái và cây đực ở giai đoạn phát triển ban đầu. Mục tiêu chính của nghiên cứu này là phát triển một phương pháp để chọn lọc hiệu quả giới tính cây Kiwi bằng cách sử dụng các chỉ thị phân tử liên kết giới tính. Để đạt được mục tiêu này, chúng tôi đã thử nghiệm các chỉ thị liên kết giới tính phân tử để

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

Sex determination by molecular markers and micropropagation of *Actinidia chinensis*

Thi My Hanh Nguyen^{1,2,3}, Thanh Tung Hoang¹,
Dac Khai Hoang¹, Manh Cuong Do¹,
Thi Nhu Mai Nguyen¹, Quoc Luan Vu¹,
Van Biet Huynh⁴, Huu Duc Huynh⁵,
Thi Nhu Phuong Hoang⁶,
Van Le Bui⁷, Tan Nhut Duong^{1*}

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

²Graduate University of Science and Technology, VAST,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Dalat Vocational Training College, 109 Yersin Street, Ward 10, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

⁴Nong Lam University, Ho Chi Minh City,

Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, 2374 National Highway 1, Quarter 2,
Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁶Dalat University, 1 Phu Dong Thien Vuong Street, Ward 8, Da Lat City, Vietnam

⁷University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City,

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

Received 25 February 2022; revised 28 March 2022; accepted 31 March 2022

Abstract:

In this study, a molecular sex-linked marker was used to determine the sex of 8 kiwifruit plants. In addition, leaf explants with sex determination were used as the original plant material for micropropagation via callus induction, shoot regeneration, and shoot cluster proliferation. The results showed that the sex determination method of Kiwi plants based on molecular markers on the Y chromosome amplified by primer pair SmY1_F/R successfully identified male Kiwi explant belonging to *Actinidia chinensis*. In addition, optimal explant surface sterilisation and shoot regeneration were obtained from leaf explants disinfected with 200 ppm silver nanoparticles; meanwhile, the culture medium supplemented with 20% coconut water was suitable for the highest efficiency of shoot cluster proliferation.

Keywords: *Actinidia chinensis*, sex, shoot cluster proliferation, silver nanoparticles.

Classification number: 4.6

xác định giới tính của các mẫu cây Kiwi. Ngoài ra, sau khi xác định được giới tính của cây Kiwi vàng, những mẫu lá sẽ được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu nhằm tạo nguồn mẫu *in vitro* thông qua quá trình cảm ứng mô sẹo, tái sinh chồi và tăng sinh cụm chồi để làm vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguồn mẫu và dung dịch nano bạc

Các mẫu lá của cây Kiwi (*Actinidia* sp.) được lấy ở vị trí cách ngọn 10 cm từ cây ngoài tự nhiên (1 năm tuổi) và các mẫu thương mại trên thị trường ở 2 tỉnh Kon Tum và Lâm Đồng. Mẫu lá của 8 cây Kiwi, bao gồm *A. deliciosa* (AD1), *A. latifolia* (AL2), *A. chinensis* (AC3), *A. chinensis* (AC4), *A. chinensis* (AC5), *A. chinensis* (AC6), *A. chinensis* (AC7) và *A. chinensis* (AC8) được thu nhận và định danh tên khoa học thông qua DNA barcode (*rbcL*, *matK*, ITS) để phân tích đa dạng di truyền và nhận diện các loài Kiwi trước khi được sử dụng làm nguồn mẫu để xác định giới tính (bảng 1). Sau khi xác định giới tính của giống Kiwi *A. chinensis*, mẫu lá được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho nuôi cấy *in vitro*.

Dung dịch nano bạc (AgNPs) được cung cấp bởi Viện Công nghệ Môi trường, VAST. AgNPs có kích thước nhỏ hơn 20 nm được tạo bằng phương pháp khử dung dịch nước sử dụng tiền chất là AgNO_3 , tác nhân khử là NaBH_4 và chất ổn định được sử dụng là chitosan [10]. Nồng độ của AgNPs là 1.000 ppm. Dung dịch AgNPs được pha với nước cất khử trùng thành các nồng độ: 100, 200, 300 và 500 ppm để khử trùng mẫu lá.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường cảm ứng mẫu cây và tái sinh chồi là MS [11] bổ sung 0,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [12]. Môi trường tăng sinh cụm chồi là MS bổ sung 0,01 mg/l TDZ, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [13]. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH=5,8 và được đổ vào bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường; sau đó hấp khử trùng bằng autoclave ở 121°C, 1 atm trong thời gian 20 phút.

2.3. Điều kiện nuôi cấy

Mẫu cây được nuôi cấy trong phòng nuôi cấy được điều chỉnh điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dưới ánh sáng huỳnh quang và độ ẩm trung bình 55-60%.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Xác định giới tính Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử:

- Ly trích DNA tổng số: DNA bộ gen của các mẫu cây Kiwi được ly trích bằng phương pháp sử dụng CTAB và chloroform. Mẫu lá (0,05 g) được nghiền trong dung dịch ly trích (CTAB 20 g/l, NaCl 1,4 mol/l, Tris HCl 0,1 mol/l, Na_2EDTA 0,02 mol/l, polyvinylpyrrolidone (PVP) 1%, để

Bảng 1. Một số đặc tính hình thái của 8 mẫu Kiwi được sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mẫu	Ký hiệu	Cấu trúc lá	Đặc điểm lá		Mép lá	Cuống lá	Mặt phẳng
			Đỉnh lá	Hình dạng			
<i>A. deliciosa</i>	AD1		Nhọn dài	Lá: dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 10-11 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên và bề mặt nhám không có lông		Màu xanh và nhiều lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tim
<i>A. latifolia</i>	AL2		Nhọn dài	Lá: mỏng, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên; bề mặt có ít lông		Màu đỏ sẫm và nhiều lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 3 mm	
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC3		Tù, tròn đều, đối xứng	Lá: dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-12 cm, rộng 9-10 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên và bề mặt nhám không có lông	Không có răng cưa, có ít lông	Màu đỏ sẫm và không có lông Dài: 3 cm Đường kính: 1,5 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tròn
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC4		Nhọn tròn hơi dài, đối xứng	Lá: dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 13-14 cm, rộng 10-12 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên và bề mặt nhám không có lông		Màu xanh và không có lông Dài: 2,7 cm Đường kính: 1,5 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tù
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC5		Nhọn tròn, đối xứng	Lá: dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới có màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp không đối xứng hai bên, bề mặt nhám không có lông.		Màu xanh đậm và không có lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 2 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tròn
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC6		Tù, tròn dài, đối xứng	Lá: mỏng, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên, bề mặt có ít lông.		Màu xanh và không có lông Dài: 1,5 cm Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình quạt
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC7		Nhọn dài	Lá: dày, mặt trên màu xanh sáng và mặt dưới có màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, đối xứng hai bên, bề mặt có ít lông	Có răng cưa	Màu xanh và không có lông Dài: 2 cm Đường kính: 3 mm	Hình oval rộng, có dạng hình tim
<i>A. chinensis</i> thương mại	AC8		Lõm tròn đều, đối xứng	Lá: dày, mặt trên màu xanh đậm và mặt dưới màu xanh xám phủ bởi những sợi lông màu trắng Phiến lá: dài 11-13 cm, rộng 11-14 cm Gân lá: thứ cấp, không đối xứng hai bên, bề mặt ít lông	Không có răng cưa và có ít lông	Màu xanh và không có lông Dài: 2 cm, Đường kính: 3 mm	

phá vỡ tế bào và giải phóng DNA. Sau đó, DNA được tinh sạch 2 lần bằng cách cho hỗn hợp mẫu/CTAB được ủ ở 65°C trong 60 phút, ly tâm hỗn hợp mẫu/CTAB ở 14.000 rpm trong 10 phút. Chuyển dịch nổi sang ống mới, bổ sung 4 µl RNase, ủ ở 37°C trong thời gian 5 phút, bổ sung 500 µl hỗn hợp chloroform:isoamyl alcohol (tỷ lệ 24:1), lắc đều, ly tâm ở tốc độ 14.000 rpm trong 10 phút. Thu dịch nổi (chứa DNA) sang ống mới (khoảng 450-500 µl), bổ sung ethanol tuyệt đối (tỷ lệ 1:1 so với thể tích thu được) và 1/2 thể tích NaCl 5M so với thể tích thu được. Hỗn hợp được ủ trên đá trong 1 giờ, ly tâm ở 13.000 rpm trong 10 phút. Hỗn hợp sau ly tâm được loại bỏ dịch nổi và thu tủa, bổ sung 500 µl ethanol 70% lạnh và đảo ống, ly tâm ở 13.000 rpm trong 5 phút (lặp lại 2 lần), loại bỏ dịch nổi, thu tủa. Để khô kết tủa ở nhiệt độ phòng. Hòa DNA

trong 200 µl nước khử trùng 2 lần. DNA này được sử dụng trực tiếp cho phản ứng PCR.

- Kiểm tra độ tinh sạch DNA: DNA bộ gen của các mẫu Kiwi được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 260 và 280 nm trên máy quang phổ BioDrop™ µLITE (Anh).

- Phương pháp PCR: Phản ứng PCR được thực hiện với cặp primer *SmY1_F* (5'-TCG CAA TTC GTT AGG GAT GAT GCG-3') và *SmY1_R* (5'-CAT AAT CAA CCA TCC ATA AAA ACC AT-3') [14] khuếch đại vùng gen nằm trên nhiễm sắc thể Y có kích thước 770 bp. Thành phần của một phản ứng PCR với tổng thể tích 25 µl bao gồm: 12,5 µl MyTaq Mix (Bioline), 0,5 µl mỗi primer (nồng độ 10 µM), 9,5 µl nước

khử ion và 2 μ l DNA bộ gen. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR là: 94°C trong 4 phút; 35 chu kỳ: 94°C trong 50 giây, 55°C trong 55 giây, 72°C trong 50 giây, 72°C trong 7 phút.

- Điện di sản phẩm PCR và đọc kết quả: sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TAE 0,5X, dưới hiệu điện thế 100 V trong thời gian 30 phút. Gel được nhuộm bằng Gelred và quan sát kết quả dưới đèn UV, chụp hình trên máy chụp gel (GelDoc-It®2315 imager UVP, Mỹ).

Tạo nguồn mẫu in vitro:

- Khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi: mẫu lá được thu nhận từ những cây khỏe mạnh ngoài tự nhiên và rửa dưới vòi nước chảy trong 30 phút. Sau đó, mẫu lá được ngâm trong dung dịch Sunlight (Unilever, TP Hồ Chí Minh) 20% trong 10 phút và rửa lại bằng nước máy nhiều lần, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng trước khi đưa vào tủ cấy. Trong tủ cấy, mẫu lá được rửa với nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 5 phút. Tiếp theo, mẫu được khử trùng sơ bộ bằng ethanol 70% trong 30 giây, rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Sau đó, mẫu lá được khử trùng bằng 1 g/l $HgCl_2$, 10 g/l NaOCl và AgNPs ở các nồng độ khác nhau (100, 200, 300 và 500 ppm) có bổ sung vài giọt Tween-80 trong thời gian 8 phút. Cuối cùng, mẫu được rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng trước khi cắt mẫu và cấy vào môi trường nuôi cấy.

Mẫu lá sau khi khử trùng được cắt thành hình chữ nhật (0,5×1 cm) có chứa gân chính và được cấy lên môi trường cảm ứng mô sẹo. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu nhiễm (%), hoại tử/chết, mẫu sống và cảm ứng mô sẹo (%) được ghi nhận. Những mẫu cấy này tiếp tục được theo dõi đến tuần thứ 8 và thu nhận số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (g) và khối lượng khô (g).

- Tăng sinh cụm chồi: các cụm chồi có nguồn gốc từ mẫu lá được cắt thành các cụm chồi nhỏ chứa 3 chồi/mẫu; sau đó, các cụm chồi được cấy lên môi trường tăng sinh cụm chồi bổ sung các dịch chiết hữu cơ (nước dừa, chuối xanh và khoai tây) với các nồng độ khác nhau (5, 10, 15 và 20%). Sau 8 tuần nuôi cấy, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, khối lượng tươi (g) và hình thái chồi được ghi nhận.

2.5. Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại cấy 15 bình/nghiem thức với 1 bình chứa 1 mẫu cấy. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel® 2010 và SPSS 20.0 với phép thử Duncan ở mức $p < 0,05$ [15].

3. Kết quả và bàn luận

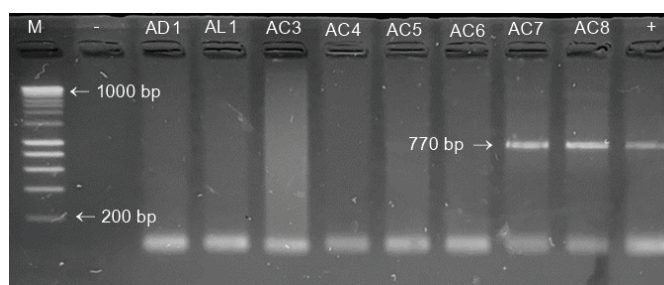
3.1. Xác định giới tính các giống Kiwi

Kết quả kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA bộ gen sau khi ly trích được cho thấy DNA của 8 mẫu Kiwi đều được ly trích thành công (bảng 2). DNA thu được có độ tinh sạch cao (A260/280 nằm trong khoảng 1,8-2,0).

Bảng 2. Kết quả ly trích DNA tổng số.

Mẫu	AD1	AL2	AC3	AC4	AC5	AC6	AC7	AC8
Nồng độ (ng/ μ l)	99,76	51,57	127,8	38,74	36,38	31,20	53,19	41,44
A260/280	2,046	2,017	1,942	1,962	1,877	1,926	1,956	1,933

Kết quả điện di và kiểm tra sản phẩm PCR cho thấy tất cả mẫu cái (AD1, AL1, AC3, AC4, AC5 và AC6) đều không cho băng. Trong khi đó, kết quả khuếch đại đã thành công trên đoạn gen có kích thước 770 bp trên nhiễm sắc thể Y giúp nhận diện 2 mẫu đực là AC7 và AC8 (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di và kiểm tra sản phẩm PCR. M: marker; -: đối chứng âm mẫu nước cất; +: đối chứng dương cây đực chứa nhiễm sắc thể Y.

Nghiên cứu của T. Akagi và cs (2019) [7] đã chỉ ra rằng, nhiễm sắc thể Y ngăn chặn sự phát triển của các cơ quan hoa cái, thúc đẩy sự phát triển hoa đực và biểu hiện của nó ở cây Kiwi dẫn đến sự phát triển cây đơn tính. Vì vậy, việc phát hiện ra nhiễm sắc thể Y nhằm xác định giới tính của cây Kiwi có ý nghĩa rất quan trọng trong công tác nhân giống và bảo tồn nguồn gen. Việc sử dụng cặp mồi *SmY1* để xác định giới tính của cây *A. deliciosa* [16, 17] cho kết quả đáng tin cậy. Do đó, kết quả nghiên cứu này một lần nữa chứng minh hiệu quả của phương pháp này trong việc xác định giới tính đực cây Kiwi vàng. Ngoài ra, cây Kiwi cần 4-8 năm trồng ngoài tự nhiên mới có thể xác định được giới tính là một vấn đề lớn [9]. Vì vậy, chỉ thị phân tử rất hữu ích để xác định giới tính ở giai đoạn phát triển ban đầu.

3.2. Khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi

Kết quả ghi nhận được cho thấy, các chất khử trùng mẫu cây khác nhau (AgNPs, $HgCl_2$ và NaOCl) ảnh hưởng khác nhau lên khả năng khử trùng bề mặt mẫu cây và cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy (bảng 3). Kết quả ghi nhận được cho thấy, AgNPs và các chất khử trùng thông dụng có hiệu quả trong khử trùng bề mặt mẫu lá và cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, nồng độ AgNPs tăng từ 100 đến 500 ppm thì tỷ lệ mẫu nhiễm càng giảm (từ 53,33 giảm xuống 15,56%) và tỷ lệ mẫu hoại tử càng tăng (từ 6,67 tăng lên 60,00%) sau 4 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, những mẫu lá được khử trùng bề mặt với AgNPs, $HgCl_2$ và NaOCl đều cho cảm ứng mô sẹo và tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đạt cao nhất là 51,11%

đối với mẫu lá được khử trùng bề mặt với 200 ppm AgNPs (bảng 3). Quan sát sự sinh trưởng của mẫu cây đến tuần thứ 8 cho thấy, mẫu lá có nguồn gốc khử trùng bằng AgNPs cho khả năng tái sinh chồi cũng như sinh trưởng của chồi tốt hơn so với 2 chất khử trùng còn lại (bảng 4, hình 2A và 2B).

Bảng 3. Ảnh hưởng của các chất khử trùng lên khả năng khử trùng bề mặt mẫu cây và cảm ứng mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy.

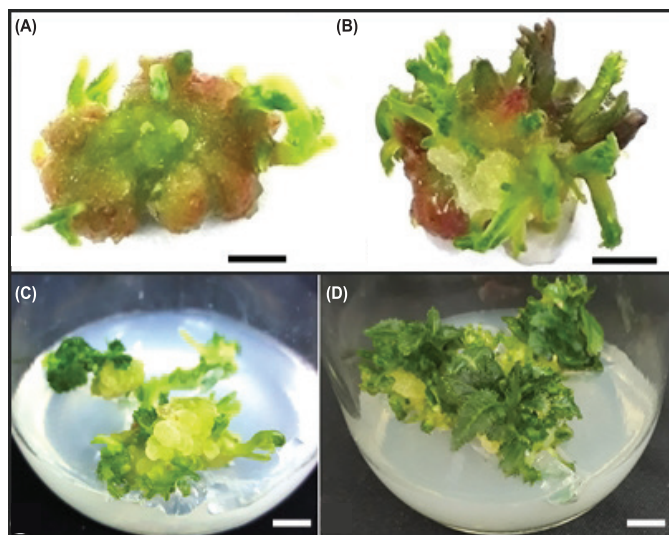
Chất khử trùng	Nồng độ	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu hoại tử (%)	Tỷ lệ mẫu sống và cảm ứng mô sẹo (%)	Hình thái mẫu
AgNPs	100 ppm	53,33 ^a	6,67 ^d	40,00 ^b	Mẫu cây hầu hết bị nhiễm
	200 ppm	35,56 ^b	13,33 ^{cd}	51,11 ^a	Mẫu cây xanh và ít tổn thương
	300 ppm	33,33 ^b	31,11 ^b	35,56 ^b	Mẫu cây chuyển sang màu nâu và bị tổn thương nhiều
	500 ppm	15,56 ^c	60,00 ^a	24,44 ^c	Mẫu cây hầu hết bị hoại tử hoặc chết
HgCl ₂	1 g/l	22,22 ^c	40,00 ^b	37,78 ^b	Mẫu cây hầu hết chuyển sang màu trắng và bị tổn thương
NaOCl	10 g/l	48,89 ^a	17,78 ^c	33,33 ^b	Mẫu cây bị nhiễm nhiều

Ghi chú: những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở $p < 0,05$ theo phép thử Duncan.

Bảng 4. Sự tái sinh chồi từ mẫu cây lá cây Kiwi vàng được khử trùng bằng AgNPs, HgCl₂ và NaOCl sau 8 tuần nuôi cấy.

Nguồn gốc mẫu cây	Số chồi/mẫu	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
HgCl ₂	3,33 ^b	2,33 ^b	0,60 ^b
NaOCl	4,66 ^{ab}	3,02 ^{ab}	0,85 ^{ab}
AgNPs	6,33 ^a	3,82 ^a	1,46 ^a

Ghi chú: những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở $p < 0,05$ theo phép thử Duncan.



Hình 2. Tạo nguồn mẫu in vitro cây Kiwi vàng. (A, B) Tái sinh chồi từ mẫu lá khử trùng bằng HgCl₂ và AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy (thước đo 1 cm); **(C, D)** Tăng sinh cụm chồi trên môi trường không bổ sung dịch chiết hữu cơ và bổ sung 20% nước dừa sau 8 tuần nuôi cấy (thước đo 2 cm).

Khi nghiên cứu về khả năng khử trùng bề mặt mẫu cây của các chất khử trùng, các nhà khoa học thường sử dụng AgNPs, HgCl₂ và NaOCl để khử trùng các loại mẫu cây khác nhau (lá, đốt thân, chồi ngủ...) [18, 19]. Tuy nhiên, những chất khử trùng này thường gây độc, dễ làm tổn thương và ảnh hưởng tới hiệu quả tái sinh của mẫu cây [20]. Trong lĩnh vực sinh học nông nghiệp, đặc biệt là nuôi cấy mô, tế bào và cơ quan thực vật AgNPs được sử dụng như là một chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm gia tăng sinh trưởng, phát triển, tích lũy hoạt chất thứ cấp, khắc phục các hiện tượng bất thường... [21, 22]. Gần đây, AgNPs được sử dụng như là tác nhân khử trùng mẫu cây cây Dầu tây [23], sâm Ngọc Linh [24]. Trong nghiên cứu này, 200 ppm AgNPs không những có vai trò trong khử trùng mẫu cây mà còn có tác dụng ít làm tổn thương mẫu cây như chất khử trùng HgCl₂ và NaOCl. Kết quả của nghiên cứu này một lần nữa chứng minh hiệu quả của AgNPs trong khử trùng bề mặt mẫu cây lá của cây Kiwi và có thể thay thế chất khử trùng truyền thống.

3.3. Tăng sinh cụm chồi

Kết quả ghi nhận được cho thấy, các dịch chiết hữu cơ có hiệu quả lên khả năng tăng sinh cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy (bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của dịch chiết hữu cơ lên khả năng tăng sinh cụm chồi cây Kiwi sau 8 tuần nuôi cấy.

Dịch chiết hữu cơ	Nồng độ (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Khối lượng tươi (g)	Hình thái chồi
Đôi chứng	0	3,05 ^c	2,67 ^b	1,65 ^c	Các chồi nhỏ
	5	2,90 ^c	2,33 ^b	1,83 ^{bc}	Chồi khỏe, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	10	3,27 ^b	3,33 ^{ab}	2,40 ^b	Chồi khỏe, lá thật và lớn được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	15	3,30 ^b	3,33 ^{ab}	2,46 ^b	Chồi khỏe, lá thật và lớn được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
Chuối xanh	20	3,89 ^a	4,33 ^a	3,33 ^a	Chồi nhỏ và không đều, lá nhỏ
	5	2,80 ^d	2,67 ^b	1,59 ^e	Chồi khỏe, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	10	3,02 ^c	4,00 ^a	2,36 ^c	Chồi khỏe, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	15	2,61 ^e	3,33 ^{ab}	2,27 ^{cd}	Chồi nhỏ, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
Khoai tây	20	2,28 ^f	2,00 ^c	1,76 ^{cd}	Chồi nhỏ, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	5	2,27 ^f	2,00 ^c	1,57 ^e	Chồi nhỏ, lá thật và lớn được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	10	2,66 ^{de}	3,33 ^{ab}	2,14 ^b	Chồi nhỏ, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	15	1,94 ^g	2,33 ^b	1,69 ^c	Chồi nhỏ, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng
	20	1,44 ^h	1,67 ^c	1,50 ^c	Chồi nhỏ, lá thật và nhỏ được bao phủ bởi những sợi lông ngắn, màu trắng

Ghi chú: những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở $p < 0,05$ theo phép thử Duncan.

Môi trường nuôi cấy bổ sung 20% nước dừa cho hiệu quả tăng sinh cụm chồi tối ưu hơn các nồng độ nước dừa khác và dịch chiết khoai tây cũng như chuối xanh (bảng 5, hình 2C và 2D). N.T. Cuc và cs (2014) [25] đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ như chuối, khoai tây, nước dừa lên *Paphiopedilum delenatii*, kết quả cho thấy, cả 3 nhóm hợp chất hữu cơ trên đều có tác dụng làm gia tăng số lượng chồi. Trong đó, chuối có tác động mạnh lên quá trình tạo chồi và số chồi đạt cao nhất ở nồng độ 20 g/l (3,8 chồi/mẫu cây). F. Chen (1998) [26] ghi nhận môi trường có chứa

dịch chiết của chuối, cà rốt, khoai tây, nước dừa giúp cây lan *Oncidium* phát triển tốt nhất với chiều cao, số lá, số rễ, chiều dài rễ, trọng lượng tươi và khô cao hơn đáng kể so với đối chứng. M. Islam và cs (2000) [27] báo cáo rằng, chiết xuất khoai tây và chuối chứa niacin và các vitamin khác, trong đó niacin và thiamine giúp tăng cường sự phát triển của chồi và cây con [28].

4. Kết luận

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp xác định giới tính cây Kiwi dựa trên chỉ thị phân tử trên nhiễm sắc thể Y được khuếch đại bằng cặp primer *SmY1_F/R* đã thành công trong nhận diện các mẫu Kiwi đực của giống *A. chinensis*. Ngoài ra, những mẫu lá của giống Kiwi đực sau khi xác định giới tính được sử dụng làm vật liệu cho quá trình vi nhân giống. Kết quả ghi nhận được cho thấy, mẫu lá được khử trùng với 200 ppm AgNPs cho hiệu quả khử trùng bề mặt mẫu cây và tái sinh chồi cao hơn các nồng độ khác của AgNPs, HgCl₂ và NaOCl. Chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 20% nước dừa cho hiệu quả tăng sinh cụm chồi là tối ưu nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D.P. Richardson, J. Ansell, L.N. Drummond (2018), "The nutritional and health attributes of kiwifruit: A review", *European Journal of Nutrition*, **57**(8), pp.2659-2676, DOI: 10.1007/s00394-018-1627-z.

[2] H. Huang (2016), *Kiwifruit: The Genus Actinidia*, Academic Press, 350pp.

[3] L.G. Fraser, G.K. Tsang, P.M. Datson, et al. (2009), "A gene-rich linkage map in a dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex determining chromosomes", *BMC Genomics*, **10**, DOI: 10.1186/1471-2164-10-102.

[4] R. Testolin, G. Cipriani, R. Messina (1999), "Sex control in *Actinidia* is monofactorial and remains so in polyploids", *Sex Determination in Plants*, Garland Science, 1st ed., pp.173-181.

[5] R. Testolin, A.R. Ferguson, H.W. Huang (2016), *The Kiwifruit Genome*, Springer, 269pp.

[6] Q. Zhang, C. Liu, Y. Liu, et al. (2015), "High density interspecific genetic maps of kiwifruit and the identification of sex-specific markers", *DNA Research*, **22**(5), pp.367-375, DOI: 10.1093/dnares/dsv019.

[7] T. Akagi, S.M. Pilkington, E. Varkonyi-Gasic, et al. (2019), "Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit", *Nature Plants*, **5**, pp.801-809, DOI: 10.1038/s41477-019-0489-6.

[8] S. Murakami, H. Katai, S. Yamada, et al. (2015), "The validity of marker-assisted selection using sex linked SCAR markers in kiwifruit (*Actinidia chinensis* cv 'Rainbow Red') seedlings", *Journal of Science and High Technology in Agriculture*, **27**(2), pp.68-74, DOI:10.2525/shita.27.68 (in Japanese).

[9] H. Gustafson (2016), *Marker Assisted Selection of Sex Determination in Kiwiberry (Actinidia Arguta and Actinidia Kolomikta)*, Master's thesis, University of New Hampshire.

[10] H. Chau, B.A. Le, Q.B. Ngo, et al. (2008), "Some results in manufacturing of nano silver and investigation of its application for disinfection", *Advances in Natural Sciences*, **9**, pp.241-248.

[11] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures", *Physiologia Plantarum*, **15**(3), pp.473-497, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

[12] F.A. Akbaş, Ç. Işikalan, S. Namli, et al. (2007), "Micropropagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)", *International Journal of Agriculture and Biology*, **9**(3), pp.489-493.

[13] D.T. Nhut, H.V. Cuong, L.T. Tuyet, et al. (2013), "Organogenesis and asexual propagation of Kiwi plants (*Actinidia deliciosa*) through *in vitro* leaf tissue culture", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **11**(3), pp.496-503 (in Vietnamese).

[14] A. Atak, B. Aydin, K.A. Kahraman (2012), "Sex determination of kiwifruit seedlings with molecular markers", *International Symposium on Biotechnology of Fruit Species*, **1048**, pp.197-203, DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1048.24.

[15] D.B. Duncan (1955), "Multiple range and multiple F test", *Biometrics*, **11**(1), pp.1-42, DOI: 10.2307/3001478.

[16] A. Atak, B. Aydin, K.A. Kahraman (2014), "Sex determination of kiwifruit seedlings with molecular markers", *Acta. Hortic.*, **1048**, pp.197-203.

[17] M.A. Sakellariou, A.G. Mavromatis, S. Adimargono, et al. (2015), "Agronomic, cytogenetic and molecular studies on hermaphroditism and self-compatibility in the Greek kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cultivar 'Tsechelidis'", *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **91**(1), pp.2-13, DOI: 10.1080/14620316.2015.1108542.

[18] I. Mihaljević, K. Dugalić, V. Tomaš, et al. (2013), "In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'Oblačinska' sour cherry", *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, **58**(2), pp.117-126, DOI: 10.2298/JAS1302117M.

[19] H.T. Tung, H.G. Bao, D.M. Cuong, et al. (2021a), "Silver nanoparticles as the sterilant in largescale micropropagation of chrysanthemum", *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **57**(6), pp.897-906, DOI: 10.1007/s11627-021-10163-7.

[20] Y. He, F. Wei, Z. Ma, et al. (2017), "Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Alpinia katsumadai*, and their antioxidant, cytotoxicity and antibacterial activities", *RSC Advances*, **7**(63), pp.39842-39851, DOI: 10.1039/C7RA05286C.

[21] D. Kim, J. Gopal, I. Sivanesan (2017), "Nanomaterials in plant tissue culture: The disclosed and undisclosed", *RSC Advances*, **7**(58), pp.36492-36505, DOI: 10.1039/C7RA07025J.

[22] R. Sreelekshmi, E.A. Siril, S. Muthukrishnan (2022), "Role of biogenic silver nanoparticles on hyperhydricity reversion in *Dianthus chinensis* L. an *in vitro* model culture", *Journal of Plant Growth Regulation*, **41**(1), pp.23-39, DOI: 10.1007/s00344-020-10276-0.

[23] H.T. Tung, T.T. Thuong, D.M. Cuong, et al. (2021b), "Silver nanoparticles improved explant disinfection; *in vitro* growth; runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **145**(2), pp.393-403, DOI: 10.1007/s11240-021-02015-4.

[24] D.M. Cuong, P.C. Du, H.T. Tung, et al. (2021), "Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis* valuable medicinal plant", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **146**(3), pp.577-588, DOI: 10.1007/s11240-021-02095-2.

[25] N.T. Cuc, N.V. Ket, D.T. Nhut, et al. (2014), "Research on the effects of some organic compounds on the growth and development of *Paphiopedilum delenatii* *in vitro*", *Vietnam Journal of Biology*, **36**(1se), pp.250-256 (in Vietnamese).

[26] F. Chen (1998), "Effects of salt strength and organic additives on the *in vitro* growth of protocorm like bodies and plantlets of *Oncidium Gower Ramsey*", *Journal Chinese Society for Horticultural Science*, **44**(4), pp.403-412.

[27] M. Islam, S. Matsui, S. Ichihashi (2000), "Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings", *Lindleyana*, **15**(2), pp.81-88.

[28] J. Arditti, C. Harrison (1977), "Vitamin requirements and metabolism in orchids", *Orchid Biology, Reviews and Perspectives*, Cornell University Press, 1st ed., 6, pp.157-176.

Nghiên cứu xác định gen giới tính *MAT*, năng suất và hàm lượng cordycepin của một số chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Trần Bảo Trâm¹, Nguyễn Thị Mến^{1,2}, Trương Thị Chiên¹, Trần Bình Minh¹,
Thái Hạnh Dung², Trần Văn Tuấn², Nguyễn Quang Huy²

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, khu tập thể 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 9/5/2022; ngày chuyển phản biện 13/5/2022; ngày nhận phản biện 24/6/2022; ngày chấp nhận đăng 28/6/2022

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là một loài nấm dược liệu quý và đang được nuôi trồng với quy mô lớn tại Việt Nam. Tuy nhiên, việc nuôi trồng loài nấm này đang gặp các vấn đề về thoái hóa giống làm giảm năng suất và hàm lượng hoạt chất cordycepin trong quả thể. Hệ thống gen giới tính *MAT* giữ vai trò quan trọng trong việc hình thành quả thể ở nấm *C. militaris*. Các dữ liệu về gen giới tính *MAT* và năng suất, chất lượng của các chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam là cơ sở quan trọng cho việc nghiên cứu và đưa ra các giải pháp khắc phục vấn đề thoái hóa giống. Nghiên cứu này đã phân lập và định danh được 8 chủng nấm *C. militaris* từ các mẫu quả thể nấm được nuôi trồng tại Việt Nam dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA. 8 chủng nấm đã được xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*, cụ thể: 5 chủng nấm (QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02) mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*, 3 chủng nấm (SH03, HL13 và HN01) chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Cả 8 chủng nấm đều có khả năng hình thành quả thể, trong đó chủng *C. militaris* SH03 mang gen giới tính đơn (*MAT1-1-1*) cho năng suất và chất lượng cao nhất (năng suất quả thể tươi trung bình đạt 31 g/hộp, năng suất sinh học đạt 13,77% và hàm lượng cordycepin đạt 12,5 mg/g quả thể khô), có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất.

Từ khóa: Cordycepin, *Cordyceps militaris*, *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, năng suất.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Các loài nấm thuộc chi *Cordyceps* đã được biết đến từ rất lâu như một loại dược liệu quan trọng trong y dược truyền thống của Trung Quốc nói riêng và một số nước châu Á nói chung [1, 2]. Mặc dù hơn 400 loài nấm *Cordyceps* đã được mô tả, nhưng chỉ có khoảng 36 loài đã được nuôi trồng quả thể thành công [3]. Loài nấm được biết đến đầu tiên trong chi nấm này là *C. sinensis*. Tuy nhiên, loài nấm được nuôi trồng thương mại phổ biến hiện nay lại là *C. militaris*. Quả thể loài nấm này thường có màu vàng cam, dễ dàng nuôi cấy nhân tạo và chúng được coi là nguồn thay thế cho nấm *C. sinensis* do có thành phần hóa học và được chất tương tự [4, 5]. Hiện nay, quả thể loài *C. militaris* được nuôi trồng nhân tạo với quy mô công nghiệp ở nhiều nước châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan, Việt Nam... đem lại lợi ích lớn về kinh tế.

Thời gian gần đây, cơ chế phân tử của quá trình hình thành quả thể và thoái hóa giống ở nấm *C. militaris* đang được quan tâm nghiên cứu. Quả thể của nấm *C. militaris* được hình thành theo cơ chế chính là sinh sản hữu tính và được điều hòa bởi hệ thống gen giới tính *MAT*. Liên quan đến hệ thống gen giới tính, những nghiên cứu về sinh học phân tử đã chứng minh các gen giới tính ở *C. militaris* bao gồm *MAT1-1* và *MAT1-2* [6]. Locus giao phối *MAT1-1* bao gồm *MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*, còn ở locus *MAT1-2* thì chỉ có *MAT1-2-1*, trong đó 2 gen *MAT1-1-1*

và *MAT1-2-1* được xác định giữ vai trò quan trọng trong sự hình thành quả thể [7]. Biến dị di truyền dường như phổ biến ở *C. militaris* và có thể có liên quan tới sự mất ổn định hệ thống giao phối thông qua sự tái tổ hợp các gen giới tính nêu trên [8]. Điều này có thể là nguyên nhân dẫn đến thoái hóa giống trong nuôi cấy quả thể quy mô lớn. Vấn đề thoái hóa giống đang gây nhiều khó khăn cho việc sản xuất nấm *C. militaris* quy mô công nghiệp. Sự thoái hóa được biểu hiện là sự giảm năng suất quả thể, thay đổi về hình dạng và kích thước quả thể, cũng như giảm hàm lượng các hoạt chất mong muốn. Sự thoái hóa giống ở nấm *C. militaris* được xác định có liên quan đến nhiều yếu tố, trong đó hệ thống gen giới tính *MAT* được ghi nhận giữ vai trò quan trọng [9, 10].

Ở Việt Nam, việc nuôi trồng nhân tạo *C. militaris* đang khá phát triển với nhiều cơ sở sản xuất cung ứng cho thị trường trong và ngoài nước. Các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc tối ưu điều kiện nuôi trồng, phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe từ nguồn nấm này. Tuy nhiên, việc nuôi trồng nấm *C. militaris* đang phải đối mặt với sự thoái hóa nghiêm trọng của các chủng giống, dẫn đến giảm hoặc mất khả năng hình thành quả thể và làm giảm năng suất. Hơn nữa, vấn đề chất lượng nguồn nấm này tại Việt Nam vẫn chưa được đánh giá chi tiết. Nghiên cứu này tập trung xác định gen giới tính *MAT*, năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin của một số

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

Identification of mating-type (*MAT*) gene, productivity and cordycepin content in medicinal *Cordyceps militaris* strains cultivated in Vietnam

Xuan Tao Vu^{1*}, Bao Tram Tran¹, Thi Men Nguyen^{1,2},
Thi Chien Truong¹, Binh Minh Tran¹,
Hanh Dung Thai², Van Tuan Tran², Quang Huy Nguyen²

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

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

Received 9 May 2022; revised 24 June 2022; accepted 28 June 2022

Abstract:

Cordyceps militaris is a valuable medicinal fungus and has been widely cultivated. However, its frequent degeneration during continuous maintenance in culture leads to a dramatic reduction in productivity and cordycepin content in the fruiting body. Mating-type (*MAT*) genes play an important role in the formation of the fruiting body in *C. militaris*. The data of *MAT* genes, the productivity and quality of *C. militaris* strains being cultivated in Vietnam are the foundations for providing solutions to overcome the problem. In this study, eight strains were isolated and identified based on morphological characteristics and the ITS sequence of rDNA. *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* genes were determined in the 8 isolates, including 5 strains (QN6, HL11, HL12, TN01, and TN02) that possessed both *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* genes and the others (SH03, HL13, and HN01) has only *MAT1-1-1* gene. All identified strains were able to form a fruiting body, especially, the SH03 strain performed the highest productivity and quality (fruiting body yield 31 g/box, biological efficiency 13.77% and cordycepin content 12.5 mg/g dried fruiting body). This fungal strain with a single mating-type gene is a promising candidate for applying to *C. militaris* production.

Keywords: Cordycepin, *Cordyceps militaris*, *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, productivity.

Classification number: 4.6

chúng nấm được liệu *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam làm căn cứ cho các nghiên cứu tiếp theo về việc xây dựng giải pháp công nghệ giúp giải quyết vấn đề hàm lượng hoạt chất và thoái hóa giống ở loài nấm này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu quả thể nấm *C. militaris* được thu thập tại các đơn vị nuôi trồng thương mại nấm *C. militaris* tại Hà Nội, Bắc Ninh, Thái Nguyên và Quảng Ngãi (8 mẫu quả thể được ký hiệu: QN6, SH03, HL11, HL12, HL13, TN01, TN02 và HN01). Các mẫu được giữ nguyên trạng và đựng trong các túi nilon sạch. Sau khi thu thập, mẫu được đưa ngay về phòng thí nghiệm để phân lập các chủng nấm. Các chủng nấm đang được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

Các cặp mồi đặc hiệu dùng cho phản ứng PCR sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê ở bảng 1.

Bảng 1. Các mồi đặc hiệu sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn tham khảo
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	550	[11]
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
MAT1-1-1-F	ATGGAACACAGATCGAGCGACAC	457	[12]
MAT1-1-1-R	ATATACCTTCGCGATCATTGCCAG		
MAT1-2-1-F	TGTTTGT CGCGATGGTTCTGG	368	[12]
MAT1-2-1-R	CCTCTGGAGGTTCTGCATTCCA		

2.2. Phương pháp phân lập chủng nấm *C. militaris* từ mẫu quả thể

Một phần quả thể từ mẫu quả thể nấm thu thập được tách ra và tiến hành khử trùng bề mặt bằng nước cất vô trùng và cồn. Sau khi khử trùng bề mặt, phần quả thể được cắt thành các lát nhỏ và đặt lên bề mặt môi trường PDA (Potatose dextrose agar) có bổ sung kháng sinh kháng khuẩn chloramphenicol với nồng độ 100 µg/ml. Địa môi trường chứa mẫu quả thể được ủ ở 22-25°C trong điều kiện tối hoàn toàn. Sau 3 ngày, từ các lát quả thể xuất hiện hệ sợi nấm màu trắng, hệ sợi nấm tiếp tục được cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA mới để thuần khiết [13].

2.3. Xác nhận các chủng nấm phân lập bằng giải trình tự vùng ITS của rDNA

Các chủng nấm sau khi phân lập được nuôi trong môi trường PDB (lắc 200 vòng/phút ở 22-25°C trong tối), sau 3-4 ngày tiến hành thu hệ sợi nấm sử dụng cho việc tách chiết DNA tổng số. Quy trình tách chiết DNA tổng số từ hệ sợi nấm được thực hiện theo quy trình của nhóm nghiên cứu đã công bố [14]. Mẫu DNA tổng số được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS của rDNA sử dụng cặp mồi đặc hiệu ITS1/ITS4 (bảng 1). Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0,7% sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit tinh sạch của Hãng Promega. Sản phẩm sau tinh sạch được giải trình tự bởi

Công ty 1st BASE (Singapore). Sử dụng chương trình BLAST để so sánh trình tự ITS thu được với dữ liệu trong Ngân hàng gen quốc tế (GenBank). Phân tích và vẽ cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự ITS sử dụng phần mềm MEGA7.

2.4. Xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm được liệu *C. militaris*

DNA tổng số của 8 chủng nấm phân lập được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* sử dụng cặp mồi đặc hiệu tương ứng là MAT1-1-1-F/MAT1-1-1-R và MAT1-2-1-F/MAT1-2-1-R (bảng 1). Xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm được liệu *C. militaris* dựa trên kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,7%.

2.5. Đánh giá khả năng hình thành quả thể và năng suất quả thể của các chủng nấm

Để đánh giá khả năng hình thành quả thể và năng suất quả thể của các chủng nấm *C. militaris* phân lập được, các chủng nấm được nuôi trồng dựa theo quy trình của N. Kang và cs (2017) [12] có cải tiến. Các chủng giống được nuôi trên môi trường PDA ở 25°C sau 5-7 ngày để hệ sợi nấm phát triển. Cắt 2-3 cm² hệ sợi nấm trên môi trường PDA chuyển vào bình nuôi giống lồng chứa 500 ml môi trường PDB có bổ sung 0,1% pepton. Giống lồng được nuôi lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày trong tối ở 22-25°C. 4-5 ml dịch giống được cấy đều lên bề mặt giá thể đựng trong hộp nhựa hình trụ có thể tích 650 ml. Thành phần giá thể trong 1 hộp nuôi (hộp nhựa trong hình trụ có thể tích 650 ml) gồm: 30 g gạo lứt huyết rồng và 60 ml dịch dinh dưỡng. Thành phần 1 l dịch dinh dưỡng gồm: dịch chiết 200 g khoai tây, 15 g glucose, 15 g sucrose, 1 g MgSO₄, 1 g KH₂PO₄, 1 g pepton, 100 g nhộng tằm. Giá thể sau khi cấy giống được đặt trong tối 5-7 ngày, ở 22-25°C để hệ sợi nấm phát triển toàn bộ bề mặt giá thể. Sau đó, hộp nuôi nấm được chuyển ra nuôi trong điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày (500-700 lux) ở 22-23°C, độ ẩm 85-90% trong 60 ngày. Chỉ tiêu theo dõi gồm: khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi thể tích 650 ml và năng suất sinh học (Biological efficiency - BE). Năng suất sinh học được xác định theo B. Shrestha và cs (2012) [15] như sau:

$$BE (\%) = (\text{khối lượng quả thể khô} / \text{khối lượng cơ chất}) \times 100$$

2.6. Xác định hàm lượng cordycepin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

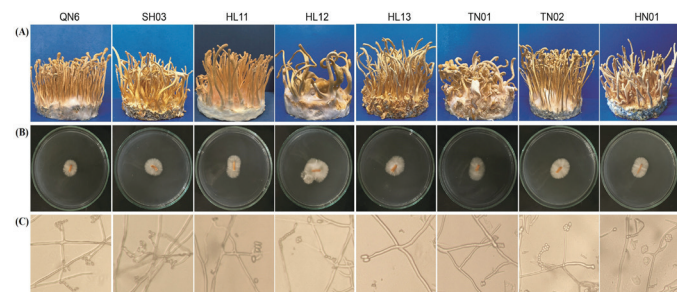
Mẫu quả thể tươi sau khi nuôi cấy 65 ngày được thu và sấy khô bằng máy sấy thăng hoa ở -40°C tới khi độ ẩm đạt 5-7%. Hàm lượng cordycepin được xác định theo L. Huang và cs (2009) [5]. Cân chính xác 0,2 g mẫu quả thể (đã xay nhỏ), chuyển vào bình nón (50 ml), thêm 10 ml methanol 80%, cân xác định khối lượng ban đầu, tiến hành chiết hồi lưu trong 30 phút, sau đó để yên ở nhiệt độ phòng, bổ sung khối lượng đã mất bằng methanol 80%. Dịch chiết được lọc qua màng cellulose acetat 0,45 µm để thu được dung dịch mẫu dùng cho phân tích HPLC. Sử dụng hệ thống thống HPLC (Hãng Shimadzu, Nhật Bản) gồm: bơm LC 20AD, Detector SPD 20A, bộ tiêm mẫu tự

động SIL-20A HT. Sử dụng cột C18 của Hãng Agilent, kích thước cột là 250x4,6 mm, kích thước hạt 5 µm. Tốc độ rửa giải là 0,5 ml/phút. Detector UV được đặt quan sát tại bước sóng 260 nm. Thể tích tiêm mẫu vào cột là 10 µl. Pha động gồm 2 dung môi là nước và acetonitril.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và xác nhận các chủng *C. militaris* bằng giải trình tự vùng ITS của rDNA

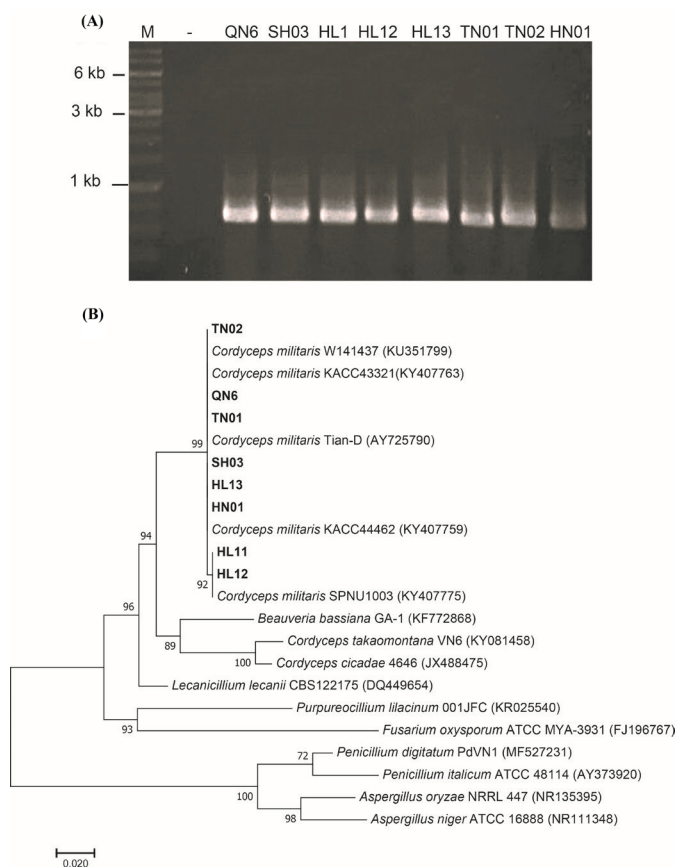
Trong nghiên cứu này, 8 mẫu quả thể nấm đã được thu thập từ các xưởng nuôi trồng nấm tại Hà Nội, Bắc Ninh, Thái Nguyên và Quảng Ngãi, bao gồm các mẫu quả thể được ký hiệu là QN6, SH03, HL11, HL12, HL13, TN01, TN02 và HN01 (hình 1A). Các chủng nấm được phân lập từ một phần quả thể. Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA ở điều kiện nhiệt độ 22-25°C trong tối hoàn toàn, các chủng nấm đã sinh trưởng tạo hệ sợi màu trắng (hình 1B). Quan sát hệ sợi dưới kính hiển vi cho thấy, hệ sợi nấm phát triển kéo dài, trên hệ sợi hình thành cấu trúc cuống sinh bào tử, bào tử hình thành tách ra có dạng hình trứng (hình 1C). Dựa trên hình thái mẫu quả thể thu thập, các đặc điểm về hệ sợi và cấu trúc sinh bào tử cho thấy đây là những đặc điểm điển hình của loài nấm *C. militaris* [7, 16].



Hình 1. Phân lập các chủng nấm từ các mẫu quả thể *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam. (A) Các mẫu quả thể nấm thu thập; (B) Phân lập chủng nấm từ một phần quả thể; (C) Cấu trúc hệ sợi và cuống sinh bào tử.

Để đảm bảo độ chính xác của các chủng nấm đã phân lập dùng cho các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tiến hành giải trình tự vùng ITS của 8 chủng nấm đã phân lập. Trong phân loại nấm, trình tự vùng ITS thường được sử dụng nhiều hơn so với các gen 18S rRNA và 28S rRNA do vùng trình tự này (gồm ITS1, 5,8S rRNA, ITS2) có sự biến đổi cao hơn giữa các loài nấm có quan hệ gần gũi [17]. DNA tổng số của 8 chủng nấm (QN6, SH03, HL11, HL12, HL13, TN01, TN02 và HN01) được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS sử dụng cặp mồi đặc hiệu ITS1/ITS4 (bảng 1). Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 550 bp (hình 2A). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch của Hãng Promega và được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore). Sử dụng chương trình BLAST so sánh trình tự ITS của 8 chủng nấm trong nghiên cứu này cho thấy, các trình tự thu được tương đồng 99-100% với các trình tự ITS của nấm *C. militaris* có trong cơ sở dữ liệu GenBank. Phân

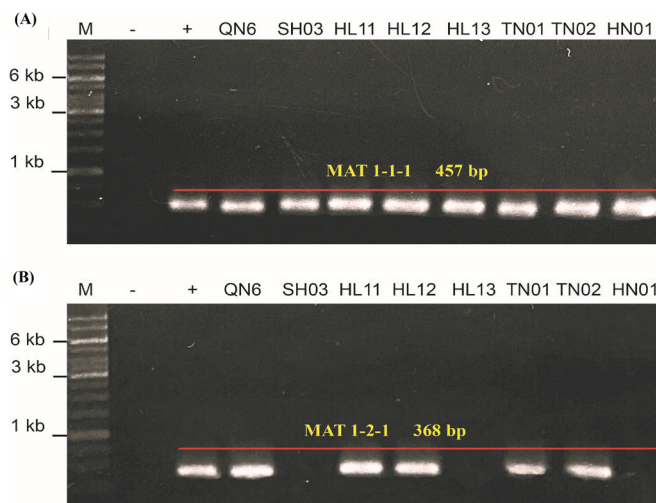
tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự ITS với phần mềm MEGA7 xác nhận cả 8 chủng nấm đã phân lập đều thuộc loài *C. militaris* (hình 2B).



Hình 2. Định danh các chủng nấm phân lập dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA. (A) Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR vùng ITS; **(B)** Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA; (-): đối chứng âm; M: DNA marker 1 kb.

3.2. Xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở 8 chủng nấm *C. militaris*

Hai gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* được xác định giữ vai trò quan trọng đối với sự hình thành quả thể và thoái hóa giống ở nấm *C. militaris* [7, 8]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào xác định 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* của các chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, 8 chủng nấm *C. militaris* được xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho 2 gen trên (bảng 1). Kết quả điện di sản phẩm PCR (hình 3) cho thấy, 5 chủng nấm (QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02) mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Trong khi đó, 3 chủng nấm bao gồm SH03, HL13 và HN01 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Như vậy có thể thấy, các chủng nấm nghiên cứu mang cả 2 gen giới tính hoặc chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*, không ghi nhận chủng nấm nào chỉ mang gen *MAT1-2-1*.

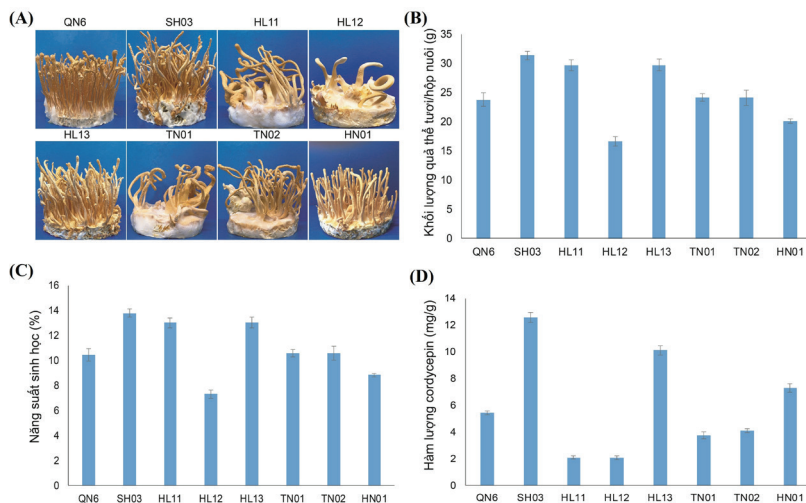


Hình 3. Xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở 8 chủng nấm *C. militaris*. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *MAT1-1-1*; **(B)** Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *MAT1-2-1*; M: DNA marker 1 kb; (-): đối chứng âm; (+): đối chứng dương.

3.3. Khả năng hình thành quả thể, năng suất và hàm lượng cordycepin của 8 chủng nấm *C. militaris*

Sau khi xác định gen giới tính *MAT* của 8 chủng nấm (QN6, SH03, HL11, HL12, HL13, TN01, TN02 và HN01), cả 8 chủng nấm này được đánh giá khả năng hình thành quả thể, năng suất và hàm lượng cordycepin. Kết quả cho thấy, cả 8 chủng nấm nghiên cứu đều hình thành quả thể. Hình thành quả thể là hình thức sinh sản hữu tính ở nấm *C. militaris* khi có sự phối hợp theo kiểu dị tần lưỡng cực (bipolar heterothallism) của các gen giới tính *MAT* khác nhau [18]. Như vậy, 5 chủng nấm QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02 mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* hình thành quả thể theo cách sinh sản hữu tính thông thường. Năm 2005, L. Yue và cs (2005) [19] nhận thấy rằng, khi chỉ mang gen giới tính đơn, hầu hết các chủng *C. militaris* không có khả năng tạo quả thể, một số ít các chủng tạo ra những dạng quả thể bất thường.

Bên cạnh đó, điểm mới của nghiên cứu này là cung cấp thêm dữ liệu về 3 chủng nấm SH03, HL13 và HN01 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1* có khả năng hình thành quả thể. Quả thể của 3 chủng nấm SH03, HL13 và HN01 có hình thái hoàn toàn bình thường (hình 4A). Đặc biệt, trong nghiên cứu này đã ghi nhận chủng SH03 mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1* cho năng suất và hàm lượng cordycepin cao nhất (đạt trung bình 31 g quả thể tươi/hộp nuôi, năng suất sinh học đạt 13,77% và hàm lượng cordycepin đạt 12,5 mg/g trong mẫu quả thể khô) (hình 4B, 4C, 4D). Hàm lượng hoạt chất cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* là chỉ tiêu luôn được các nhà nghiên cứu quan tâm. Theo nghiên cứu của D.T. Bach và cs (2017) [20], hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* nuôi trồng ở điều kiện các tác giả tối ưu đạt 4,33 mg/g quả thể khô. Kết quả nghiên cứu của P.T. Lan và cs (2016) [21] cho thấy hàm lượng cordycepin trong quả thể chủng nấm *C. militaris* NBRC100741 đạt 4,54 mg/g khô. Như vậy, chủng *C. militaris* SH03 là chủng nấm tiềm năng cho nuôi trồng ở quy mô công nghiệp.



Hình 4. Năng suất và hàm lượng cordycepin của 8 chủng nấm *C. militaris* phân lập. (A) Quả thể của 8 chủng nấm; (B) Khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi thể tích 650 ml; (C) Năng suất sinh học của 8 chủng nấm; (D) Hàm lượng cordycepin trong mẫu quả thể sấy thăng hoa đạt độ ẩm 5-7%.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã phân lập và định danh được 8 chủng nấm *C. militaris* từ các mẫu quả thể nấm đang được nuôi trồng tại Việt Nam dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của *rDNA*. Các chủng nấm đã được xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Trong đó, 5 chủng nấm gồm QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02 được xác định mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*; 3 chủng nấm gồm SH03, HL13 và HN01 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Cả 8 chủng nấm đều có khả năng hình thành quả thể, trong đó chủng *C. militaris* SH03 cho năng suất và hàm lượng cordycepin cao nhất, cụ thể: năng suất quả thể tươi trung bình đạt 31 g/hộp thể tích 650 ml, năng suất sinh học đạt 13,77% và hàm lượng cordycepin đạt 12,5 mg/g quả thể khô. Có thể thấy, đây là chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn rất tiềm năng cho các nghiên cứu sâu hơn để ứng dụng vào sản xuất.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí từ nhiệm vụ “Ứng dụng kỹ thuật di truyền trong chọn giống nấm *C. militaris* mang đơn gen giới tính có năng suất và chất lượng cao phục vụ phát triển một số sản phẩm, thực phẩm bảo vệ sức khỏe” do Bộ Khoa học và Công nghệ quản lý. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Martel, Y.F. Ko, J.C. Liao, et al. (2017), “Myths and realities surrounding the mysterious caterpillar fungus”, *Trends in Biotechnology*, **35**(11), pp.1017-1021, DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.06.011.
- [2] X.H. Qiu, L. Cao, R.C. Han (2016), “The progress, issues and perspectives in the research of *Ophiocordyceps sinensis*”, *Journal of Environmental Entomology*, **38**(1), pp.1-23.
- [3] L. Chun-Ru, S.H. Nam, D.G. Geng, et al. (2006), “Artificial culture of seventeen *Cordyceps* spp.”, *Mycosystema*, **25**(4), pp.639-645.
- [4] C.L. Gong, Z.H. Pan, X.J. Zheng, et al. (2006), “Anti-oxidation of cultured *Cordyceps militaris* growing on silkworm pupa”, *International Journal of Industrial Entomology*, **12**(1), pp.1-5.

- [5] L. Huang, Q. Li, Y. Chen, et al. (2009), “Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp.”, *African Journal of Microbiology Research*, **3**(12), pp.957-961.

- [6] E. Yokoyama, M. Arakawa, K. Yamagishi, et al. (2006), “Phylogenetic and structural analyses of the mating-type loci in *Clavicipitaceae*”, *FEMS Microbiology Letters*, **264**(2), pp.182-191, DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00447.x.

- [7] P. Zheng, Y. Xia, G. Xiao, et al. (2012), “Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine”, *Genome Biology*, **12**(11), pp.1-22, DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r116.

- [8] T.C. Wen, J.C. Kang, M.F. Li, et al. (2009), “A molecular genetic study on the fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*”, *KSM Newsl*, **21**(2), pp.76-95.

- [9] S.J. Sun, C.H. Deng, L.Y. Zhang, et al. (2017), “Molecular analysis and biochemical characteristics of degenerated strains of *Cordyceps militaris*”, *Archives of Microbiology*, **199**(6), pp.939-944, DOI: 10.1007/s00203-017-1359-0.

- [10] J. Yin, X.D. Xin, Y.J. Weng, et al. (2018), “Genotypic analysis of degenerative *Cordyceps militaris* cultured in the pupa of *Bombyx mori*”, *Entomological Research*, **48**(3), pp.137-144, DOI: 10.1111/1748-5967.12246.

- [11] T.J. White, T. Bruns, S. Lee, et al. (1990), “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, **18**(1), pp.315-322, DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

- [12] N. Kang, H.H. Lee, I. Park, et al. (2017), “Development of high cordycepin-producing *Cordyceps militaris* strains”, *Mycobiology*, **45**(1), pp.31-38, DOI: 10.5941/MYCO.2017.45.1.31.

- [13] T.V. Tuan, V.X. Tao (2020), “Establishment of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer approach for the medicinal fungus *Cordyceps militaris* G12”, *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **62**(5), pp.60-64 (in Vietnamese).

- [14] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), “A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications”, *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66.

- [15] B. Shrestha, S.K. Han, J.M. Sung, et al. (2012), “Fruiting body formation of *Cordyceps militaris* from multi-ascospore isolates and their single ascospore progeny strains”, *Mycobiology*, **40**(2), pp.100-106, DOI: 10.5941/MYCO.2012.40.2.100.

- [16] J.J. Luangsa-ard, K. Tسانathai, S. Mongkolsamrit, et al. (2008), *Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, 88pp.

- [17] J. Curran, F. Driver, J.W.O. Ballard, et al. (1994), “Phylogeny of *Metarhizium*: Analysis of ribosomal DNA sequence data”, *Mycological Research*, **98**(5), pp.547-552, DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80478-4.

- [18] X. Gao (2008), “Mating system of *Cordyceps militaris*”, *Acta. Edulis. Fungi.*, **15**(1), pp.6-10.

- [19] L. Yue, Z. Guo-Zhen, A. Mo-Ping, et al. (2005), “*Cordyceps militaris*: Ascospore germination and cultural characteristics of progeny population”, *Mycosystema*, **24**(4), pp.525-532.

- [20] D.T. Bach, V.H. Nam, M.T. Trang, et al. (2017), “Evaluation on cultivation techniques to fruiting body formation of *Cordyceps militaris*”, *TNU Journal of Science and Technology*, **161**(1), pp.113-118 (in Vietnamese).

- [21] P.T. Lan, D.H. Lan, N.T.H. Hanh, et al. (2016), “Research on the effects of temperature and light on growth, development and cordycepin active ingredient content of *Cordyceps militaris* NBRC100741 fungus on silkworm pupae”, *VNU Journal of Science*, **32**(2), pp.63-72 (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 7 - July 2022

Tổng quan về bệnh dịch kính - võng mạc xuất tiết có tính chất gia đình.

Dương Thu Trang, Nguyễn Minh Phú, Phạm Minh Châu, Đỗ Mạnh Hưng, Nguyễn Hải Hà

Ảnh hưởng của phospholipase C zeta (PLC ζ) đến khả năng thụ tinh và cải thiện kỹ thuật hỗ trợ sinh sản trên người.

Nguyễn Thanh Bình, Ngô Thái Minh Quân, Dương Thị Phương Thanh

Bệnh viêm ruột mạn - một đặc điểm hiếm gặp ở trẻ nhũ nhi tại Bệnh viện Nhi đồng 2: báo cáo một trường hợp.

Hà Văn Thiệu, Lê Thụy Phương Trúc, Trịnh Hữu Tùng, Nguyễn Minh Ngọc, Ngô Văn Bách, Hà Huy Khôi

Đặc điểm xét nghiệm huyết học và hình thái tế bào máu ngoại vi trên bệnh nhân lao phổi sử dụng thuốc lao có ADR tại Bệnh viện Phổi Trung ương từ tháng 1/2021 đến tháng 6/2021.

Võ Trọng Thành, Nguyễn Kim Cương, Phạm Thị Vượng

Hesperidin bảo vệ tế bào HEK293 trong mô hình tổn thương thận cấp *in vitro*.

Vũ Thị Thu, Ngô Thị Hải Yến

Tế bào gốc từ tủy xương: đặc điểm, tiềm năng và ứng dụng trong điều trị biến chứng bệnh tiểu đường.

Nguyễn Ngọc Hiếu, Nguyễn Chí Trường, Nguyễn Chí Toàn, Nguyễn Văn Hương, Ngô Thị Minh Thu, Lâm Phạm Phước Hùng

Nghiên cứu nguồn gốc phát sinh các đợt lộc trong mối quan hệ với năng suất giống cam sành Bồ Hạ trồng tại Thái Nguyên.

Tổng Hoàng Huyền, Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Văn Duy, Bùi Quang Đăng, Bùi Trí Thức, Nguyễn Thị Tình, Ngô Xuân Bình

Kết quả phục tráng giống lúa Tẻ đỏ của Điện Biên.

Phạm Văn Tĩnh, Nguyễn Phi Long, Bùi Thị Huy Hợp, Lê Thị Ngoan, Phạm Thị Bích, Nguyễn Đức Trung

Bước đầu nghiên cứu ảnh hưởng của nano coban đến một số đặc tính nông sinh học của giống Đậu tương DT96 trồng tại Vĩnh Phúc.

Phan Thị Thu Hiền, Hà Đức Chính, Phạm Phương Thu, Đỗ Thu Thảo, Bùi Thị Thủy, Hà Đăng Chiến, Kiều Thị Hương Mai, Nguyễn Văn Đình

Nghiên cứu ảnh hưởng của các hợp chất cao phân tử ngoại bào từ vi khuẩn lactic lên đáp ứng miễn dịch của tôm Sú (*Penaeus monodon*).

Trương Tiến Công, Nguyễn Minh Chon, Nguyễn Hữu Thanh, Nguyễn Phú Thọ, Trịnh Thị Lan, Nguyễn Hữu Yên Nhi, Nguyễn Thị Thúy Hằng

Xác định giới tính bằng chỉ thị phân tử và vi nhân giống cây Kiwi vàng (*Actinidia chinensis*).

Nguyễn Thị Mỹ Hạnh, Hoàng Thanh Tùng, Hoàng Đắc Khải, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Thị Như Mai, Vũ Quốc Luận, Huỳnh Văn Biết, Huỳnh Hữu Đức, Hoàng Thị Như Phương, Bùi Văn Lê, Dương Tấn Nhựt

Nghiên cứu xác định gen giới tính *MAT*, năng suất và hàm lượng cordycepin của một số chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam.

Vũ Xuân Tạo, Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Mến, Trương Thị Chiên, Trần Bình Minh, Thái Hạnh Dung, Trần Văn Tuấn, Nguyễn Quang Huy

1 Familial exudative vitreoretinopathy: an overview.

Thu Trang Duong, Minh Phu Nguyen, Minh Chau Pham, Manh Hung Do, Hai Ha Nguyen

8 A review: phospholipase C zeta (PLC ζ) impacts fertilisation and improves human-assisted reproductive technology.

Thanh Binh Nguyen, Thai Minh Quan Ngo, Thi Phuong Thanh Duong

14 Chronic inflammatory bowel disease - a rare feature of infancy in Children's Hospital No. 2: a case report.

Van Thieu Ha, Thuy Phuong Truc Le, Huu Tung Trinh, Minh Ngoc Nguyen, Van Bach Ngo, Huy Khoi Ha

18 Characteristics of haematological and morphology in pulmonary tuberculosis patients using drugs with ADR at the National Lung Hospital from January 2021 to June 2021.

Trong Thanh Vo, Kim Cuong Nguyen, Thi Vuong Pham

23 Hesperidin exerts protective effects on HEK293 cells in an acute kidney injury model *in vitro*.

Thi Thu Vu, Thi Hai Yen Ngo

28 Bone marrow-derived stem cells: characters, potentials, and applications in the treatments of diabetic complications.

Ngoc Hieu Nguyen, Chi Truong Nguyen, Chi Toan Nguyen, Van Huong Nguyen, Thi Minh Thu Ngo, Pham Phuoc Hung Lam

34 A study on the origin of the buds related to the yield of the “cam sành Bồ Hạ” variety grown in Thai Nguyen province.

Hoang Huyen Tong, Tien Dung Nguyen, Van Duy Nguyen, Quang Dang Bui, Tri Thuc Bui, Thi Tinh Nguyen, Xuan Binh Ngo

38 Result of purification for the Te do rice variety of Dien Bien province.

Van Tinh Pham, Phi Long Nguyen, Thi Huy Hop Bui, Thi Ngoan Le, Thi Bich Pham, Duc Trung Nguyen

44 Effect of nano cobalt on some agro-biological characteristics of DT96 soybean cultivated in Vinh Phuc province.

Thi Thu Hien Phan, Duc Chinh Ha, Phuong Thu Pham, Thu Thao Do, Thi Thuy Bui, Dang Chien Ha, Thi Huong Mai Kieu, Van Dinh Nguyen

49 Effect of extracellular macromolecules from lactic acid bacteria on the immune response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

Tien Cong Truong, Minh Chon Nguyen, Huu Thanh Nguyen, Phu Tho Nguyen, Thi Lan Trinh, Huu Yen Nhi Nguyen, Thi Thuy Hang Nguyen

54 Sex determination by molecular markers and micropropagation of *Actinidia chinensis*.

Thi My Hanh Nguyen, Thanh Tung Hoang, Dac Khai Hoang, Manh Cuong Do, Thi Nhu Mai Nguyen, Quoc Luan Vu, Van Biet Huynh, Huu Duc Huynh, Thi Nhu Phuong Hoang, Van Le Bui, Tan Nhut Duong

60 Identification of mating-type (*MAT*) gene, productivity and cordycepin content in medicinal *Cordyceps militaris* strains cultivated in Vietnam.

Xuan Tao Vu, Bao Tram Tran, Thi Men Nguyen, Thi Chien Truong, Binh Minh Tran, Hanh Dung Thai, Van Tuan Tran, Quang Huy Nguyen