



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

**Vietnam Journal of
Science and Technology - MOST**

B

Tập 57 - Số 2 - Tháng 2 năm 2015

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Nguyễn Văn Hiệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ 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
Từ Quang Hiến - Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên
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 Kỹ thuật Công nghệ TP Hồ Chí Minh
Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục - Đại học Quốc gia Hà Nội
Bành Tiến Long - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
Lê Quan Nghiệm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội
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

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

Nguyen Van Hieu - 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 - Vietnam National University, Hanoi
Vu Minh Giang - Vietnam National University, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tu Quang Hien - Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
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, Vietnam National University, 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 - Vietnam National University, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Pham Hung Viet - VNU University of Science

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@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: khcnvn@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 1153/GP-BTTTT ngày 26/7/2011
Số 2528/GP-BTTTT ngày 26/12/2012

Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No.1153/GP-BTTTT 26th July 2011
No.2528/GP-BTTTT 26th December 2012

Nghiên cứu sử dụng tế bào gốc tự thân trong điều trị suy tim sau nhồi máu cơ tim

Nguyễn Lâm Việt¹, Đỗ Doãn Lợi¹, Nguyễn Thị Bạch Yến¹, Phạm Mạnh Hùng¹, Lý Tuấn Khải², Nguyễn Quốc Anh¹, Nguyễn Ngọc Quang¹, Đinh Huỳnh Linh¹, Phan Tuấn Đạt¹, Trần Bá Hiếu¹

¹Viện Tim mạch Việt Nam

²Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Ngày nay, mặc dù đã có những tiến bộ mới trong điều trị nhồi máu cơ tim (NMCT), nhưng vẫn có khoảng 10-15% số bệnh nhân (BN) NMCT cấp dù được điều trị, can thiệp động mạch vành (ĐMV) tích cực vẫn bị suy thất trái nặng. Điều trị tế bào gốc đang là một sự lựa chọn có hiệu quả cho những BN này. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả điều trị suy tim trên lâm sàng, cận lâm sàng, chức năng thất trái ở BN suy tim sau NMCT được cấy ghép tế bào gốc tủy xương tự thân.

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1.2011 đến tháng 6.2014, tại Viện Tim mạch Việt Nam, trên 100 BN bị suy tim sau NMCT, được tái tưới máu ĐMV thành công bằng can thiệp qua da trong vòng 5 ngày đầu, chức năng tâm thu thất trái giảm (EF Simpson trên siêu âm tim hoặc cộng hưởng từ tim < 50%) được chia làm 2 nhóm: nhóm được cấy ghép tế bào gốc tự thân tủy xương (n=50) và nhóm chứng (n=50). Đây là một nghiên cứu tiến cứu, can thiệp có đối chứng, theo dõi trong vòng 12 tháng theo quy trình.

Kết quả cho thấy, thành công về mặt kỹ thuật là 100% (50/50 BN). Sau 12 tháng theo dõi, khi *cộng gộp các biến cố*: tử vong, tái NMCT, tái can thiệp ĐMV và tái nhập viện do suy tim ở nhóm BN được cấy ghép tế bào gốc tự thân (12%) thấp hơn nhóm chứng (26%) một cách có ý nghĩa thống kê ($p=0,041$). Tại thời điểm sau 12 tháng, có sự cải thiện một cách có ý nghĩa thống kê *phân độ NYHA* (phân độ chức năng của suy tim theo Hội Tim New York) trên lâm sàng và *pro-BNP* ở cả 2 nhóm BN. Trong đó, ở nhóm được cấy ghép tế bào gốc tự thân có sự cải thiện phân độ NYHA nhiều hơn so với nhóm chứng ($p=0,006$). Tại thời điểm sau 12 tháng, có *sự cải thiện chức năng thất trái* qua đánh giá bằng siêu âm tim (từ $36,19\pm 9,3$ thành $43,83\pm 4,01$), chụp buồng thất trái (từ $36,89\pm 11,72$ thành $43,97\pm 4,74$) và cộng hưởng từ tim (từ $35,89\pm 11,74$ thành $44,32\pm 4,39$) ở nhóm BN được cấy ghép tế bào gốc tự thân ($p<0,05$). Ngược lại, ở nhóm chứng, sự cải thiện không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Sự cải thiện chức năng thất trái ở nhóm tế bào gốc nhiều hơn nhóm chứng một cách có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Kết luận: phương pháp tách chiết, vận chuyển, bảo quản và cấy ghép tế bào gốc tự thân từ tủy xương trong điều trị suy tim sau NMCT là *khả thi, an toàn và có hiệu quả*.

Từ khóa: nhồi máu cơ tim, suy tim, tế bào gốc tủy xương.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

NMCT là một bệnh thường gặp và là một trong các nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các bệnh lý tim mạch. Tỷ lệ mắc bệnh có xu hướng ngày càng gia tăng, không chỉ ở các nước phát triển mà còn với các nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam [6]. Những tiến bộ mới trong điều trị NMCT, nhất là can thiệp ĐMV qua da thì đầu cùng sự ra đời của nhiều thuốc điều trị mới đã cải thiện đáng kể

tiên lượng bệnh. Tuy vậy, vẫn có khoảng 10-15% số BN NMCT cấp mặc dù được điều trị, can thiệp tích cực nhưng vẫn bị suy thất trái nặng. Điều trị tế bào gốc đang là một sự lựa chọn có hiệu quả cho nhóm BN này. Một số phát hiện gần đây cho thấy, các tế bào cơ tim có thể tái sinh [7]. Sau đó, những nghiên cứu cận lâm sàng và một số thử nghiệm lâm sàng bước đầu cũng cho các kết quả ủng hộ phát hiện trên [2].

BONE MARROW-DERIVED STEM CELL THERAPY IN HEART FAILURE PATIENTS AFTER ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

Summary

Despite continuous advancements in treating acute myocardial infarction (AMI), the incidence of heart failure after AMI is still around 10-15%. Intracoronary infusion of bone marrow-derived stem/progenitor cells (BMC) has emerged as a novel approach to regenerate injured cardiac myocytes. The study objective is to evaluate the short-term effectiveness of BMC therapy in acute phase after AMI on global left ventricular (LV) function. The study was conducted from January 2011 to June 2014, in Vietnam Heart Institute on 100 acute AMI patients who had primary percutaneous coronary intervention (PCI) and were screened by echocardiography during first 5 days after primary PCI. Patients with LV function (measured by the Simpson method on echocardiography or magnetic resonance imaging (MRI)) less than 50% were recruited to either the control group (n=50) or the BMC group (n=50). Patients were monitored for 12 months.

The results showed that, after 12 months, the incidence of the prespecified combined clinical end point of death, recurrence of myocardial infarction, and coronary revascularization, rehospitalization for heart failure was significantly lower in the BMC group (12%) than in the control group (26%) - $p=0.041$. The improvement in NYHA classification and pro-BNP was statistically significant in both the groups ($p<0.05$). The absolute improvement in LVEF was significantly greater in the BMC group than in the control group ($p<0.05$). In conclusion, intracoronary infusion of bone marrow-derived stem cells is feasible and effective in treating patients with heart failure after acute myocardial infarction.

Keywords: bone marrow-derived stem cell, heart failure, myocardial infarction.

Classification number 3.2

Tại Việt Nam, năm 2007, đề tài nhánh thuộc đề tài cấp nhà nước KC04/06-10: "Nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc tự thân từ tủy xương trong điều trị suy tim sau NMCT" do GS.TS Nguyễn Lân Việt làm chủ nhiệm đã bước đầu cho thấy tính khả thi và hiệu quả của phương pháp này. Tuy nhiên, do số lượng BN còn hạn chế (6 BN), thời gian theo dõi ngắn nên đề tài mới chỉ có thể có những kết luận sơ bộ ban đầu.

Với mục tiêu thực hiện trên nhiều BN hơn và thời gian theo dõi lâu hơn, nhằm đưa ra được các kết luận đáng tin cậy của phương pháp điều trị mới này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: *đánh giá kết quả điều trị suy tim trên lâm sàng, cận lâm sàng, chức năng thất trái ở BN suy tim sau NMCT được cấy ghép tế bào gốc tủy xương tự thân.*

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 100 BN bị suy tim sau NMCT, được tái tưới máu mạch vành thành công bằng can thiệp ĐMV qua da trong vòng 5 ngày đầu tiên sau NMCT, từ tháng 1.2011 đến tháng 6.2014. Các BN đều được điều trị nội khoa tối ưu sau can thiệp mạch vành. Các BN đồng ý tham gia nghiên cứu được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: nhóm điều trị tế bào gốc và nhóm chứng.

Tiêu chuẩn lựa chọn BN

- Nhập viện với chẩn đoán NMCT cấp: theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Tổ chức Y tế thế giới.

- Động mạch chủ phạm gây ra NMCT là động mạch liên thất trước đoạn I hoặc II.

- Được điều trị nội khoa và can thiệp ĐMV thủ phạm theo quy trình thường quy (nong và đặt stent) ngay thì đầu thành công và dòng chảy từ TIMI II trở lên.

- Sau khi can thiệp từ 3-5 ngày, BN được khảo sát lại siêu âm tim đánh giá chức năng tim mà chức năng thất trái vẫn bị giảm (với EF đo theo phương pháp Simpson trên siêu âm tim trong khoảng 20-50%).

Tiêu chuẩn loại trừ

- Có biến chứng cơ học do NMCT.

- Đã từng bị NMCT cấp trước đó.

- Những BN không thể thực hiện theo dõi tiếp theo.

- Chức năng tim EF < 20% hoặc > 50%.

- Sốc tim hoặc NYHA IV trước khi được lựa chọn.

- Không tuân thủ điều trị chuẩn sau đó.

- Kèm theo tổn thương đáng kể ĐMV phải và/hoặc động mạch mũ (hẹp > 75% hoặc tắc mạn tính) hoặc tổn thương đoạn III động mạch liên thất trước hoặc có tổn thương thân chung (hẹp > 50%).

- Thiếu máu nặng (hemoglobin < 90 g/l).
- Có các bệnh lý mạn tính khác kèm theo (bệnh gan, thận, hô hấp, ung thư...).
- Có bệnh van tim nặng kèm theo.
- Tuổi > 70.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu tiến cứu, thử nghiệm lâm sàng có đối chứng.

Các bước tiến hành nghiên cứu:

- Lựa chọn BN vào nghiên cứu (theo trình tự thời gian), thăm khám lâm sàng và các xét nghiệm cơ bản theo bệnh án nghiên cứu.

- Thăm khám siêu âm tim đánh giá chức năng thất trái theo phương pháp Simpson.

- BN được chụp lại buồng tim qua đường ống thông đánh giá chức năng thất trái.

- Với nhóm được cấy ghép tế bào gốc tự thân: lấy tủy xương tại phòng mổ - Khoa Ngoại - Bệnh viện Bạch Mai và tách chiết, cô đặc dịch tủy xương tại Khoa Huyết học, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Sau đó, tiến hành ghép (bơm dung dịch tế bào gốc đã được tách lọc) vào ĐMV (động mạch liên thất trước) chi phối vùng NMCT.

- Theo dõi BN cả hai nhóm theo trình tự thời gian: trong khi nằm viện, sau 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng.

- Theo trình tự thời gian, BN được thăm khám lâm sàng, làm siêu âm tim tại tất cả các thời điểm, chụp cộng hưởng từ (MRI) và chụp buồng thất trái đánh giá chức năng thất trái trước và sau 1 năm.

Kỹ thuật tách chiết, bảo quản, vận chuyển và cấy ghép tế bào gốc tự thân qua đường tiêm ĐMV: vào thời điểm từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5 sau khi được can thiệp ĐMV, BN được gây tê tủy sống để tiến hành chọc hút tủy xương tại vị trí cánh chậu sau trên hai bên để lấy 250 ml hỗn hợp tế bào tủy xương. Hỗn dịch này được gửi đến Trung tâm Huyết học truyền máu của Bệnh viện 108 tách lọc làm vừa đủ 10 ml dịch có chứa khoảng 15×10^6 tế bào gốc không chọn lọc. Sản phẩm này được bảo quản tốt trong điều kiện tối ưu, vận chuyển có bảo quản lạnh và sẽ được đưa trở về nhiệt độ phòng trước khi tiêm vào ĐMV. Tại Khu điều trị kỹ thuật cao - Viện Tim mạch Việt Nam, hỗn hợp này được truyền trở lại ĐMV

của người bệnh qua đường ống thông. Chúng tôi sử dụng loại ống thông có bóng chặn ở đầu tận ("over the wire") để đi vào vị trí động mạch thủ phạm gây nhồi máu (động mạch liên thất trước) đã được can thiệp. Khi bóng được bơm căng sẽ gây tắc tạm thời ĐMV, sau đó tế bào gốc sẽ được truyền qua nòng của quả bóng nong nối trên nhằm kéo dài tối đa thời gian tiếp xúc giữa tế bào gốc và mạng lưới vi mạch tận của ĐMV thủ phạm. Sau khi bơm bóng, hỗn hợp tế bào gốc được tiêm vào từ từ trong 3 đợt, mỗi đợt kéo dài 3 phút, sau mỗi đợt tiêm chúng tôi xả bóng trong 3 phút để đảm bảo tưới máu mạch vành.

Các thông số nghiên cứu: tỷ lệ thành công, thất bại, biến chứng liên quan đến thủ thuật; tỷ lệ tử vong và các biến cố tim mạch chính (tử vong, suy tim, nhập viện); các thông số lâm sàng cơ bản: mức độ suy tim theo đánh giá NYHA; siêu âm - Doppler tim: phân số tổng máu thất trái (EF); rối loạn vận động vùng; cộng hưởng từ (MRI): chức năng thất trái, thể tích thất trái; rối loạn vận động vùng; mức độ sống còn cơ tim, mức độ tưới máu cơ tim; chụp buồng thất trái qua đường ống thông được thực hiện trước thủ thuật, sau một năm; một số thông số xét nghiệm khác: xét nghiệm đánh giá mức suy tim (Pro-BNP).

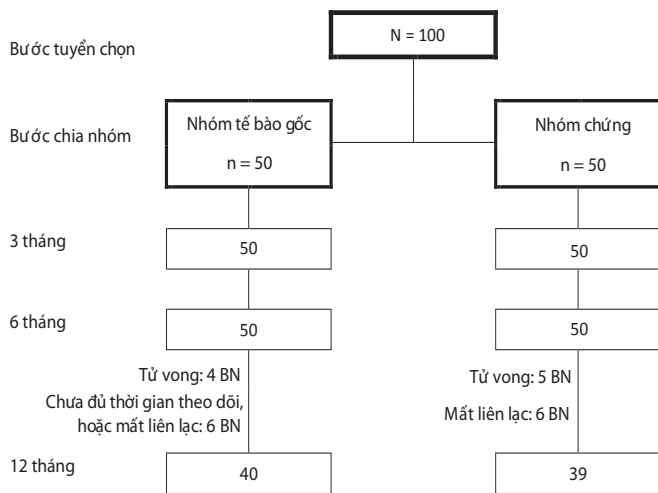
Các tiêu chí đánh giá: 1) Thành công về kỹ thuật: các quy trình tách chiết, vận chuyển, bảo quản và cấy ghép tế bào gốc tự thân vào ĐMV diễn ra thuận lợi, không xảy ra tai biến; 2) Thành công về kết quả: BN thành công về kỹ thuật và không bị biến chứng nặng trong thời gian nằm viện (tử vong, tái NMCT, phẫu thuật bắc cầu nối chủ - vành cấp cứu); 3) Thành công về lâm sàng: bao gồm thành công về kỹ thuật và thành công về kết quả cùng với sự cải thiện tình trạng suy tim trên lâm sàng (phân độ NYHA), cận lâm sàng (Pro-BNP) và trên các xét nghiệm chẩn đoán hình ảnh (EF đo trên siêu âm tim, chụp buồng tim, chụp cộng hưởng từ tim).

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được của nghiên cứu được xử lý theo các thuật toán thống kê y học trên máy vi tính bằng chương trình phần mềm SPSS 19.0.

Kết quả nghiên cứu

Trong thời gian từ tháng 1.2011 đến hết tháng 6.2014, 100 BN được lựa chọn nghiên cứu chia làm 2 nhóm: nhóm được cấy ghép tế bào gốc tự thân (n=50) và nhóm chứng (n=50). Qua thời gian theo dõi 12 tháng, số lượng BN thay đổi từng nhóm được thể hiện qua sơ đồ sau:



Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu (bảng 1)

Bảng 1: đặc điểm chung của 2 nhóm BN

	Thông số	Nhóm tế bào gốc (n=50)	Nhóm chứng (n=50)	p
Đặc điểm	Tuổi	53,51±9,48 (34-70)	55,25±7,45 (37-70)	0,31
	Giới (Nam/Nữ)	43/7 (83,8%/16,2%)	42/8 (81%/19%)	0,37
Yếu tố nguy cơ tim mạch	Tăng huyết áp	20 (40%)	17 (34%)	0,42
	Hút thuốc lá	17 (34%)	15 (30%)	0,33
	Rối loạn lipid máu	13 (26%)	15 (30%)	0,33
	Đái tháo đường	10 (20%)	5 (10%)	0,09
	Béo phì	3 (6%)	4 (8%)	0,36
	Tiền sử gia đình	2 (4%)	5 (10%)	0,14
Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng	Thời gian khởi phát triệu chứng đến lúc được tái tưới máu ĐMV (giờ)	10,5±6,6	9,7±7,5	0,57
	NYHA	2,26±0,45	2,3±0,53	0,68
	Nhịp tim (chu kỳ/phút)	83 ±17	81±18	0,57
	HA tâm thu (mmHg)	128±22	122±18	0,14
	HA tâm trương (mmHg)	80±14	81±20	0,77
	Điện tâm đồ có biến đổi đoạn ST-T	47 (94%)	48 (96%)	0,34
	Troponin T (ng/ml)	1,3±1,2	1,1±0,9	0,34
	Pro-BNP (pmol/l)	580,5±112	570,6±98	0,64
Thuốc điều trị lúc ra viện	Aspirin	50 (100%)	50 (100%)	>0,05
	Clopidogrel	50 (100%)	50 (100%)	
	UCMC hoặc chẹn thụ thể AT II	43 (86%)	41 (82%)	
	Chẹn beta giao cảm	27 (54%)	25 (50%)	
	Lợi tiểu	18 (36%)	20 (40%)	
	Statin	50 (100%)	49 (98%)	
Thuốc điều trị tại thời điểm 12 tháng	Aspirin	43 (86%)	42 (84%)	>0,05
	Clopidogrel	39 (78%)	38 (76%)	
	UCMC hoặc chẹn thụ thể AT II	40 (80%)	40 (80%)	
	Chẹn beta giao cảm	30 (60%)	32 (64%)	
	Lợi tiểu	20 (40%)	22 (44%)	
	Statin	41 (82%)	43 (86%)	

Kết quả đánh giá chức năng thất trái trước can thiệp trên 2 nhóm BN bằng các phương pháp chẩn đoán hình ảnh (bảng 2, 3)

Bảng 2: kết quả đánh giá kích thước và chức năng thất trái trước can thiệp ĐMV trên siêu âm tim

Siêu âm tim	Nhóm tế bào gốc	Nhóm chứng	p
Dd (mm)	55,12±9,18	54,23±8,56	0,62
Ds (mm)	39,69±11,63	39,15±6,12	0,77
Vd (ml)	139,22±50,37	135,19±48,18	0,68
Vs (ml)	71,16±31,65	66,15±25,79	0,39
EF (%)	36,19±9,30	38,14±7,29	0,25

Bảng 3: kết quả đánh giá chức năng thất trái trước can thiệp ĐMV trên chụp buồng thất trái và chụp cộng hưởng từ tim

	Nhóm tế bào gốc	Nhóm chứng	p
EF % (chụp buồng thất trái)	36,89±11,72	38,65±10,65	0,43
EF % (cộng hưởng từ tim)	35,89±11,74	38,25±9,74	0,28

Kết quả của phương pháp cấy ghép tế bào gốc tự thân ở BN suy tim sau NMCT

Kết quả thu gom dịch tủy xương: không có BN nào xảy ra tai biến liên quan đến gây tê tủy sống. Không có trường hợp nào bị tổn thương thần kinh hay mạch máu, nhiễm khuẩn, đau kéo dài tại nơi lấy dịch tủy xương.

Kết quả của phương pháp điều trị bằng tế bào gốc về mặt kỹ thuật:

- Thời gian trung bình được cấy ghép tế bào gốc sau khi can thiệp thì đầu là 4,5±1,5 ngày.

- Thời gian trung bình lấy tế bào gốc là: 27±17 phút (20-47 phút).

- Thời gian trung bình quy trình tiêm tế bào gốc lại ĐMV là 37±20 phút (25-61 phút).

- Thành công về mặt kỹ thuật là: 100% (50/50 BN).

- Không gặp trường hợp tử vong liên quan đến thủ thuật thu gom tế bào gốc hay tiêm tế bào gốc vào ĐMV.

- Trong quá trình nằm viện, không có BN nào tử vong hoặc bị các biến cố tim mạch.

Các biến cố tim mạch chính xảy ra trong 12 tháng sau can thiệp ĐMV (bảng 4).

Bảng 4: các biến cố tim mạch chính xảy ra trong 12 tháng ở 2 nhóm BN

Biến cố tim mạch chính	Nhóm TB gốc	Nhóm chứng	p
Tử vong	4 (8%)	5 (10%)	0,34
Tái NMCT	0 (0%)	1 (2%)	0,25
Tái can thiệp ĐMV	1 (2%)	3 (6%)	0,31
Tái nhập viện do suy tim	3 (6%)	6 (10%)	0,14
Tai biến mạch não	1 (2%)	0 (0%)	0,25
Cộng gộp các biến cố:			
❖ Tử vong + Tái NMCT + Tái can thiệp ĐMV	5 (10%)	8 (16%)	0,13
❖ Tử vong + Tái NMCT + Tái can thiệp ĐMV + Tái nhập viện do suy tim	6 (12%)	13 (26%)	0,041

Kết quả điều trị suy tim trên lâm sàng, cận lâm sàng và chức năng thất trái ở BN suy tim sau NMCT cấp được cấy ghép tế bào gốc tự thân (bảng 5-9)

Bảng 5: kết quả sự thay đổi độ NYHA trên lâm sàng ở 2 nhóm BN

Nhóm tế bào gốc				Nhóm chứng			
Trước can thiệp	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng	Sau 12 tháng	Trước can thiệp	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng	Sau 12 tháng
2,26±0,45	2,11±0,45	2,06±0,31	1,89±0,29	2,31±0,45	2,18±0,37	2,18±0,52	2,05±0,21
p=0,1				p=0,85			
p=0,01				p=0,18			
p=0,00009				p=0,0006			

Bảng 6: kết quả thay đổi về pro-BNP ở 2 nhóm BN

Nhóm tế bào gốc				Nhóm chứng			
Trước can thiệp	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng	Sau 12 tháng	Trước can thiệp	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng	Sau 12 tháng
580,5±112	550±90	523±92	490±98	570,6±98	561±87	540±69	510±60
p=0,14				p=0,61			
p=0,006				p=0,07			
p=0,0001				p=0,0005			

Bảng 7: kết quả thay đổi chức năng thất trái (EF) trên siêu âm tim ở 2 nhóm BN

Nhóm tế bào gốc				Nhóm chứng			
Trước can thiệp	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng	Sau 12 tháng	Trước can thiệp	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng	Sau 12 tháng
36,19±9,30	38,25±5,82	40,01±10,01	43,83±4,01	38,14±7,29	40,12±5,71	40,6±5,39	41,12±10,82
p=0,18				p=0,13			
p=0,06				p=0,06			
p=0,00001				p=0,14			

Bảng 8: kết quả chức năng thất trái (EF) đo bằng phương pháp chụp buồng thất trái qua đường ống thông

Nhóm tế bào gốc		Nhóm chứng	
Trước can thiệp	Sau 12 tháng	Trước can thiệp	Sau 12 tháng
36,89±11,72	43,97±4,74	38,65±10,65	41,09±5,38
p=0,0002		p=0,16	

Bảng 9: kết quả thay đổi chức năng thất trái (EF) đo bằng phương pháp chụp cộng hưởng từ tim

Nhóm tế bào gốc		Nhóm chứng	
Trước can thiệp	Sau 12 tháng	Trước can thiệp	Sau 12 tháng
35,89±11,74	44,32±4,39	38,25±9,74	41,02±7,89
p=0,00002		p=0,14	

Bàn luận

Bàn luận về đặc điểm chung của BN

Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm BN được cấy ghép tế bào gốc tự thân có độ tuổi trung bình là 53,51±9,48, thấp nhất là 34 tuổi và cao nhất là 70 tuổi. Kết quả này cũng tương tự như trong nghiên cứu BOOST [12] là: 53,4±14,8, thấp hơn so với nghiên cứu BONAMI [8]: 56±12, nghiên cứu FINCELL [4]: 59±10. Độ tuổi mắc bệnh NMCT cấp ngày càng trẻ, trong nghiên cứu của chúng tôi, BN trẻ tuổi nhất là 34 tuổi. Delewi và cộng sự trong một phân tích tổng quan hệ thống từ kết quả của 16 nghiên cứu [2] cho thấy, ở nhóm BN trẻ tuổi thì sự cải thiện chức năng thất trái (sau khi được cấy ghép tế bào gốc tự thân) tăng đáng kể hơn so với nhóm BN lớn tuổi (>55 tuổi). Trong nghiên cứu của BOOST [12], thời gian từ khi BN được can thiệp ĐMV qua da thì đầu tới khi ghép tế bào gốc là 6 ngày, còn trong nghiên cứu của chúng tôi là 4,5±1,5 ngày, bởi theo Sheiban I và cộng sự [11], quá trình viêm liên quan đến NMCT xảy ra mạnh mẽ trong 4 ngày đầu và do đó không nên cấy ghép tế bào gốc trong khoảng thời gian này.

Bàn luận về phương pháp cấy ghép tế bào gốc tự thân ở BN suy tim sau NMCT

Về tính an toàn và khả thi của kỹ thuật: tính an toàn của phương pháp cấy ghép tế bào gốc tự thân trong điều trị suy tim sau NMCT đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu: từ năm 2000, nghiên cứu TOPCARE-AMI [9] trên 20 BN được tiêm tế bào gốc thu được kết quả không có biến chứng liên quan đến tiêm tế bào gốc như loạn nhịp thất có huyết khối mới, tắc mạch sau truyền tế bào gốc hoặc tách thành mạch

do bơm bóng. Gần đây nhất, năm 2014, Delewi và cộng sự trong một phân tích tổng quan hệ thống từ kết quả của 16 nghiên cứu cũng khẳng định lại lần nữa kết luận này [2].

Về các biến cố tim mạch chính sau 12 tháng: trong nghiên cứu của chúng tôi, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các biến cố tim mạch chính trong 12 tháng giữa 2 nhóm BN ($p>0,05$) nhưng khi phân tích cộng gộp các biến cố cho thấy, ở nhóm chúng có tỷ lệ tử vong, tái NMCT, tái can thiệp ĐMV và tái nhập viện do suy tim cao hơn nhóm được cấy ghép tế bào gốc tự thân một cách có ý nghĩa thống kê ($p=0,041$). Trong nghiên cứu REPAIR-AMI [10] theo dõi 1 năm, các tác giả nhận thấy tần suất của biến cố tim mạch gồm tử vong 2%, nhập viện vì suy tim 0%, tần suất biến cố chung kết hợp giữa tử vong, nhập viện vì suy tim, tái nhồi máu là 2%. Trong nghiên cứu TOPCARE-AMI [9] với thời gian theo dõi 1 năm, tỷ lệ biến cố tim mạch ở nhóm được điều trị tế bào gốc sau 1 năm theo dõi lần lượt là tử vong 3%, NMCT lại 3%, nhập viện vì suy tim 0%.

Bàn luận về kết quả điều trị suy tim trên lâm sàng, cận lâm sàng và chức năng thất trái ở BN suy tim sau NMCT cấp được cấy ghép tế bào gốc tự thân

Về sự thay đổi độ NYHA trên lâm sàng: về tiêu chí đánh giá cải thiện triệu chứng cơ năng NYHA sau can thiệp, trong nghiên cứu của chúng tôi có cải thiện ở thời điểm sau can thiệp 6 tháng và bền vững trong 12 tháng theo dõi sau đó. Trong nghiên cứu ASTAMI [5], 50 BN NMCT trước vách cấp được can thiệp ĐMV qua da sau 2 tới 12 giờ từ thời điểm có triệu chứng, trong đó có 4 BN có NYHA III, 18 BN có NYHA II, được theo dõi trong thời gian 6 tháng sau đó. Kết quả cho thấy nhóm NYHA III giảm xuống còn 1 người, nhóm NYHA II còn 12 người. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cho thấy không có sự cải thiện dấu hiệu chức năng ở BN được cấy ghép tế bào gốc.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự khác biệt là do các BN của chúng tôi đa số có triệu chứng NYHA trước can thiệp từ độ II trở lên, còn trong nghiên cứu ASTAMI, các BN có NYHA I là 28 người, NYHA II là 18 người và chỉ có 4 người có triệu chứng NYHA III.

Về kết quả thay đổi pro-BNP: trong nghiên cứu của chúng tôi, tại thời điểm sau 12 tháng, có sự cải thiện một cách có ý nghĩa thống kê chỉ số pro-BNP ở cả 2 nhóm BN, tuy nhiên không có sự khác nhau giữa 2 nhóm BN với $p=0,28$. Nghiên cứu TOPCARE-CHD [1] tiến hành ở 121 BN bị suy tim sau NMCT đã được > 3 tháng. Các BN này được ghép tế bào

gốc sau đó và đã được xét nghiệm pro-BNP trước can thiệp và sau đó ở thời điểm 3 tháng và 12 tháng. Trong nghiên cứu này, pro-BNP giảm có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) ngay sau 3 tháng được cấy ghép tế bào gốc tự thân.

Về kết quả thay đổi chức năng thất trái sau cấy ghép tế bào gốc tự thân: 1) Thay đổi trên siêu âm tim: trong nghiên cứu này, tại thời điểm sau 12 tháng có sự cải thiện chức năng thất trái qua đánh giá bằng siêu âm tim ở nhóm BN được cấy ghép tế bào gốc tự thân ($p=0,0001$). Ngược lại, ở nhóm chúng sự cải thiện không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Sự cải thiện chức năng thất trái ở nhóm tế bào gốc nhiều hơn nhóm chứng một cách có ý nghĩa thống kê ($p=0,04$) với kết quả lần lượt là: $43,83\pm 4,01$ và $41,12\pm 10,82$. Hiện nay, có nhiều nghiên cứu cho thấy có sự hồi phục phân số tổng máu thất trái ở BN ghép tế bào gốc so với chỉ điều trị tái tưới máu. Nghiên cứu REPAIR-AMI [10] trên 101 BN được ghép tế bào gốc, thử nghiệm cho thấy có sự cải thiện chức năng thất trái tuy ít nhưng có ý nghĩa sau 4 và 12 tháng điều trị tế bào gốc. 2) Thay đổi trên chụp buồng thất trái và chụp cộng hưởng từ tim: trong nghiên cứu của chúng tôi, tại thời điểm sau 12 tháng có sự cải thiện chức năng thất trái qua đánh giá bằng phương pháp chụp buồng thất trái qua đường ống thông ở nhóm BN được cấy ghép tế bào gốc tự thân ($p=0,0002$). Ngược lại, ở nhóm chúng sự cải thiện không có ý nghĩa thống kê ($p=0,16$). Sự cải thiện chức năng thất trái ở nhóm tế bào gốc nhiều hơn nhóm chứng một cách ý nghĩa thống kê ($p=0,01$). Chúng tôi cũng thu được kết quả tương tự với phương pháp đánh giá bằng chụp cộng hưởng từ. Hiện nay, trên thế giới đã có hàng nghìn BN được điều trị tế bào gốc trong các thử nghiệm lâm sàng nhằm đánh giá sự an toàn và hiệu quả điều trị. Những nghiên cứu có cải thiện phân số tổng máu thất trái, cải thiện việc tái cấu trúc thất trái là những nghiên cứu REPAIR-AMI [10], lợi ích có được lại thấy ở trên những BN có phân số tổng máu thấp. Trong một phân tích tổng quan hệ thống từ kết quả của 16 nghiên cứu được công bố vào tháng 4.2014 của Delewi và cộng sự [2] cũng cho thấy kết quả cải thiện chức năng thất trái ở BN được cấy ghép tế bào gốc tự thân, đặc biệt với những BN trẻ tuổi (<55 tuổi) và những BN có chức năng thất trái giảm nặng ($EF < 40\%$) lại có sự cải thiện tốt hơn so với nhóm còn lại. Tuy nhiên, có một số nghiên cứu cho thấy không có sự cải thiện phân số tổng máu có ý nghĩa. Nghiên cứu của Janssens và cộng sự cho thấy sự giảm có ý nghĩa kích thích vùng nhồi máu nhưng lại không có sự cải thiện phân số tổng máu. Nghiên cứu ASTAMI [5], HEBE [3] không cho thấy có cải

thiện EF. Nghiên cứu LEUVEN-AMI của Janssens và cộng sự thực hiện trên 67 BN NMCT được cấy ghép tế bào gốc tự thân cũng không cho thấy cải thiện có ý nghĩa phân số tổng máu sau 4 tháng theo dõi. Các nghiên cứu có kết quả gần như khác nhau có thể là do thiết kế nghiên cứu khác nhau, đối tượng nghiên cứu được chọn khác nhau, nhóm BN được chọn, số lượng tế bào được tiêm, loại tế bào được dùng, thời gian tiến hành tiêm tế bào gốc sau NMCT cấp, cũng như phương pháp đánh giá kết quả hay mục đích của nghiên cứu. Tuy nhiên, các nghiên cứu đều cho thấy sự an toàn và khả thi của phương pháp điều trị tế bào gốc như điều trị bổ sung sau khi được can thiệp tái tưới máu thì đầu ở BN NMCT.

Kết luận và kiến nghị

- Phương pháp tách chiết, vận chuyển, bảo quản và cấy ghép tế bào gốc tự thân từ tủy xương trong điều trị suy tim sau NMCT là *khả thi, an toàn và có hiệu quả*.

- Tại thời điểm sau 12 tháng, tình trạng suy tim được cải thiện đáng kể hơn ở nhóm BN được cấy ghép tế bào gốc tự thân so với nhóm chứng, thể hiện qua sự cải thiện phân độ NYHA, pro-BNP và phân số tổng máu (EF) đo trên siêu âm tim, chụp buồng thất trái và cộng hưởng từ tim với $p < 0,05$.

Kiến nghị: đối với những BN bị NMCT cấp mà động mạch chủ phạm là động mạch liên thất trước, sau khi đã được điều trị tối ưu bằng các phương pháp thường quy như: điều trị nội khoa, nong và đặt stent ĐMV mà chức năng tâm thu thất trái vẫn suy giảm (EF 20-50%) thì nên phối hợp với liệu pháp cấy ghép tế bào gốc tự thân tủy xương.

Tài liệu tham khảo

[1] Assmus B et al (2007), "Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: Results of the TOPCARE-CHD registry", *Circulation*, 1234.

[2] Delewi R, Hirsch A, Tijssen J.G et al (2014), "Impact

of intracoronary bone marrow cell therapy on left ventricular function in the setting of ST-segment elevation myocardial infarction: a collaborative meta-analysis", *Eur Heart J*, **35**(15), 989-98.

[3] Hirsch A, Nijveldt R, Van der Vleuten P.A et al (2011), "Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial", *Eur Heart J*, **32**, 1736-1747.

[4] Huikuri HV1, Kervinen K, Niemelä M et al (2008), "Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction", *Eur Heart J*, **(22)**, 2723-32.

[5] Lunde K et al (2007), "Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: Results from the autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction (ASTAMI) randomized controlled trial", *Am Heart J*, **(154)**, 1-8.

[6] Nguyen H.L, Ha D.A, Phan D.T et al (2014), "Sex differences in clinical characteristics, hospital management practices, and in-hospital outcomes in patients hospitalized in a vietnamese hospital with a first acute myocardial infarction", *PloS One*, **9**(4).

[7] Quyyumi A.A et al (2011), "CD34+ cell infusion after ST-elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent", *American Heart Journal*, **161**(1), 98-105.

[8] Roncalli J et al (2011), "Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial", *European Heart Journal*, **32**(14), 1748-57.

[9] Schachinger V, Assmus B et al (2004), "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial", *JACC*, **(44)**, 1690-1699.

[10] Schachinger V et al (2006), "Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial", *Eur Heart J*, **(27)**, 2775-83.

[11] Sheiban I et al (2001), "Time course and determinants of left ventricular function recovery after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction", *J Am Coll Cardiol*, **(38)**, 464-71.

[12] Wolert K.C et al (2004), "Intracoronary autologous bonemarrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST trial", *Lancet*, **(364)**, 141-148.

Kết quả điều trị chấn thương gan bằng can thiệp nội mạch tại Bệnh viện Việt - Đức

Nguyễn Mậu Định, Nguyễn Duy Huê, Hoàng Long, Nguyễn Tiên Quyết

Bệnh viện Việt - Đức

Mục đích của nghiên cứu nhằm đánh giá chỉ định và hiệu quả ứng dụng can thiệp nội mạch điều trị tổn thương động mạch (ĐM) trong chấn thương (CT) gan. Đối tượng nghiên cứu là 51 bệnh nhân (BN) CT gan được chụp mạch và can thiệp mạch tại Bệnh viện Việt - Đức từ tháng 6.2008 đến tháng 4.2014. Kết quả cho thấy, tất cả 51 BN được điều trị bằng phương pháp can thiệp nội mạch không còn chảy máu trên phim chụp mạch (100%), không phải chuyển mổ mở để cầm máu sau khi theo dõi. Như vậy có thể kết luận, can thiệp nội mạch trong CT gan là một phương pháp điều trị hiệu quả, cần được áp dụng rộng rãi trong lâm sàng.

Từ khóa: chấn thương gan, giả phình ĐM gan, nút mạch.

Chỉ số phân loại 3.2

THE TREATMENT RESULT OF ENDOVASCULAR INTERVENTION APPLICATION FOR HEPATIC INJURY IN VIET - DUC HOSPITAL

Summary

The aim of this study is to evaluate the indications and efficiency of endovascular intervention in treating hepatic injury. 51 hepatic injury patients received angiography and endovascular intervention in Viet Duc hospital from June, 2008 to April, 2014. Result showed that, all of the patients did not undergo extravasation in angiography film (100%), no require on another surgery to stop hemorrhage. In conclusion, endovascular intervention on liver trauma is an effective therapeutic method and should be widely applied in clinical stage.

Keywords: embolization, hepatic arterial pseudoaneurysm, liver trauma.

Classification number 3.2

Đặt vấn đề

CT gan là một CT tạng đặc rất hay gặp trong CT bụng kín (chỉ sau CT lách), chiếm tỷ lệ 22,04-40,7% và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu (10-15%) trong CT bụng kín. Việc chẩn đoán CT gan, đặc biệt là các biến chứng về mạch máu rất quan trọng vì đây là biến chứng rất nặng, đe dọa tính mạng BN nếu không được xử trí kịp thời [15].

Trước đây, điều trị CT gan chủ yếu là phẫu thuật, hiện nay trên thế giới xu hướng điều trị bảo tồn được đặt lên hàng đầu. Với sự tiến bộ của chẩn đoán hình ảnh, đặc biệt là máy chụp cắt lớp vi tính (CLVT) đa dãy, việc chẩn đoán các tổn thương mạch máu trở nên dễ dàng hơn, ngoài ra nó còn cho phép đánh giá chính xác tổn thương phổi hợp. Bên cạnh đó, sự phát triển của các phương pháp hồi sức và các phương pháp điều trị ít xâm lấn, tỷ lệ thành công của điều trị bảo tồn CT gan là rất cao, từ 82 đến 96% [3, 12, 17].

Can thiệp mạch ngày nay đã trở thành sự lựa chọn hàng đầu trong những trường hợp CT gan với tổn thương ĐM có huyết động ổn định, với tỷ lệ thành công từ 85 đến 95%. Tỷ lệ tử vong, biến chứng và số lượng máu phải truyền giảm nếu so với can thiệp mổ mở, tỷ lệ chết đã giảm từ 19 xuống 9% do giảm được số ca chết do chảy máu [1, 8, 11, 17]. Tại Bệnh viện Việt - Đức, chúng tôi thực hiện trường hợp nút mạch điều trị tổn thương ĐM gan do CT lần đầu tiên vào tháng 1.2007. Hiện nay, kỹ thuật can thiệp nội mạch điều trị các biến chứng mạch

máu trong CT gan đang phát triển, có nhiều cải tiến nhằm tăng cường hiệu quả điều trị, hạn chế các biến chứng xảy ra và giảm tỷ lệ phải mổ mổ. Tuy nhiên, vai trò và hiệu quả của phương pháp can thiệp nội mạch trong điều trị biến chứng mạch máu của CT gan chưa được nghiên cứu đầy đủ. Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu nhằm mục tiêu: *nhận xét chỉ định và đánh giá kết quả ứng dụng can thiệp nội mạch điều trị CT gan tại Bệnh viện Việt - Đức.*

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Tất cả các BN CT gan không phân biệt giới tính, độ tuổi có hình ảnh thoát thuốc, giả phình, thông động tĩnh mạch trên CLVT được chụp mạch và nút mạch tại Bệnh viện Việt - Đức từ tháng 6.2008 đến tháng 4.2014 khi tình trạng huyết động ổn định và không có các tổn thương tạng khác trong ổ bụng phải mổ (thủng tạng rỗng...).

Phương pháp nghiên cứu: thử nghiệm lâm sàng không đối chứng. Thu thập thông tin theo mẫu bệnh án chung dựa trên các đặc điểm lâm sàng: tuổi, giới, nguyên nhân CT, toàn trạng, tổn thương phối hợp, chẩn đoán hình ảnh, diễn biến trong quá trình theo dõi, thái độ xử trí, chỉ định chụp mạch can thiệp, kết quả điều trị.

Phương tiện nghiên cứu: máy chụp mạch số hóa xóa nền của Speed Heart của hãng Shimazu. Dụng cụ chụp mạch máu: ống thông 5F, ống thông siêu nhỏ kích thước 2.7F để chụp và nút mạch chọn lọc - siêu chọn lọc. Vật liệu nút mạch: hỗn hợp Hystoacryl-Lipiodol siêu lỏng, hạt PVA, Spongell, vòng xoắn kim loại (coil).

Quy trình kỹ thuật: chụp mạch theo kỹ thuật Seldinger đường vào ĐM đùi phải hoặc trái. Dùng đường dẫn 2.7F luồn vào ĐM đùi lên ĐM chậu ngoài và ĐM chủ bụng. Tiến hành đặt desilet 5F vào ĐM đùi và luồn ống thông Yashiro 5F vào ĐM thân tạng, ĐM mạc treo tràng trên chụp để phát hiện các thay đổi bất thường và phát hiện các tổn thương ĐM gan. Dùng ống thông 2.7F luồn chọn lọc vào nhánh chụp để xác định rõ tổn thương và tiến hành nút chọn lọc, siêu chọn lọc. Chụp kiểm tra tổng thể sau nút để khẳng định tổn thương đã được loại bỏ và kiểm tra sự toàn vẹn của ĐM túi mật, ĐM vị tá tràng.

Theo dõi sau nút: bất động chi bên chọc 6 giờ kể từ lúc băng ép, theo dõi vị trí chọc, tình trạng toàn thân, tình trạng bụng, các xét nghiệm công thức máu, sinh hóa máu.

Đánh giá kết quả can thiệp mạch: thành công khi nhánh mạch tổn thương được bít tắc, không thấy

còn hình ảnh thông động tĩnh mạch hoặc túi giả phình được loại bỏ hoàn toàn hay thất bại (không loại bỏ được tổn thương trên phim chụp mạch).

Kết quả

Nghiên cứu thực hiện từ tháng 6.2008 đến tháng 4.2014 trên 51 BN CT gan được nút mạch cầm máu tại Khoa Chẩn đoán hình ảnh Bệnh viện Việt - Đức. Tuổi trung bình: $34,9 \pm 14,3$ tuổi. BN trẻ nhất là 9 tuổi và BN lớn tuổi nhất là 81 tuổi. Nhóm tuổi hay gặp nhất: 22 BN từ 16-30 tuổi (chiếm 43,1%) và 15 BN từ 31-45 tuổi (chiếm 29,4%). Nếu tính chung từ lứa tuổi từ 16-45 thì tổng số BN là 37/51 BN (chiếm tỷ lệ 72,5%). Tỷ lệ gặp BN nam là 35/51 (chiếm 68,6%), BN nữ là 16/51 (chiếm 31,4%). Số BN nam gặp nhiều hơn gấp 2 lần số BN nữ. Tỷ lệ BN có tổn thương phối hợp chiếm 70,6%, cao gấp gần 3 lần so với BN không có tổn thương phối hợp.

Mức độ tổn thương gan trên CLVT

Bảng 1: mức độ CT gan trên CLVT

Phân độ AAST 1994	Số BN	Tỷ lệ %
Độ II	1	2,2
Độ III	11	24,4
Độ IV	19	42,2
Độ V	14	31,2
Tổng số	45	100,0

Chúng tôi phân độ CT gan theo AAST 1994 đối với BN mới bị CT gan, không phân độ đối với CT gan cũ do hình thái tổn thương đã thay đổi nhiều nên sẽ không còn chính xác. Trong nghiên cứu này chỉ có 45/51 BN được phân độ CT gan theo AAST 1994, không có BN nào CT gan độ I và CT gan độ IV hay gặp nhất 19 BN (42,2%).

Các tổn thương ĐM gan trên phim chụp mạch

Bảng 2: các tổn thương ĐM gan trên chụp mạch

Loại tổn thương ĐM gan	Số BN	Tỷ lệ %
Chảy máu hoạt động	40	78,4
Giả phình	5	9,8
Giả phình kết hợp với chảy máu đường mật	2	3,9
Chảy máu hoạt động kết hợp thông động tĩnh mạch	4	7,8
Tổng số	51	100,0

Tổn thương hay gặp nhất là chảy máu thể hoạt động gặp trong 40/51 BN, chiếm 78,4%. Vị trí tổn thương hay gặp nhất là nhánh ĐM bên phải 45/51 BN (chiếm 88,2%), nhánh trái gặp 4 BN (chiếm 7,8%) và tổn thương cả hai bên có tỷ lệ 3,9%. 46/51 BN (90,2%) có giải phẫu ĐM gan bình thường. 5/51 BN (9,8%) có bất thường giải phẫu ĐM gan, có 1 nhánh phải ĐM gan xuất phát từ ĐM mạc treo tràng trên, 3 ĐM gan chung xuất phát từ ĐM mạc treo tràng trên và 1 ĐM gan chung ngắn.

Vật liệu nút mạch

Bảng 3: vật liệu nút mạch

Loại vật liệu	Số BN	Tỷ lệ %
Histoacryl	41	82
PVA	5	10
Spongel	2	4
Coil + Hystoacryl	1	2
Coil + PVA	1	2
Tổng số	50	100,0

1 BN nút mạch không thành công nên tổng số có 50 BN được nút mạch. Vật liệu nút mạch được sử dụng nhiều nhất là Histoacryl, 41/50 trường hợp (chiếm 82%). Vật liệu ít được sử dụng nhất là Spongel và Coil, chỉ chiếm 2%.

Kết quả gây tắc mạch

50/51 BN can thiệp mạch đều loại bỏ được tổn thương ĐM gan và cầm máu thành công, đạt tỷ lệ 98%, không có BN nào phải nút mạch lần 2 hoặc phải chuyển mổ để cầm máu. Có 1 BN CT gan độ V, chụp mạch thấy tổn thương thoát thuốc nhánh phân thùy trước gan phải, tuy nhiên do BN mất máu nhiều khi chụp mạch có hình ảnh co thắt gần như hoàn toàn ĐM gan phải và trái nên không thể chọn lọc vào nhánh tổn thương.

Tổng lượng máu truyền

Tổng số có 30 BN cần truyền máu với lượng trung bình cho 1 BN trong quá trình điều trị là $3,66 \pm 3,45$ đơn vị (từ 1-10 đơn vị). Có 11/30 BN cần truyền 1-3 đơn vị (chiếm 36,7%) và 19 BN cần truyền trên 4 đơn vị (chiếm tỷ lệ 63,3%). 5 BN CT gan đơn thuần được truyền máu với lượng máu trung bình truyền cho 1 BN là $2,1 \pm 1,4$ đơn vị. 25 BN CT gan phối hợp cần truyền máu với lượng trung bình là $3,7 \pm 3,5$ đơn vị.

Số ngày nằm viện

Trong nghiên cứu có 3 BN xin về do tình trạng quá nặng (1 BN đa CT sọ não và gãy hở hai xương cẳng chân, 1 BN bị viêm phúc mạc do vỡ tạng rỗng và 1 BN bị suy đa tạng). Chúng tôi chỉ tính ngày nằm viện cho 48 BN được điều trị cho đến khi ổn định.

Số ngày nằm viện trung bình là $9,45 \pm 4,52$ ngày (từ 3 đến 19 ngày). Có 18/48 BN nằm viện từ 1-7 ngày (chiếm tỷ lệ 37,5%), 22/48 BN nằm viện 8-14 ngày (chiếm 45,8%) và chỉ có 8 BN nằm viện trên 15 ngày (chiếm 16,7%).

Diễn biến, biến chứng sau nút mạch

Bảng 4: các diễn biến sớm sau nút mạch

Diễn biến sau nút mạch	Số BN	Tỷ lệ %
Đau hạ sườn phải	40	80
Sốt	10	20
Viêm túi mật cấp	1	2

Diễn biến hay gặp nhất là đau bụng hạ sườn phải, gặp ở 40/50 BN (chiếm 80%). Có 10 BN sốt (chiếm tỷ lệ 20%) được điều trị ổn định. Biến chứng nặng gặp 1 BN có viêm túi mật cấp ngày thứ 3 sau can thiệp (chiếm 2%) được chỉ định mổ cấp cứu cắt túi mật.

Bàn luận

Từ những năm 60 của thế kỷ trước, chụp mạch đã được biết đến như là một phương pháp chẩn đoán CT gan. Chụp mạch cho phép phát hiện các tổn thương ĐM gan như hình ảnh thoát thuốc ra khỏi lòng mạch, thông động tĩnh mạch, giả phình. Đến năm 1970, chụp mạch chẩn đoán còn đóng vai trò quan trọng trong can thiệp [11]. Năm 1972, thủ thuật nút mạch kiểm soát chảy máu trong CT lần đầu tiên được mô tả bởi Margolies. Dựa trên các nghiên cứu đó, Walter (1976) và Bass (1977) đã ứng dụng chụp ĐM và nút mạch để cầm máu ĐM gan trong CT và được xem là phương pháp điều trị an toàn, hiệu quả trong kiểm soát chảy máu sau mổ, chảy máu đường mật và thông động tĩnh mạch, giảm tỷ lệ biến chứng và số lượng máu phải truyền [2, 4, 5]. Phương pháp điều trị can thiệp bằng nội mạch được chỉ định khi có tổn thương mạch máu trên hình ảnh chụp CLVT và cần được thực hiện sớm khi tình trạng huyết động của BN còn ổn định. Đây là phương pháp có ưu điểm rõ rệt so với phương pháp điều trị phẫu thuật khi có tổn thương mạch máu thường đi kèm với tỷ lệ cắt gan cao.

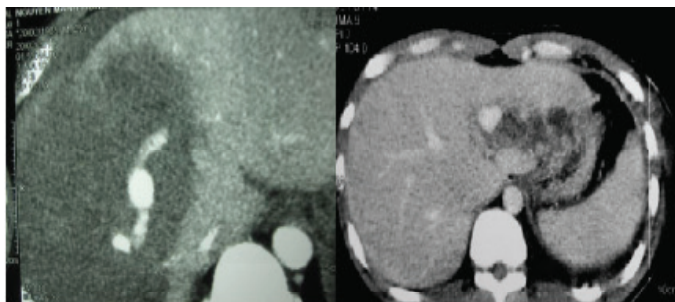
Đặc điểm chung

Nghiên cứu của chúng tôi có 51 BN với tuổi trung bình là $34,9 \pm 14,3$ tuổi, độ tuổi hay gặp nhất là 16-30 tuổi (chiếm 43,1%). Hầu hết BN đều gặp trong lứa tuổi từ 16-45 (72,5%), đây là lứa tuổi lao động chính trong xã hội. Độ tuổi trung bình trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Monnin (độ tuổi trung bình là 35,2) [11], cao hơn so với độ tuổi trung bình của Misselbeck (32,6) [8]. Nếu tính chung trong nhóm CT gan nói chung thì độ tuổi trung bình trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của Hagiwara ($28,7 \pm 16,9$) [5] nhưng lại thấp hơn của Wahl (40 ± 19) [17].

Tỷ lệ nam/nữ trong nhóm nghiên cứu là 35/16, tỷ lệ BN nam chiếm 68,6%. Tỷ lệ BN nam trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Monnin (86%) [11], nhưng lại cao hơn của Misselbeck (60%) [8], tuy nhiên nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với hầu hết các nghiên cứu là tỷ lệ nam lớn hơn tỷ lệ của nữ.

Phân độ tổn thương CT gan và chỉ định nút mạch dựa trên CLVT

Trong số 45 BN được phân độ theo AAST 1994 thì CT gan độ IV hay gặp nhất (19 BN, chiếm 42,2%). Tỷ lệ trong nghiên cứu của chúng tôi khác so với các nghiên cứu của các tác giả khác. Theo Wahl, CT gan độ IV gặp nhiều nhất 6/12 trường hợp (50%) [17], tỷ lệ CT gan độ IV theo Monin là 9/14 trường hợp (64,29%) [11]. Điều này có thể là do nguyên nhân gây CT gan ở nước ta có sự khác biệt với nước ngoài.

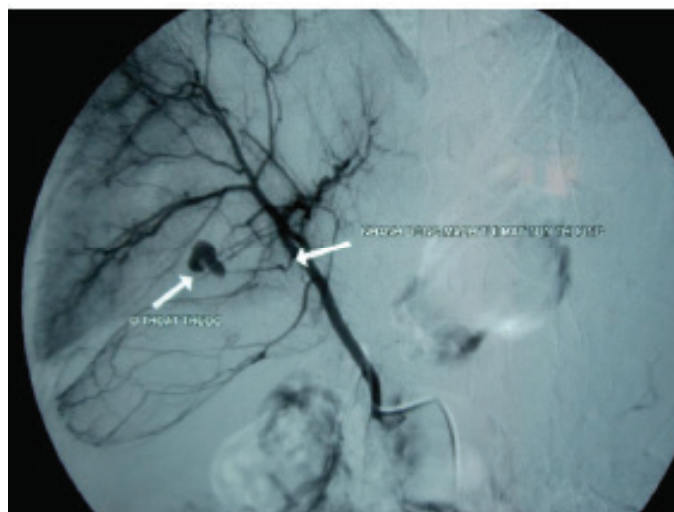


Tổn thương chảy máu thể hoạt động Tổn thương giả phình ĐM
Hình 1: hình thái tổn thương ĐM gan trên CLVT

Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi gần phù hợp với một số tác giả khác trên thế giới là 100% các trường hợp CT gan được can thiệp nút mạch đều có CT gan độ III trở lên [11, 17], chỉ có duy nhất 1 BN có CT gan độ II được nút mạch. Trong chẩn đoán CT gan thì vai trò của CLVT rất quan trọng, đặc biệt là CLVT đa dãy. Nó không những đưa lại đầy đủ thông tin về phân độ CT gan, phát hiện các

biến chứng ĐM (giả phình, chảy máu thể hoạt động, thông động tĩnh mạch) giúp cho quá trình điều trị bảo tồn mà còn giúp phát hiện các tổn thương phổi hợp, đặc biệt là các tổn thương cần phẫu thuật. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các BN đều được chụp CLVT và có dấu hiệu gợi ý tình trạng tổn thương mạch. Tuy nhiên, theo Poletti [15] nghiên cứu 72 trường hợp CT gan kín cho thấy độ nhạy của việc phát hiện dấu hiệu chảy máu thể hoạt động trên CLVT là 65%, độ đặc hiệu là 85%, giá trị chẩn đoán dương tính là 64%, giá trị chẩn đoán âm tính là 83%; âm tính giả có thể do kỹ thuật chụp lớp cắt quá dày, không chụp thì ĐM; dương tính giả có thể do thoát thuốc từ tĩnh mạch gan hoặc từ tĩnh mạch cửa, do một vùng nhu mô gan lành hay lát cắt qua một nhánh mạch bình thường nằm giữa vùng giảm tỷ trọng của tổn thương; do vậy việc phân tích kỹ các lớp cắt liên tiếp giúp xác định rõ bản chất của vùng tăng tỷ trọng. Từ đó, Poletti đề nghị chỉ định chụp mạch với tất cả các trường hợp CT gan độ IV. Nghiên cứu của Misselbeck có 4 BN được phân độ lớn hơn III theo AAST 1994 mặc dù không có dấu hiệu gợi ý tổn thương mạch trên CLVT nhưng vẫn được tiến hành chụp mạch và 2/4 BN (50%) có tổn thương mạch máu [8].

Vị trí tổn thương gan trên phim chụp mạch: vị trí tổn thương mạch hay gặp nhất là nhánh phải của ĐM gan chung, trong đó tổn thương nhánh phải đơn thuần gặp trong 45/51 trường hợp (chiếm 88,2%), tổn thương phổi hợp cả nhánh phải và trái gặp trong 2/51 trường hợp (3,9%), có thể giải thích tỷ lệ này là do thể tích gan phải lớn hơn gan trái, do vậy khả năng tổn thương ĐM gan phải là lớn hơn. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Wahl với tổn thương nhánh phải gặp ở 10/12 BN (chiếm 83,33%).

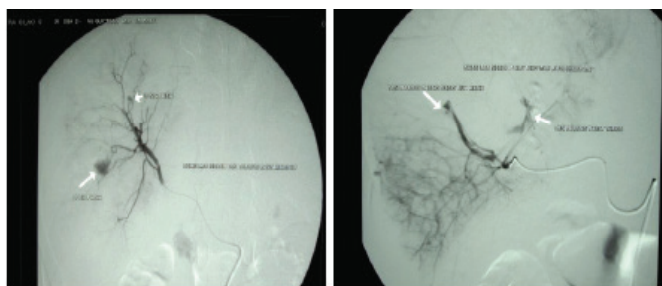


Hình 2: tổn thương thoát thuốc từ ĐM túi mật

Nghiên cứu của chúng tôi gặp 1 trường hợp có hình ảnh thoát thuốc từ ĐM túi mật đi kèm bất thường là ĐM gan phải xuất phát từ ĐM mạc treo tràng trên (hình 2).

Bất thường giải phẫu ĐM gan trên phim chụp mạch gặp trong 5/51 trường hợp (9,8%), thấp hơn nghiên cứu của Stanley Baum với tỷ lệ bất thường giải phẫu ĐM gan gặp trong 40% [16] do nghiên cứu của chúng tôi có ít BN hơn. Việc quan tâm đến giải phẫu bất thường của ĐM gan là rất quan trọng để tránh bỏ sót tổn thương. Mizobata đã giới thiệu 2 trường hợp có tổn thương chảy máu thể hoạt động với 1 nhánh của ĐM gan phải xuất phát từ ĐM dưới hoành bên phải [9].

Tổn thương ĐM gan trên phim chụp mạch: chụp mạch máu cho phép chẩn đoán các tổn thương như: tụ máu dưới bao gan, đường vỡ nhu mô, vùng đưng giáp nhu mô gan. Đặc biệt chụp mạch máu cho phép chẩn đoán xác định các dạng tổn thương ĐM gan. Hay gặp nhất trên phim chụp mạch là chảy máu thể hoạt động 44/51 trường hợp (86,3%), trong đó tổn thương chảy máu thể hoạt động đơn thuần gặp trong 39/51 trường hợp và chảy máu thể hoạt động phối hợp với các tổn thương khác gặp trong 4/51 trường hợp. Tổn thương chảy máu thể hoạt động cũng gặp nhiều nhất trong nghiên cứu của Wahl, 9/12 trường hợp (75%) tỷ lệ này giống với nghiên cứu của chúng tôi.



Hình 3: chụp mạch phát hiện tổn thương giả phình ĐM gan (hình trái), tổn thương chảy máu thể hoạt động và thông động tĩnh mạch (hình phải)

Vật liệu nút mạch

Vật liệu nút mạch được chúng tôi sử dụng nhiều nhất trong nghiên cứu là hỗn hợp Hystoacryl và Lipiodol với tỷ lệ 1:3, 1:4, với 41/50 trường hợp (chiếm 82%). Việc sử dụng vật liệu trong nghiên cứu có sự khác biệt so với các tác giả khác trên thế giới [7, 14]. Các tác giả này thường sử dụng vật liệu vòng xoắn kim loại để làm tắc mạch. Tuy nhiên, trong việc sử dụng vật liệu nút mạch, chúng tôi có quan điểm tương đồng với đa số các tác giả khác trên thế giới là sử dụng vật liệu nút mạch vĩnh viễn,

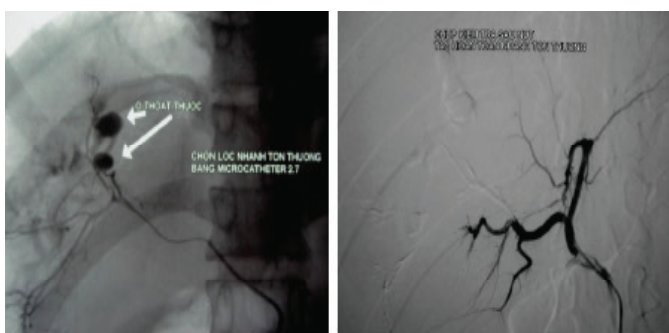
trong khi đó xu hướng của một số tác giả lại sử dụng vật liệu tạm thời (Spongel) như Hagiwara [5]. Việc sử dụng vật liệu nút mạch để làm tắc ĐM là một trong những yếu tố quan trọng giúp cho thành công của một cuộc can thiệp mạch, sử dụng vật liệu nút mạch phải dựa vào loại tổn thương (chảy máu thể hoạt động, giả phình hay thông động tĩnh mạch), kích thước tổn thương, mức độ thông giữa động và tĩnh mạch.

Xu hướng của can thiệp mạch trước đây là sử dụng Spongel, là loại vật liệu rẻ tiền, không độc, tuy nhiên đây là một loại vật liệu nút mạch tạm thời nên sẽ tái lập dòng tuần hoàn sau 2-3 tuần và đối với những tổn thương có kích thước lớn thì có nguy cơ sẽ chảy máu tái phát, khi đó chúng ta phải thực hiện lần nút mạch lần hai [6]. Trong nghiên cứu của Mohr, có 5 BN được sử dụng Spongel đơn thuần thì có 1 BN phải nút mạch lần hai do chảy máu tái diễn [10]. Histoacryl là một vật liệu nút mạch rẻ tiền, ít độc và có tác dụng tắc mạch vĩnh viễn nhưng hạn chế của loại vật liệu này là sự di chuyển không mong muốn của vật liệu, do đó gây tắc những mạch không mong muốn. Hiện nay coil được nhiều tác giả trên thế giới sử dụng, đây là loại vật liệu tốt nhất để nút mạch, tuy nhiên giá thành của loại vật liệu này cao [6]. Theo một số tác giả, để tăng hiệu quả của phương pháp, giảm biến chứng và hạ giá thành thì xu hướng kết hợp các vật liệu nút mạch được các tác giả này sử dụng. Đầu tiên nên sử dụng các vật liệu như histoacryl hoặc spongel, sau đó mới sử dụng coil. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hầu hết BN đều được sử dụng Histoacryl đầu tiên, nếu những tổn thương nhỏ chúng tôi có thể sử dụng hạt PVA. Coil ít được sử dụng vì giá thành cao, không phù hợp với hoàn cảnh kinh tế của các BN. Trong nhóm nghiên cứu có 1 BN tổn thương chảy máu thể hoạt động kết hợp với giả phình ĐM gan được sử dụng chất nút mạch tạm thời là Spongel. Đây là BN duy nhất trong nghiên cứu của chúng tôi được nút bằng hóa chất nút mạch tạm thời, do trường hợp này có tổn thương rất nhỏ trên phim chụp mạch.

Kết quả gây tắc mạch

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 50/51 (98%) BN được gây tắc mạch thành công, tỷ lệ này phù hợp với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới. Theo nhiều tác giả, tỷ lệ tắc mạch thành công chiếm 85-95% [1, 17]. Tỷ lệ tắc mạch thành công trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn vì tất cả các BN đều có tình trạng huyết động ổn định trước và trong quá trình can thiệp. Trên thực tế, có một số nghiên cứu của các tác giả khác đã tiến hành can thiệp ở những BN có huyết động không ổn định.

Trong nhóm nghiên cứu có 1 BN được chẩn đoán CT gan độ V do tai nạn giao thông và được chụp, nút mạch cùng ngày. Kết quả sau chụp mạch kiểm tra thấy tắc hoàn toàn nhánh ĐM tổn thương. Sau nút mạch, tình trạng BN không ổn định: mạch nhanh, bụng chướng, ấn đau khắp bụng. BN được chỉ định mổ nội soi thăm dò ngày thứ 3 nhưng kết quả mổ ra không còn chảy máu ở vùng gan tổn thương và không có thủng tạng rỗng.



Hình 4: chụp mạch trước và sau nút chọn lọc giả phình ĐM gan phải

Trong nghiên cứu có 1 BN nút mạch thất bại là do bị mất máu nhiều, dẫn đến co thắt gần hoàn toàn các ĐM gan phải và trái nên không thể chọn lọc được nhánh mạch tổn thương.

Tổng lượng máu truyền

Tổng lượng máu trung bình phải truyền cho 1 BN trong suốt quá trình điều trị của chúng tôi là $3,66 \pm 3,45$ đơn vị, phù hợp với nghiên cứu của Mohr [10] đối với can thiệp sớm là 2 ± 4 đơn vị, ít hơn hẳn những BN được can thiệp muộn. Cũng theo nhiều tác giả, can thiệp mạch sẽ giảm được số lượng máu phải truyền so với phẫu thuật [13, 17]. Trong nhóm CT gan đơn thuần, số lượng máu truyền cho 1 BN là $2,1 \pm 1,4$ đơn vị, trong khi đó lượng máu truyền cho 1 BN CT gan có tổn thương phối hợp là $3,7 \pm 3,5$ đơn vị. Như vậy, số lượng máu trung bình phải truyền cho BN có tổn thương phối hợp cao hơn so với BN chỉ có CT gan đơn thuần.

Số ngày nằm viện

Số ngày nằm viện trung bình của các BN trong nhóm nghiên cứu là $9,45 \pm 4,52$ ngày. Trong đó, BN nằm viện ngắn nhất chỉ có 3 ngày, lâu nhất là 19 ngày. Kết quả này của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Monnin (trung bình là 48,9 ngày) [11]. Nguyên nhân là do những BN CT gan của chúng tôi đã ổn định và chỉ phải can thiệp điều trị biến chứng giả phình hay chảy máu đường mật nên thường chỉ nằm viện trong thời gian ngắn (dưới 1 tuần). Hiện chưa có nghiên cứu nào trong nước về CT gan đề cập đến số ngày nằm viện của BN, do

vậy chúng tôi không có nhóm chứng để so sánh. Tuy nhiên, theo nhiều nghiên cứu khác trên thế giới, số ngày nằm viện sau nút mạch ngắn hơn so với các BN được phẫu thuật.

Các biến chứng sau nút mạch

Với điều kiện trong nước, chúng tôi chỉ mới đánh giá được các biến chứng sớm sau nút mạch. Các biến chứng xa như viêm xơ đường mật không có điều kiện để thăm khám. Cần phải nhấn mạnh rằng, việc chẩn đoán biến chứng viêm xơ đường mật trong điều kiện ở nước ta là rất khó khăn, các BN thường khó chấp nhận sinh thiết gan khi tình trạng của họ rất ổn định. Các biến chứng nhẹ như đau bụng vùng gan gặp trong 40/50 BN, có 10/50 BN sốt sau nút mạch, không gặp trường hợp nào tụ máu hay đau ở vị trí chọc ĐM đùi, các biến chứng này thường hết sau 1 tuần. Theo Petroianu, biến chứng đau bụng vùng gan thường hết sau 4 ngày mà không phải can thiệp gì [14].

Các biến chứng nặng cần phải can thiệp trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ gặp 1 BN hoại tử túi mật (chiếm tỷ lệ 2%). BN sau nút mạch tình trạng huyết động ổn định nhưng sau 2 ngày xuất hiện bụng chướng, ấn đau khắp bụng, cảm ứng phúc mạc, xét nghiệm có Amylase tăng. BN được chỉ định mổ nội soi ổ bụng, chẩn đoán trong mổ là hoại tử túi mật và được cắt túi mật nội soi, tổn thương gan không thấy chảy máu. Nguyên nhân dẫn đến biến chứng hoại tử túi mật là do trong quá trình làm thủ thuật, chúng tôi không đưa được Catheter chọn lọc vào nhánh tổn thương và do đó buộc phải nút tắc cả ĐM gan phải nên sau chụp kiểm tra thấy tắc ĐM túi mật. Tỷ lệ biến chứng nặng phải can thiệp trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với các tác giả khác trên thế giới, trong nghiên cứu của Monnin có 2/14 BN (14,3%) bị hoại tử túi mật [11]. Trong nghiên cứu của Misselbeck có 6/31 trường hợp bị hoại tử túi mật [8]. Chính vì vậy, theo nhiều tác giả, trong quá trình nút mạch cần phải chọn lọc nhánh tổn thương để tránh biến chứng hoại tử túi mật và cần phải theo dõi để phát hiện sớm biến chứng này sau nút mạch [8, 11]. Cần phải nhấn mạnh rằng, 70% nguồn cấp máu cho gan đến từ tĩnh mạch của nhưng nguồn cấp máu cho đường mật là từ ĐM gan, do vậy cần phải chọn lọc vào nhánh tổn thương để hạn chế làm tổn thương các nhánh lành.

Kết luận

Can thiệp nội mạch trong điều trị CT gan được chỉ định khi có tổn thương mạch máu trên CLVT ở BN có tình trạng huyết động ổn định ngay từ đầu hoặc sau hồi sức. Hiện nay, chúng tôi bắt đầu triển khai

can thiệp mạch khi huyết động không ổn định.

Can thiệp nội mạch là một phương pháp điều trị ít xâm phạm, an toàn và hiệu quả đối với các tổn thương mạch máu do CT gan với tỷ lệ thành công cao (đạt 98%), không phải chuyển mổ để cầm máu. Chỉ có 1 BN (chiếm 2%) có biến chứng hoại tử túi mật. Số lượng máu phải truyền trung bình trong cả quá trình điều trị là $3,66 \pm 3,45$ đơn vị, số ngày nằm viện trung bình là $9,45 \pm 4,52$ ngày, đều giảm hơn so với mổ mở.

Tài liệu tham khảo

[1] Asensio J.A et al (2003), "Operative Management and Outcomes in 103 AAST-OIS Grades IV and V Complex Hepatic Injuries: Trauma Surgeons Still Need to Operate, but Angioembolization Helps", *The Journal of Trauma*, **54(4)**, p. 647-654.

[2] Bass E.M.C.J (1977), "Percutaneous control of post-traumatic hepatic hemorrhage by Gelfoam embolization", *J Trauma*, **17**, p. 61- 63.

[3] Brasel K.J.D.C, Olson C.J, Borgstrom D.C (1997), "Trends in the management of hepatic injury", *Am J Surg*, **(174)**, p. 674-677.

[4] H.C Harper K.I.M (2000), "Transcatheter arterial embolization in blunt hepatic trauma", *The Southern medical journal*, **93(7)**, p. 663-665.

[5] Hagiwara A et al (1997), "Nonsurgical management of patients with blunt hepatic injury: efficacy of transcatheter arterial embolization", *Am. J. Roentgenol*, **169(4)**, p. 1151-1156.

[6] Hagiwara A et al (2002), "The efficacy and limitations of transarterial embolization for severe hepatic injury", *J Trauma*, **52(6)**, p. 1091-6.

[7] Lloret Estañ Francisco (2010), "Post-traumatic hepatic artery pseudoaneurysm treated with endovascular embolization and thrombin injection", *World J Hepatol*, **2(2)**, p. 87-90.

[8] Misselbeck T.S et al (2009), "Hepatic Angioembolization in Trauma Patients: Indications and Complications", *The Journal of Trauma*, **67(4)**, p. 769-773.

[9] Mizobata Y et al (2000), "Two Cases of Blunt Hepatic Injury with Active Bleeding from the Right Inferior Phrenic Artery", *The Journal of Trauma*, **48(6)**, p. 1153-1155.

[10] Mohr A.M et al (2003), "Angiographic Embolization for Liver Injuries: Low Mortality, High Morbidity", *The Journal of Trauma*, **55(6)**, p. 1077-1082.

[11] Monnin V et al (2008), "Place of Arterial Embolization in Severe Blunt Hepatic Trauma: A Multidisciplinary Approach", *CardioVascular and Interventional Radiology*, **31(5)**, p. 875-882.

[12] Nicholson A.A (2004), "Vascular Radiology in Trauma: A Review", *CardioVascular and Interventional Radiology*, **27(2)**, p. 105-120.

[13] Nijhof H.W (2006), "Transcatheter arterial embolization in a hemodynamically unstable patient with grade IV blunt liver injury: is nonsurgical management an option?", *Emerg Radiol*, **(12)**, p. 111-115.

[14] Petroianu A (2007), "Arterial Embolization for Hemorrhage Caused by Hepatic Arterial Injury", *Digestive Diseases and Sciences*, **52(10)**, p. 2478-2481.

[15] Poletti P.A et al (2000), "CT Criteria for Management of Blunt Liver Trauma: Correlation with Angiographic and Surgical Findings", *Radiology*, **216(2)**, p. 418-427.

[16] Stanley Baum M and M. Michael, J. Pentecost (2007), "Abrams' Angiography: Interventional Radiology, 2nd ed", *Radiology*, **(2)**, p. 457-468.

[17] Wahl W.L et al (2002), "The Need for Early Angiographic Embolization in Blunt Liver Injuries", *The Journal of Trauma*, **52(6)**, p. 1097-1101.

Kết quả sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản

Phạm Thị Mai, Đỗ Quyết, Mai Xuân Khấn, Nguyễn Kim Lưu

Trung tâm Ung bướu và Y học hạt nhân, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

Đề tài đã tiến hành sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm trên 34 bệnh nhân u phổi, lứa tuổi trung bình là $55,86 \pm 15,77$, cao nhất là 79 tuổi, thấp nhất là 22 tuổi, lứa tuổi > 40 chiếm 79,4%, nam giới 76,5%, nữ giới 23,5%, tỷ lệ nam/nữ là 3,25/1.

Tỷ lệ lấy được mẫu bệnh phẩm trong sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản cao (86,3%). Kết quả dương tính với u trung tâm là 72,7%, u ngoại vi là 69,6%. Sau khi tiến hành sinh thiết ở 34 bệnh nhân, thấy sốt gặp 5,9%, chảy máu sau sinh thiết gặp 11,8%, không có bệnh nhân nào bị tràn khí màng phổi. Kết luận: đây là kỹ thuật an toàn, chính xác và ít biến chứng.

Từ khóa: nội soi siêu âm phế quản, sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm.

Chỉ số phân loại 3.2

RESULT OF ENDOBRONCHIAL ULTRASOUND-GUIDED TRANSBRONCHIAL NEEDLE ASPIRATION

Summary

Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) has been carried out on 34 patients with lung cancer. The average age of the patients is 55.86 ± 15.77 . The eldest is 79, while the youngest is 22, the group of patients aged 40 and over makes up 79.4%. The male/female ratio is 3.25/1 with male accounting for 76.5% and female accounting for 23.5%.

Specimen rate obtained by EBUS-TBNA has been relatively high, which is equivalent to 86.3%. Positive result measured in central tumors has been 72.7%, and that in peripheral tumors has been 69.6%. In 34 biopsied patients, 5.9% has been recorded with high temperature, 11.8% has been found with bleeding, and none of the cases has been recorded with pneumothorax. In conclusion, this is a safe, accurate method with low complication rates.

Keywords: endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration, ultrasound bronchoscopy.

Classification number 3.2

Đặt vấn đề

U phổi là thuật ngữ nói chung dùng cho các bệnh có nguyên nhân ác tính hoặc lành tính, trong đó 95-98% là ung thư phế quản. Đây là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các bệnh ung thư ở nam giới trên 40 tuổi và tỷ lệ mắc bệnh cũng đang ngày càng gia tăng ở nữ giới. Ung thư phế quản thường được chẩn đoán muộn, chỉ có 10-15% bệnh nhân ung thư phế quản còn chỉ định phẫu thuật.

Các phương pháp chẩn đoán hiện nay là: chụp X-quang phổi quy ước, chụp cắt lớp vi tính, cộng hưởng từ, xạ hình phổi, PET-CT, nội soi... Tuy nhiên, tiêu chuẩn vàng vẫn là xác định được tế bào ung thư lấy ra được từ khối u.

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển của khoa học, các kỹ thuật áp dụng trong chẩn đoán ung thư nói chung và ung thư phế quản nói riêng ngày càng phát triển, đặc biệt là các kỹ thuật chẩn đoán bệnh ở giai đoạn sớm như chẩn đoán hình ảnh mới (mạ hình, PET-CT), kỹ thuật chẩn đoán nội soi mới (nội soi dải ánh sáng hẹp, nội soi huỳnh quang, nội soi siêu âm)...

Năm 1990, nội soi siêu âm phế quản

ống mềm (endobronchial ultrasound-EBUS) ra đời, có đầu dò đầu tiên đường kính 3 mm, cho hình ảnh 360 độ, khảo sát đến tận hạ phân thùy của phổi và các cấu trúc xung quanh. Nội soi siêu âm phế quản đã làm tăng giá trị chẩn đoán tổn thương phổi nói chung và các khối u phổi nói riêng. Theo Herth F.J, Heinrich D và cộng sự (2003) nghiên cứu 242 bệnh nhân u phổi nhận thấy: sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản (Endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration-EBUS-TBNA) làm tăng hiệu quả chẩn đoán đối với u phổi từ 20% lên 80%. Ở Việt Nam, Trung tâm Ung bướu và Y học hạt nhân, Bệnh viện Quân y 103 là nơi đầu tiên được trang bị máy nội soi siêu âm phế quản. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu: *bước đầu đánh giá kết quả sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản.*

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Gồm 34 bệnh nhân u phổi, điều trị nội trú tại Bệnh viện Quân y 103, thời gian từ tháng 2.2012 đến tháng 10.2013.

- *Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu:*

+ Nội soi siêu âm phế quản thấy khối u cách thành phế quản $\leq 1,5$ cm.

+ Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu.

- *Tiêu chuẩn loại trừ:*

+ Bệnh nhân có chống chỉ định với nội soi phế quản và/hoặc sinh thiết hút sinh thiết xuyên thành phế quản.

+ Bệnh nhân không thu thập đủ các chỉ tiêu nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

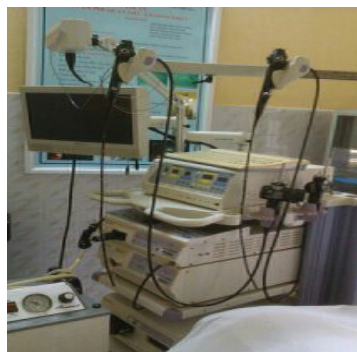
Theo phương pháp tiến cứu, mô tả, cắt ngang. Hồ sơ nghiên cứu được ghi chép theo mẫu thống nhất.

Nghiên cứu lâm sàng, cận lâm sàng: khai thác tiền sử, bệnh sử, thời gian mắc bệnh, yếu tố nguy cơ, lý do vào viện, triệu chứng hô hấp, các triệu chứng toàn thân và cận u. Làm các xét nghiệm cận lâm sàng.

Sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản: tiến hành tại phòng soi phế quản, Trung tâm Ung bướu và Y học hạt nhân, Bệnh viện Quân y 103.

Thiết bị và dụng cụ: hệ thống máy nội soi Olympus

BT 40 gồm 4 bộ phận: tay cầm, ống soi, bộ phận quang học và đầu dò siêu âm tỏa tia, tần số 20 MHz, bán kính xuyên sâu 4 cm; kim sinh thiết NA-201SX-4022 22-Gauge, chiều dài kim < 1,5 cm. Thực hiện với các khối u cách thành phế quản < 1,5 cm.



Hệ thống máy nội soi siêu âm phế quản



Kim sinh thiết

Kết quả và bàn luận

Đặc điểm đối tượng nghiên cứu (bảng 1)

Bảng 1: đặc điểm đối tượng nghiên cứu

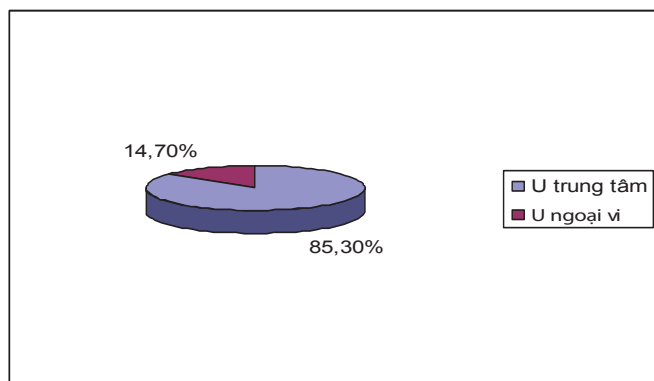
Tuổi	Nam		Nữ		Cộng	
	n	%	n	%	n	%
22-< 40	5	19,3	2	25,0	7	20,6
40-59	14	53,8	3	37,5	17	50,0
60-< 70	4	15,4	1	12,5	5	14,7
70-79	3	11,5	2	25,0	5	14,7
Tổng	26	76,5	8	23,5	34	100,0
X $\pm$ SD	55,7 $\pm$ 15,8					

Kết quả nghiên cứu cho thấy: nam giới 76,5%, nữ giới 23,5%. Tỷ lệ nam/nữ là 3,25/1, tuổi > 40 chiếm 79,4%. Tuổi trung bình là 55,86 $\pm$ 15,77, tuổi cao nhất là 79, thấp nhất là 22. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của một số tác giả trong nước: Hoàng Thị Hiệp (1999) nghiên cứu 51 bệnh nhân u phổi nhận thấy lứa tuổi hay gặp từ 40-70 chiếm 86,3%. Phạm Thị Thu Hiền năm (2007) nghiên cứu 139 bệnh nhân u phổi, tuổi trung bình là 58, tuổi thấp nhất là 33, tuổi cao nhất là 85, tỷ lệ nam/nữ là 4,3/1.

Lứa tuổi trung bình bệnh nhân u phổi trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn của một số tác giả trên thế giới. Theo Yoshikawa M, Sukoh N và cs (2007) nghiên cứu 121 bệnh nhân u phổi cho thấy, lứa tuổi trung bình là 66,2, tuổi thấp nhất là 38, tuổi cao nhất là 82. Yoshisugu F, Nobuhiko S và cs (2011) nhận thấy, tuổi trung bình của 147 bệnh nhân u phổi là 67,05 $\pm$ 11,04, tỷ lệ nam/nữ là 2,2/1. Có sự khác biệt này là do: tuổi thọ trung bình của các nước phát

triển và một số nước ở châu Á cao hơn người Việt Nam (ví dụ, tuổi thọ trung bình ở Nhật Bản là 77 tuổi đối với nam và 82 tuổi đối với nữ).

Vị trí khối u



Biểu đồ 1: vị trí khối u qua nội soi siêu âm phế quản

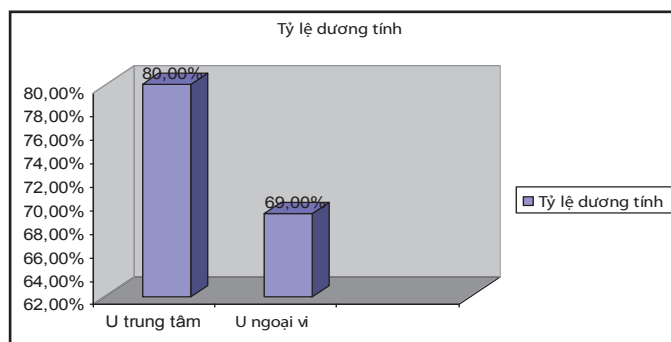
Siêu âm qua nội soi phế quản với tần số 20 MHz, khả năng xuyên sâu với bán kính 4 cm thể hiện ưu thế vượt trội trong việc đánh giá cấu trúc thành phế quản cũng như những tổ chức, hạch lympho quanh phế quản, đặc biệt những tổn thương nằm ở ngoại vi mà nội soi phế quản ống mềm thông thường không phát hiện được. Chính vì thế, trong nghiên cứu của chúng tôi chủ yếu tổn thương ở ngoại vi, chiếm 85,3%.

Kết quả lấy bệnh phẩm của kỹ thuật sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản (bảng 2)

Bảng 2: số lần sinh thiết và số mẫu bệnh phẩm lấy được

Số lần sinh thiết	n = 34	Số mẫu bệnh phẩm lấy được	Tỷ lệ (%)
1	21	18	85,7
2	9	16	88,9
3	4	10	83,3
Tổng	51	44	86,3

Chẩn đoán u phổi thông thường thực hiện theo trình tự: lâm sàng, X-quang ngực chuẩn, chẩn đoán tế bào, mô bệnh. Trong đó, lâm sàng có vai trò định hướng, X-quang ngực chuẩn gợi ý để phân biệt khối u lành tính, khối u ác tính. Chẩn đoán tế bào, mô bệnh mới cho phép chẩn đoán xác định và là cơ sở quan trọng nhất để xác định biện pháp điều trị và tiên lượng đúng đắn cho mỗi bệnh nhân, đồng thời cũng là tiêu chuẩn vàng cho các nghiên cứu về ung thư phế quản. Vai trò quan trọng đó thuộc về các kỹ thuật xâm nhập lấy bệnh phẩm cho chẩn đoán tế bào, mô bệnh. Trong nghiên cứu, tiến hành sinh thiết 51 lần, tổng số mẫu bệnh phẩm lấy được là 44 mẫu, đạt 86,3%.



Biểu đồ 2: kết quả sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản

U ở trung tâm, phần lớn phát triển từ phế quản lớn gần với rốn phổi cho nên mức độ xâm lấn và lan tràn vào phế quản từ cấp 4, cấp 5 trở lên nhiều hơn so với u ngoại vi. Ngoài tổn thương nhìn thấy trong lòng phế quản khi soi phế quản thì sinh thiết hút xuyên thành phế quản dễ xâm nhập vào tổ chức u trung tâm hơn so với u ngoại vi. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ dương tính với u trung tâm là 80%, u ngoại vi đạt 69%. Kết quả thu được thấp hơn của một số tác giả nước ngoài do số lượng bệnh nhân nghiên cứu còn ít.

Franco F, Flavio F và cs (2003) nghiên cứu 100 bệnh nhân u phổi nhận thấy tỷ lệ dương tính với u trung tâm là 69/74, đạt 93%; với u ngoại vi là 19/26, đạt 73%. Nghiên cứu của Ananthan D, Koh M.S và cs (2009) nhận thấy, kết quả chẩn đoán của EBUS-TBNA với u trung tâm là 86%, u ngoại vi là 80%.

Kết quả chẩn đoán tế bào sau sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản (bảng 3)

Bảng 3: kết quả chẩn đoán tế bào sau EBUS-TBNA

Chẩn đoán tế bào sau EBUS-TBNA		Dương tính		Âm tính		Tổng
		n	%	n	%	
Ung thư phế quản		21	77,8	6	22,3	27
Nguyên nhân khác	U lao	2	50,0	2	50,0	4
	Viêm phổi dạng tròn	1	33,3	2	66,7	3
Tổng		24		10		34

Chẩn đoán tế bào sau sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của siêu âm cho thấy, ung thư phế quản có tỷ lệ dương tính là 77,8% (21/27). Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả nước ngoài như: Tournoy K.G, Rintoul R.C và cs (2009) nghiên cứu 60 bệnh nhân ung thư phế quản, kết quả chẩn đoán tế bào sau EBUS-TBNA là: ung thư phế quản có tỷ lệ dương tính 77% (46/60).

triển và một số nước ở châu Á cao hơn người Việt Nam (ví dụ, tuổi thọ trung bình ở Nhật Bản là 77 tuổi đối với nam và 82 tuổi đối với nữ).

Vị trí khối u

Siêu âm qua nội soi phế quản với tần số 20 MHz, khả năng xuyên sâu với bán kính 4 cm thể hiện ưu thế vượt trội trong việc đánh giá cấu trúc thành phế quản

Bảng 4: tỷ lệ tai biến và biến chứng của kỹ thuật EBUS-TBNA

Tai biến, biến chứng	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Sốt	2	5,9
Chảy máu tại chỗ	4	11,8
Tràn khí màng phổi	0	0

cũng như những tổ chức, hạch lympho quanh phế quản, đặc biệt những tổn thương nằm ở ngoại vi mà nội soi phế quản ống mềm thông thường không phát hiện được. Chính vì thế, trong nghiên cứu của chúng tôi chủ yếu tổn thương ở ngoại vi, chiếm 85,3%.

Kết quả lấy bệnh phẩm của kỹ thuật sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản (bảng 2)

Chẩn đoán u phổi thông thường thực hiện theo trình tự: lâm sàng, X-quang ngực chuẩn, chẩn đoán tế bào, mô bệnh. Trong đó, lâm sàng có vai trò định hướng, X-quang ngực chuẩn gợi ý để phân biệt khối u lành tính, khối u ác tính. Chẩn đoán tế bào, mô bệnh mới cho phép chẩn đoán xác định và là cơ sở quan trọng nhất để xác định biện pháp điều trị và tiên lượng đúng đắn cho mỗi bệnh nhân, đồng thời cũng là tiêu chuẩn vàng cho các nghiên cứu về ung thư phế quản. Vai trò quan trọng đó thuộc về các kỹ thuật xâm nhập lấy bệnh phẩm cho chẩn đoán tế bào, mô bệnh. Trong nghiên cứu, tiến hành sinh thiết 51 lần, tổng số mẫu bệnh phẩm lấy được là 44 mẫu, đạt 86,3%.

U ở trung tâm, phần lớn phát triển từ phế quản lớn gần với rốn phổi cho nên mức độ xâm lấn và lan tràn vào phế quản từ cấp 4, cấp 5 trở lên nhiều hơn so với u ngoại vi. Ngoài tổn thương nhìn thấy trong lòng phế quản khi soi phế quản thì sinh thiết hút xuyên thành phế quản dễ xâm nhập vào tổ chức u trung tâm hơn so với u ngoại vi. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ dương tính với u trung tâm là 80%, u ngoại vi đạt 69%. Kết quả thu được thấp hơn của một số tác giả nước ngoài do số lượng bệnh nhân nghiên cứu còn ít.

Franco F, Flavio F và cs (2003) nghiên cứu 100 bệnh nhân u phổi nhận thấy tỷ lệ dương tính với u trung tâm là 69/74, đạt 93%; với u ngoại vi là 19/26, đạt 73%. Nghiên cứu của Ananthan D, Koh M.S và

cs (2009) nhận thấy, kết quả chẩn đoán của EBUS-TBNA với u trung tâm là 86%, u ngoại vi là 80%.

Kết quả chẩn đoán tế bào sau sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của nội soi siêu âm phế quản (bảng 3)

Chẩn đoán tế bào sau sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của siêu âm cho thấy, ung thư phế quản có tỷ lệ dương tính là 77,8% (21/27). Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả nước ngoài như: Tournoy K.G, Rintoul R.C và cs (2009) nghiên cứu 60 bệnh nhân ung thư phế quản, kết quả chẩn đoán tế bào sau EBUS-TBNA là: ung thư phế quản có tỷ lệ dương tính 77% (46/60).

Nghiên cứu của Akash V, Kyeongman J và cs (2013) sử dụng kim 22 Gauge (NA-2015X- 4022) để sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của đầu dò siêu âm tỏa tia, tỷ lệ dương tính với ung thư phế quản là 81,1%.

Tai biến và biến chứng của kỹ thuật EBUS-TBNA (bảng 4)

Sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của siêu âm qua nội soi phế quản sử dụng kim 22-Gauge có đường kính 0,6 mm, do đó đây là kỹ thuật rất an toàn. Sau khi tiến hành sinh thiết ở 34 bệnh nhân, thấy sốt gặp 5,9%, chảy máu sau sinh thiết gặp 11,8%. Không có bệnh nhân nào bị tràn khí màng phổi. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả trên thế giới.

Tournoy K.G, Rintoul R.C và cs (2009) tiến hành sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của siêu âm qua nội soi phế quản ở 60 bệnh nhân u phổi, phát hiện ung thư phế quản ở 46/50 bệnh nhân, hiệu quả chẩn đoán đạt 77%, không có tai biến nghiêm trọng nào được báo cáo.

Franco F, Flavio F và cs (2003) tiến hành sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của siêu âm qua nội soi phế quản ở 100 bệnh nhân, không thấy có tai biến nào nghiêm trọng xảy ra, chỉ có một vài bệnh nhân ho, chảy máu nhẹ sau sinh thiết.

Herth F.J, Heinrich D và cs (2003) sử dụng đầu dò tỏa tia UM-2R/3R tần số 20 MHz tiến hành sinh thiết hút xuyên thành phế quản dưới hướng dẫn của siêu âm qua nội soi phế quản cho 242 bệnh nhân, không thấy có tai biến nghiêm trọng nào được báo cáo.

Eberhardt R, Ernst A và cs (2009) sử dụng đầu dò tỏa tia UM-S20-20R, tần số 20 MHz hướng dẫn sinh thiết ở 100 bệnh nhân thấy 3% chảy máu tại chỗ, 2% tràn khí màng phổi.

Kết quả bước đầu làm giảm thể tích phổi bằng van phế quản điều trị khí thũng nặng

Đồng Khắc Hưng¹, Tạ Bá Thắng², Nguyễn Huy Lực²,
Đỗ Quyết¹, Đào Ngọc Bằng², Mai Xuân Khẩn², Nguyễn Lam² và cs

¹Học viện Quân y

²Bệnh viện Quân y 103

Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá kết quả bước đầu làm giảm thể tích phổi điều trị khí thũng phổi nặng ở bệnh nhân bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (BPTNMT) bằng phương pháp đặt van phế quản một chiều qua nội soi phế quản ống mềm. Nghiên cứu tiến hành trên 20 bệnh nhân BPTNMT giai đoạn ổn định có khí thũng phổi nặng khu trú. Toàn bộ bệnh nhân được chụp CT ngực, đo FEV1, RV, TLC, Raw và khí máu động mạch trước và sau khi đặt van. Van 1 chiều loại Zephyr được đặt vào phế quản thùy hoặc phân thùy qua nội soi phế quản ống mềm. Kết quả: test đi bộ 6 phút sau đặt van 1 tháng tăng lên so với trước khi đặt van (trước đặt van: 305,6±53,29m, sau đặt van: 339,4±59,91m). Chỉ số CAT giảm rõ rệt so với trước điều trị (trước điều trị: 22,86±1,34, sau điều trị: 20,89±2,12); FVC trung bình sau 3 tháng là 70,07±30,29%, tăng rõ rệt với trước điều trị (60,06±8,17%). Raw trung bình sau 1 tháng là 654,1±347,8%, giảm rõ rệt so với trước điều trị (714±320,79%). Tỷ lệ biến chứng sau đặt van là 70%, trong đó bùng phát đợt cấp là 20%, sốt 10%, nhưng không có biến chứng nặng. Kết luận: phương pháp đặt van phế quản một chiều qua nội soi phế quản ống mềm làm giảm thể tích phổi có hiệu quả, cải thiện rõ rệt chất lượng cuộc sống, chức năng phổi của bệnh nhân khí thũng phổi và là kỹ thuật an toàn.

Từ khóa: BPTNMT, nội soi phế quản giảm thể tích phổi, van nội phế quản một chiều.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

BPTNMT (tiếng Anh là COPD) có tỷ lệ mắc cao và là một gánh nặng bệnh tật toàn cầu. Khí thũng phổi là một trong những tổn thương bệnh lý đặc trưng của BPTNMT. Biểu hiện sinh lý bệnh quan trọng nhất trong khí thũng phổi là căng giãn các phế nang cục bộ hoặc lan tỏa, làm tăng dung tích toàn phổi, tăng thể tích cận, tắc nghẽn đường thở do xẹp đường thở nhỏ ở thì thở ra và giảm độ đàn hồi của phổi, dẫn đến giảm lưu lượng thở ra [1]. Khí thũng phổi nặng gây khó thở tăng dần, không hồi phục, cuối cùng dẫn đến suy hô hấp, suy tim phải, tử vong. Điều trị giảm thể tích phổi (lung volume reduction) là làm giảm hoặc mất vùng phổi khí thũng nặng (nơi chức năng phổi bị giảm nghiêm trọng hoặc mất hẳn) sẽ làm tăng chức năng của nhu mô phổi còn lại, cho phép vùng phổi ít tổn thương trở về được dung tích ban đầu, dẫn đến giảm khó thở, cải thiện các thông số chức năng phổi và tăng khả năng vận động của bệnh nhân [1, 3, 5]. Kỹ thuật làm giảm thể tích phổi qua nội soi phế quản điều trị khí thũng phổi

bao gồm đặt coin phế quản, đặt van phế quản một chiều... Nguyên lý hoạt động của van phế quản một chiều là chỉ cho không khí, dịch tiết từ trong phổi ra ngoài trong thì thở ra nhưng không cho không khí đi vào vùng phổi khí thũng ở thì hít vào. Khi van một chiều được đặt vào trong lòng phế quản sẽ làm giảm đáng kể và nhanh chóng thể tích của phân thùy hoặc thùy phổi bị khí thũng nặng [4, 5, 10]. Kỹ thuật nội soi phế quản đặt van một chiều đã được thực hiện ở một số nước tiên tiến trên thế giới. Làm giảm thể tích phổi bằng van một chiều qua nội soi phế quản ống mềm được ứng dụng lần đầu tiên tại Việt Nam ở Khoa hô hấp, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y với mục tiêu: *đánh giá kết quả bước đầu nội soi phế quản làm giảm thể tích phổi bằng đặt van một chiều điều trị BPTNMT.*

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

20 bệnh nhân được chẩn đoán xác định BPTNMT theo tiêu chuẩn của GOLD (2013) điều trị nội trú tại

INITIAL RESULTS OF LUNG VOLUME REDUCTION BY BRONCHIAL VALVE FOR TREATING SERIOUS EMPHYSEMA

Summary

The study's objective is to assess the initial results of lung volume reduction by bronchial valve for treating serious emphysema. The study has been conducted on 20 patients with seriously localized emphysema. All the patients have been at the stable stage of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The patients received chest CT, pulmonary function measurements. The lung function parameters (FEV1, RV, TLC, Raw) and arterial blood gases have been measured before and after insertion of the valve (after 1 week, 1 month and 3 months). One-way valve called Zephyr has been placed into lobe or segment lobe bronchus via flexible bronchoscopy. Results: the 6-minute walk test at the moment of one month after insertion of the valve has increased significantly (339.4 ± 59.91 m compared to 305.6 ± 53.29 m). CAT index after one month of insertion has reduced remarkably (20.89 ± 2.12 compared to 22.86 ± 1.34); the average of FVC after 3 months has increased markedly ($70.07 \pm 30.29\%$ compared to $60.06 \pm 8.17\%$). The average of raw after one month has significantly reduced ($654.1 \pm 347.8\%$ compared to $714 \pm 320.79\%$). The rate of complications after placing valve has been 70% including broke out exacerbation (20%) and fever (10%), but no serious complication. Conclusions: the lung volume reduction by placing bronchial valve for treatment of serious emphysema has improved the quality of patient life that has revealed in improving well the index 6-minute walk test and lung function (CAT index, FEC, Raw). The technique has been carried out safely.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, lung volume reduction, one-way valve.

Classification number 3.2

Khoa hô hấp, Bệnh viện Quân y 103, thời gian từ tháng 1.2014 đến tháng 10.2014.

Chỉ định đặt van một chiều qua nội soi phế quản làm giảm thể tích phổi: bệnh ở giai đoạn III và IV, giai đoạn ổn định, đã bỏ thuốc lá trên 6 tháng; chụp cắt lớp vi tính độ phân giải cao xác định có khí thũng phổi nặng ưu thế ở thùy trên hoặc thùy dưới; thể tích cặn (residual volume - RV) $>150\%$ so với lý thuyết, dung tích toàn phổi (total lung capacity - TLC) $>100\%$; không có thông khí bên ở vùng phổi dưới vị trí đặt van một chiều.

Loại trừ những bệnh nhân COPD đang trong đợt bùng phát (đợt cấp) hoặc bệnh nhân có chống chỉ định với nội soi phế quản.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả tiến cứu, can thiệp và theo dõi dọc.

Các bệnh nhân được khám lâm sàng, đánh giá chỉ số CAT, test đi bộ 6 phút, làm các xét nghiệm thường quy (công thức máu, sinh hóa máu, điện tim, siêu âm tim, Xquang phổi chuẩn), đo thông khí phổi, xét nghiệm khí máu động mạch, chụp cắt lớp vi tính lồng ngực độ phân giải cao, đo thể tích ký thân đánh giá RV, TLC, Raw tại các thời điểm: trước đặt van và sau đặt van phế quản 1 tuần, 1 tháng và 3 tháng.

Tiến hành nội soi phế quản mềm đánh giá tình trạng đường thở, sau đó tiến hành xác định tình trạng thông khí bên của vùng phổi dự kiến đặt van, đo đường kính phế quản và lựa chọn van phù hợp kích cỡ. Tiến hành nạp van vào catheter mang van, đưa van vào đúng vị trí phế quản đã lựa chọn và đặt van vào phế quản. Kiểm tra lại tình trạng van sau đặt. Theo dõi các tai biến, biến chứng và điều trị duy trì cho bệnh nhân đến khi ra viện. Hẹn bệnh nhân tái khám, kiểm tra định kỳ ở các thời điểm sau đặt van 1 tuần, 1 tháng, 3 tháng.

Đánh giá kết quả của kỹ thuật bằng các chỉ tiêu: thay đổi các dấu hiệu lâm sàng (mức độ khó thở, CAT [COPD Assessment Test], test đi bộ 6 phút), đo các chỉ số FEV1, FVC, RV, TLC, Raw, PaO₂, PaCO₂, SaO₂, chẩn đoán và điều trị các tai biến, biến chứng của kỹ thuật nếu có.

Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 16.0.

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Các bệnh nhân đều có biến chứng suy hô hấp mạn tính và ở giai đoạn nặng của COPD. Tất cả bệnh nhân đều có khí thũng phổi mức độ nặng, chủ yếu là khí thũng phổi ưu thế ở thùy dưới (70%) (xem bảng 1).

Bảng 1: đặc điểm chung đối tượng nghiên cứu

Tuổi ($\bar{X} \pm SD$)	65,1 $\pm$ 5,86 năm
Nam	20 (100%)
Thời gian mắc bệnh ($\bar{X} \pm SD$)	80,27 $\pm$ 27,04 tháng
Mức độ khó thở: - Nhẹ - Trung bình	16 (80%) 4 (20%)
CAT ($\bar{X} \pm SD$)	22,86 $\pm$ 1,34
Biến chứng: - Suy hô hấp - Tâm phế mạn	20 (100%) 5 (25%)
Giai đoạn bệnh: - III - IV	15 (75%) 5 (25%)
Phân nhóm bệnh theo GOLD (2013): - C - D	15 (75%) 5 (25%)
Test đi bộ 6 phút	305,6 $\pm$ 53,3 m
FEV1 ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	32,6 $\pm$ 8,17%
FVC ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	60,07 $\pm$ 8,17%
RV ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	239,7 $\pm$ 61,23%
TLC ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	132,13 $\pm$ 19,72%
Raw ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	714 $\pm$ 320,79%
PaO ₂ ($\bar{X} \pm SD$) (mmHg)	70,86 $\pm$ 5,85 mmHg
PaCO ₂ ($\bar{X} \pm SD$) (mmHg)	45,27 $\pm$ 4,08 mmHg
SaO ₂ ($\bar{X} \pm SD$) (%)	94,27 $\pm$ 1,58%
Hình ảnh cắt lớp vi tính: - Khí thũng ưu thế thùy trên - Khí thũng ưu thế thùy dưới - Khí thũng ưu thế thùy giữa	4 (20%) 14 (70%) 2 (10%)

Kết quả kỹ thuật

Van được sử dụng có kích thước 4,0 mm và 5,5 mm. Vị trí đặt van chủ yếu là phổi phải (80%) và ở thùy dưới (75%) (xem bảng 2).

Bảng 2: kích thước và vị trí van

Kích thước, vị trí	n	%
Kích thước: - 4,0 mm - 5,5 mm	10 10	50 50
Vị trí: - Phổi phải: + Thùy trên + Thùy giữa + Thùy dưới - Phổi trái: + Thùy trên + Thùy dưới	16 2 2 12 4 1 3	80 10 10 60 20 5 15
Tổng	20	100

Triệu chứng khó thở cải thiện sau đặt van 1 tháng và 3 tháng, nhưng chưa rõ rệt ($p > 0,05$). Chỉ số CAT và test đi bộ 6 phút được cải thiện rõ rệt sau khi đặt van 1 tháng và 3 tháng ($p < 0,05$). Test đi bộ 6 phút trung bình tăng dần sau 1 tuần, 1 tháng và 3 tháng với $p < 0,01$ (xem bảng 3).

Bảng 3: cải thiện về lâm sàng sau đặt van

Triệu chứng lâm sàng	Trước đặt van	Sau 1 tuần	Sau 1 tháng	Sau 3 tháng
Khó thở mức độ: - Nhẹ - Trung bình - Nặng	16 (80%) 4 (20%) 0	15 (75%) 3 (15%) 2 (10%)	17 (85%) 3 (15%) 0	18 (90%) 2 (10%) 0
Chỉ số CAT ($\bar{X} \pm SD$)	22,86 $\pm$ 1,34	22,01 $\pm$ 1,21	21,33 $\pm$ 1,64	20,89 $\pm$ 2,12
Test đi bộ 6 phút (m) ($\bar{X} \pm SD$)	305,6 $\pm$ 53,29	324,6 $\pm$ 56,83	339,4 $\pm$ 59,91	336,2 $\pm$ 46,48

Giá trị trung bình FEV1, FVC, PaO₂ tăng ở các thời điểm 1 tuần, 1 tháng, 3 tháng sau đặt van, nhưng chỉ có giá trị trung bình FVC và PaO₂ tăng rõ rệt với $p < 0,05$. Giá trị trung bình Raw giảm rõ rệt ở cả 3 thời điểm sau đặt van ($p < 0,05$) (xem bảng 4).

Bảng 4: cải thiện chức năng hô hấp sau đặt van

Chức năng hô hấp	Trước đặt van	Sau 1 tuần	Sau 1 tháng	Sau 3 tháng
FEV1 ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	32,6 $\pm$ 8,17	36,33 $\pm$ 11,23	33,4 $\pm$ 9,6	33,79 $\pm$ 11,72
FVC ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	60,06 $\pm$ 8,17	63,93 $\pm$ 16,57	65,73 $\pm$ 16,89	70,07 $\pm$ 30,29
RV ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	239,73 $\pm$ 61,23	không đo	232,57 $\pm$ 61,88	233,64 $\pm$ 54,85
TLC ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	132,13 $\pm$ 19,72	không đo	133 $\pm$ 23,32	135,28 $\pm$ 23,35
Raw ($\bar{X} \pm SD$) (%SLT)	714 $\pm$ 320,79	không đo	654,1 $\pm$ 347,8	684 $\pm$ 327,28
PaO ₂ ($\bar{X} \pm SD$) (mmHg)	70,87 $\pm$ 5,85	75,67 $\pm$ 8,72	69,06 $\pm$ 13,5	81 $\pm$ 15,3
PaCO ₂ ($\bar{X} \pm SD$) (mmHg)	45,27 $\pm$ 4,08	44,73 $\pm$ 5,48	46,66 $\pm$ 13,49	44,28 $\pm$ 5,57
SaO ₂ ($\bar{X} \pm SD$) (%)	94,27 $\pm$ 1,58	94,93 $\pm$ 1,79	94,2 $\pm$ 1,78	95,43 $\pm$ 46,48

Bảng 5 cho thấy, tỷ lệ chung các biến chứng cấp tính gặp trong và ngay sau thực hiện kỹ thuật là 70%, trong đó sốt 10%, xuất hiện đợt cấp của bệnh 20%, tăng huyết áp tức thì 40%, nhưng là biến chứng nhẹ và các bệnh nhân đều ổn định sau 3-5 ngày điều trị nội khoa. Chúng tôi không gặp các biến chứng nặng.

Bảng 5: tai biến, biến chứng của kỹ thuật

Tai biến, biến chứng	n	%
Sốt	2	10
Bùng phát đợt cấp	4	20
Tăng huyết áp tức thì	8	40
Tổng	14	70

Bàn luận

Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

Toàn bộ bệnh nhân là nam giới, tuổi trung bình $65,1 \pm 5,86$ tuổi, thời gian mắc bệnh $80,27 \pm 27,04$ tháng. Các bệnh nhân đều có biến chứng suy hô hấp mạn tính và ở giai đoạn nặng (FEV_1 $32,6 \pm 8,17\%$ SLT). Độ tuổi và mức độ nặng của bệnh nhân trong nghiên cứu tương tự như kết quả của các nghiên cứu trên thế giới: Wan I.Y và cs (2006) [9] thực hiện kỹ thuật ở những bệnh nhân có độ tuổi 63 ± 10 năm và FEV_1 rất thấp ($30 \pm 11\%$ SLT). Scirba F.C và cs (2010) thực hiện kỹ thuật ở nhóm bệnh nhân có độ tuổi $65,3 \pm 6,8$ năm [6]. Như vậy, điều trị giảm thể tích phổi bằng đặt van qua nội soi phế quản ống mềm có thể thực hiện được ở những bệnh nhân tuổi cao với COPD giai đoạn nặng.

Kết quả đo thể tích ký toàn thân và chụp cắt lớp vi tính cho thấy, 20 bệnh nhân đều có khí thũng phổi mức độ nặng (RV trung bình là $239,7 \pm 61,23\%$ SLT) và chiếm ưu thế ở thùy dưới (70%). De Oliveira và cs (2003), Herth và cs (2010) đều gặp vị trí khí thũng phổi chủ yếu là thùy trên [2, 3]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có sự khác biệt về vị trí khí thũng phổi của các bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi so với các tác giả. Điều này cũng dẫn đến sự khác biệt về vị trí đặt van trong các bệnh nhân nghiên cứu của chúng tôi so với các nghiên cứu trên thế giới.

Kết quả kỹ thuật

Kích thước van: chúng tôi sử dụng 2 loại van kích thước 4,0 mm và 5,5 mm. Vị trí đặt van chủ yếu là phổi phải (80%) và ở thùy dưới (75%). Theo các nghiên cứu đa trung tâm trên thế giới, hiệu quả cải thiện triệu chứng lâm sàng và chức năng phổi của kỹ thuật phụ thuộc vào vị trí thùy hay phân thùy (kích thước van) và số lượng van đặt. Bước đầu chúng tôi mới chỉ đặt mỗi bệnh nhân 1 van ở phế quản phân thùy hoặc phế quản thùy.

Về biến đổi triệu chứng lâm sàng: sau đặt van phế quản 1 tuần, 1 tháng và 3 tháng, chúng tôi nhận thấy triệu chứng khó thở được cải thiện nhưng chưa rõ rệt ($p > 0,05$). Chỉ số CAT và test đi bộ 6 phút được cải thiện rõ rệt sau đặt van 1 tháng và 3 tháng ($p < 0,05$): CAT trung bình sau 1 tháng là $21,33 \pm 1,64$; sau 3 tháng là $20,89 \pm 2,12$ so với trước điều trị là $22,86 \pm 1,34$; test đi bộ 6 phút trung bình tăng dần sau 1 tuần, 1 tháng và 3 tháng với $p < 0,01$. Nghiên cứu của De Oliveira và cs (2003) đặt van 1 chiều ở thùy trên 2 bên phổi sau 1 tháng thấy cải thiện khó thở và test đi bộ 6 phút [2]. Nghiên cứu VENT ngẫu nhiên có đối chứng, sử dụng van Zephyr tại 31

trung tâm, cho kết quả khả quan: điểm SGRQ tăng 2,8, test đi bộ 6 phút trung bình tăng 2,5% (Scirba F.C và cs, 2010) [6]. Nghiên cứu EURO VENT ngẫu nhiên có đối chứng, sử dụng van Zephyr tại 23 trung tâm, kết quả cho thấy điểm SGRQ tăng rõ rệt (từ 22,8 đến 46,3%), test đi bộ 6 phút tăng 8,8% (Herth và cs, 2010) [3]. Nghiên cứu của các tác giả trên thế giới cho thấy sự cải thiện lâm sàng ở các bệnh nhân sau đặt van từ từ và rõ rệt hơn sau đặt van 3-6 tháng [7, 8].

Về biến đổi chức năng hô hấp sau đặt van: nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, giá trị trung bình FEV_1 , FVC, PaO_2 tăng ở các thời điểm sau đặt van 1 tuần, 1 tháng, 3 tháng, nhưng chỉ có giá trị trung bình FVC và PaO_2 tăng rõ rệt với $p < 0,05$. Giá trị trung bình Raw giảm rõ rệt ở cả 3 thời điểm sau đặt van ($p < 0,05$). Wan I.Y và cs (2006) [9] đánh giá sau 3 tháng đặt van thấy FEV_1 tăng $10,7 \pm 26,2\%$. Nghiên cứu của Scirba F.C và cs (2010) [6] sau 3 tháng đặt van cho thấy FEV_1 tăng 4,3% (1,4 đến 7,2%). Như vậy, các nghiên cứu đều xác định có cải thiện FEV_1 rõ rệt sau 3 tháng đặt van. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy, các chỉ số FVC, PaO_2 tăng và Raw giảm rõ rệt sau đặt van ở cả 3 thời điểm so với trước điều trị, phù hợp với nghiên cứu của các tác giả nước ngoài. Kết quả này phù hợp với diễn biến lâm sàng là các bệnh nhân cải thiện khả năng hoạt động thể lực (test đi bộ 6 phút tăng) sau khi đặt van.

Tai biến, biến chứng sau đặt van: kết quả nghiên cứu trên bệnh nhân cho thấy, biến chứng cấp tính gặp trong và ngay sau thực hiện kỹ thuật là 70%, trong đó sốt 10%, xuất hiện đợt cấp của bệnh 20%, tăng huyết áp tức thì 40%, nhưng đều là các biến chứng nhẹ và các bệnh nhân đều ổn định sau 3-5 ngày điều trị nội khoa. Chúng tôi không gặp các biến chứng nặng như: viêm phổi, tràn khí màng phổi, suy hô hấp. De Oliveira H.G. và cs (2003) gặp bùng phát đợt cấp BPTNMT 11% (2/19 bệnh nhân), tràn khí màng phổi 11% (2/19 bệnh nhân), tăng tiết dịch phế quản phải lấy bỏ van là 5% (1/19 bệnh nhân) [2]. Scirba F.C và cs (2010) gặp tỷ lệ biến chứng chung là 4,2% (9/214 bệnh nhân), trong đó tràn khí màng phổi 4,2% (9/214 bệnh nhân), bùng phát đợt cấp 9,3% (20/214 bệnh nhân), viêm phổi 3,2% (7/214 bệnh nhân), ho máu 5,6% (12/214 bệnh nhân) [6]. Herth và cs (2010) thấy tỷ lệ biến chứng chung là 13,5% gồm tràn khí màng phổi 4,5% (5/111 bệnh nhân), viêm phổi 4,5% (5/111 bệnh nhân), ho máu 0,9% (1/111 bệnh nhân), suy hô hấp 3,6% [3].

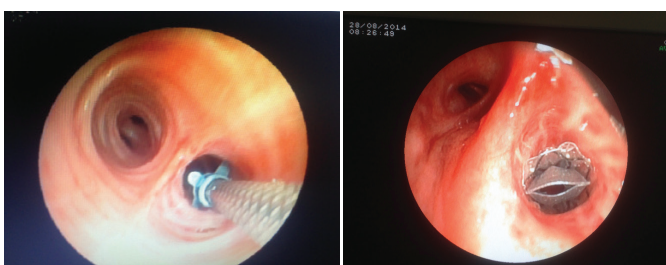
Kết luận

Bước đầu đánh giá kết quả nội soi đặt van phế quản một chiều sau 3 tháng ở 20 bệnh nhân BPTNMT, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

- Cải thiện khả năng hoạt động thể lực và chất lượng cuộc sống của bệnh nhân sau đặt van: chỉ số CAT và test đi bộ 6 phút có cải thiện rõ rệt sau khi đặt van 1 tháng và 3 tháng ($p < 0,05$).

- Cải thiện chức năng hô hấp ở bệnh nhân sau đặt van: giá trị trung bình FVC, PaO_2 tăng và Raw giảm rõ rệt ở cả 3 thời điểm sau đặt van ($p < 0,05$).

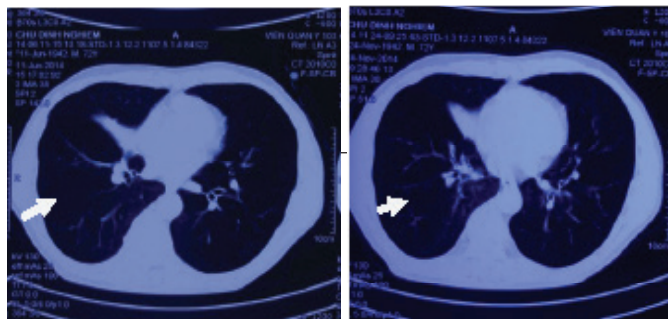
- Tỷ lệ biến chứng chung là 70%, đều là các biến chứng nhẹ.



Đo đường kính phế quản đặt van Van đã được đặt vào lòng phế quản phân thùy 9 phổi phải



Thực hiện kỹ thuật nội soi đặt van phế quản



Hình ảnh khí thũng phổi thùy dưới phổi phải trước đặt van (mũi tên)

Hình ảnh khí thũng phổi thùy dưới phổi phải sau đặt van 3 tháng (mũi tên)

Tài liệu tham khảo

- [1] Đồng Khắc Hưng, Tạ Bá Thắng (2014), "Nội soi phế quản làm giảm thể tích phổi điều trị khí thũng phổi (tổng quan)", *Tạp chí Y dược học quân sự*, **tập 39, số 2**, trang 92-98.
- [2] De Oliveira H.G, Macedo-Neto A.V, John A.B et al (2006), "Transbronchoscopic pulmonary emphysema treatment", *Chest*, **130**, 190-199.
- [3] Herth F.J, Gompelmann D, Ernst A, Eberhardt R (2010), "Endoscopic lung volume reduction", *Respiration*, **79**, 5.
- [4] Ingenito E.P, Wood D.E, Utz J.P (2008), "Bronchoscopic lung volume reduction in severe emphysema", *Proc. Am. Thorac. Soc*, **5**, 454.
- [5] Ninane V, Geltner C, Bezzi M et al (2012), "Multicentre European study for the treatment of advanced emphysema with bronchial valves", *Eur Respir J*, **39**, 1319.
- [6] Sciruba F.C, Ernst A, Herth F.J et al (2010), "A randomized study of endobronchial valves for advanced emphysema", *N Engl J Med*, **363**, 1233.
- [7] Snell G.I, Holsworth L, Borrill Z.L, Thomson K.R, Kalff V, Smith J.A, Williams T.J, The potential for bronchoscopic lung volume reduction using bronchial prostheses: a pilot study.
- [8] Valipour A, Herth F.J.F, Burghuber O.C et al (2014), "Target lobe volume reduction and COPD outcome measures after endobronchial valve therapy", *Eur Respir J*, **43**, 387-396.
- [9] Wan I.Y, Toma T.P, Geddes D.M et al (2006), "Bronchoscopic lung volume reduction for end-stage emphysema: report on the first 98 patients", *Chest*, **129**, 518.
- [10] Wood D.E, McKenna R.J, Yusem R.D et al (2007), "A multicenter trial of an intrabronchial valve for treatment of severe emphysema", *J Thorac Cardiovasc Surg*, **133**, 65.

Các thông số huyết động đo bằng USCOM có đủ độ tin cậy?

Nguyễn Thị Ngọc¹, Nguyễn Thúy Ngăn¹, Đoàn Ngọc Giang Lâm², Nguyễn Quốc Kính¹

¹Bệnh viện Việt - Đức

²Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

USCOM là phương pháp theo dõi huyết động bằng siêu âm hoàn toàn không xâm lấn, rẻ, không có tai biến. Tuy nhiên, chưa rõ các thông số huyết động đo bằng USCOM có độ tin cậy so với phương pháp xâm nhập PiCCO thường được sử dụng không? Mục tiêu của nghiên cứu này là so sánh mối tương quan và sự phù hợp của các thông số huyết động CI, SVRI, SVI, SVV đo bằng USCOM với đo bằng PiCCO. Nghiên cứu lâm sàng cắt ngang được thực hiện trên 30 bệnh nhân nặng có sẵn hệ thống PiCCO tại Bệnh viện Việt - Đức. Các giá trị cùng thời điểm của CI, SVRI, SVI, SVV được đo bằng USCOM (do bác sỹ hồi sức đã qua huấn luyện thực hiện) và bằng PiCCO. Độ tin cậy của các thông số huyết động đo bằng USCOM được đánh giá so với PiCCO. Kết quả cho thấy, các thông số huyết động đo bằng USCOM có tương quan thuận, mạnh, chặt chẽ và có sự phù hợp tốt so với đo bằng PiCCO (lần lượt $r=0,82$ với CI, $r=0,83$ với SVRI, $r=0,76$ với SVI, $r=0,56$ với SVV và $p<0,05$). Kết luận, các chỉ số huyết động đo bằng USCOM có độ tin cậy so với PiCCO.

Từ khóa: độ tin cậy, huyết động, PiCCO, USCOM.

Chỉ số phân loại 3.2

ARE THE HEMODYNAMIC PARAMETERS MEASURED BY USCOM RELIABLE?

Summary

USCOM is an ultrasound hemodynamic which is non-invasive, safe and cheap. However, the reliability of this method is questionable in comparison with the frequently used invasive PiCCO method. The objective of this study is to compare the correlation and the agreement between CI, SVRI, SVI, SVV measured by USCOM and those by PiCCO. A cross-sectional clinical study has been conducted in 30 critically ill patients at Viet Duc hospital. The hemodynamic values of CI, SVRI, SVI, SVV have been determined simultaneously but independently by USCOM and by PiCCO. The hemodynamic parameters of two methods have been compared to identify the reliability of USCOM. The results have shown the hemodynamic parameters measured by USCOM and PiCCO have not been statistically significantly biased and had strong correlation with a good agreement ($r=0.82$ for CI, $r=0.83$ for SVRI, $r=0.76$ for SVI, and $r=0.56$ for SVV respectively). In conclusion, the hemodynamic parameters of USCOM is reliable in comparison to PiCCO.

Keywords: hemodynamic, PiCCO, reliability, USCOM.

Classification number 3.2

Đặt vấn đề

Hồi sức bệnh nhân nặng cần phải theo dõi được các chỉ số huyết động chủ yếu, gồm chỉ số tim (CI), sức cản mạch máu ngoại vi (SVRI), thể tích nhát bóp (SVI) và biến thiên thể tích nhát bóp (SVV). Tuy CI và các thông số tính toán từ đó được xác định bằng phương pháp pha loãng nhiệt nhờ catheter luồn động mạch phổi vẫn được coi là “tiêu chuẩn vàng” từ năm 1970, nhưng hiện nay ít được dùng rộng rãi do kỹ thuật quá xâm lấn với nhiều biến chứng hơn là lợi ích đem lại. Thay vào đó, các phương pháp thăm dò huyết động ít xâm lấn hơn như PiCCO (theo dõi lưu lượng tim liên tục bằng xung mạch) được ưa chuộng hơn và đã trở thành thường quy trên thế giới [3, 8] cũng như ở Bệnh viện Việt - Đức. Một phương pháp theo dõi lưu lượng tim nói riêng và huyết động nói chung bằng siêu âm (USCOM: ultrasound cardiac output monitoring) ra đời năm 2005

tiên tại Bệnh viện Việt - Đức từ năm 2010 đến nay, dựa trên nguyên lý siêu âm Doppler đo vận tốc dòng máu chảy qua ổ van động mạch chủ hoặc ổ van động mạch phổi, có ưu điểm hoàn toàn không xâm lấn, đơn giản, dễ thực hiện và không có tai biến. Các thông số huyết động đo bằng USCOM đã được chứng minh đáng tin cậy so với bằng đầu dò đo dòng chảy (flow probe) ở động vật thực nghiệm và so với bằng pha loãng nhiệt ở người [10] nhưng chưa được so sánh nhiều với phương pháp đang sử dụng nhiều hiện nay là PiCCO. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành tại Bệnh viện Việt - Đức với mục tiêu so sánh các chỉ số huyết động gồm CI, SVR, SVI và SVV đo bằng USCOM với đo bằng PiCCO.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Trong thời gian từ tháng 4.2013 đến tháng 11.2014, đã nghiên cứu lâm sàng, tiến cứu, phân tích cắt ngang thực hiện trên 30 bệnh nhân tại Khoa Gây mê hồi sức Bệnh viện Việt - Đức, đo huyết động bằng PiCCO theo phác đồ thường quy. Các thông số huyết động đo bằng USCOM được bác sỹ có kinh nghiệm (đã qua lớp đào tạo của chuyên gia nước ngoài và có trên 50 lần đo) thực hiện độc lập và ngay trước khi đo huyết động bằng PiCCO. Mỗi bệnh nhân được đo 3 lần CI, SVRI, SVI, SVV bằng USCOM và PiCCO vào các thời điểm khác nhau. Đầu dò USCOM được đặt ở ổ van động mạch chủ và sóng Doppler được chọn có hình tam giác cân, sắc nét, âm thanh rõ nhất vì lúc đó bước sóng phát ra từ đầu dò ổn định nhất.

Các tiêu chí đánh giá độ tin cậy của các thông số huyết động đo bằng USCOM so với PiCCO:

+ Sự khác biệt và mức chênh lệch giá trị trung bình $\pm$ lệch chuẩn của các thông số huyết động CI, SVRI, SVI, SVV đo bằng USCOM so với đo bằng PiCCO.

+ Mối tương quan (hệ số r) của các thông số huyết động CI, SVRI, SVI, SVV đo bằng USCOM so với đo bằng PiCCO.

+ Sự phù hợp (agreement) Bland-Altman của các thông số huyết động CI, SVRI, SVI, SVV đo bằng USCOM so với đo bằng PiCCO.

Số liệu được xử lý trên SPSS 18.0, so sánh sự khác biệt theo test t-Student, hệ số tương quan r (Pearson) và sự phù hợp theo Bland-Altman được tính toán. Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê và khi $< 5\%$ các cặp giá trị nằm ngoài khoảng ± 2 SD là có sự phù hợp tốt.



Hình 1: sóng tín hiệu USCOM được chọn để đo các thông số huyết động

Kết quả

Đặc điểm chung của bệnh nhân

30 bệnh nhân gồm 24 nam (chiếm 80%) và 6 nữ (20%), có tuổi trung bình $52,3 \pm 21,4$ (cao nhất là 92 tuổi và thấp nhất là 20 tuổi) (bảng 1).

Bảng 1: chẩn đoán ở 30 bệnh nhân

Chẩn đoán bệnh	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
Sốc nhiễm trùng	11	36,6
Chết não sau chấn thương sọ não	5	16,7
Đa chấn thương	5	16,7
Ghép gan	3	10,0
Ngừng tuần hoàn	3	10,0
Suy hô hấp sau mổ	3	10,0

Nhận xét: đa số là các bệnh nhân nặng cần hồi sức do chấn thương.

Độ tin cậy của các chỉ số huyết động đo bằng USCOM so với bằng PiCCO

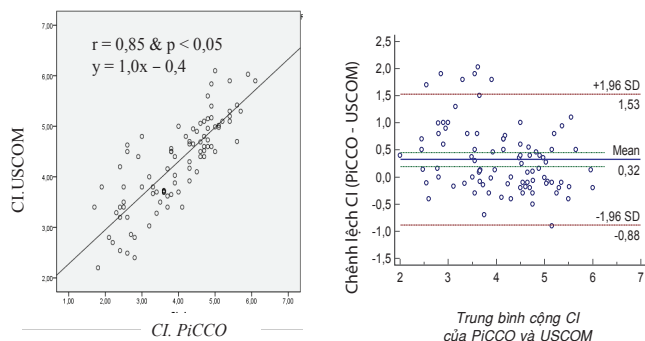
Chênh lệch các giá trị huyết động CI, SVRI, SVI, SVV đo bằng USCOM so với đo bằng PiCCO thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: sự khác nhau về các giá trị huyết động giữa USCOM và PiCCO

Thông số huyết động	Đo bằng USCOM	Đo bằng PiCCO	Chênh lệch (PiCCO-USCOM)
CI (ml/min/m²)	3,94±0,97	4,3±0,82	0,32±0,61
	p > 0,05		
SVRI (dynes/sec/ cm⁵/m²)	1884,9±725,3	1620,7±490,8	-249,2±403,6
	p > 0,05		
SVI (ml/m²)	35,2±8,7	39,32±9,33	4,2±5,5
	p > 0,05		
SVV (%)	21,2±7,72	17,2±6,8	-4,1±6,4
	p > 0,05		

Nhận xét: giá trị trung bình của CI, SRVI, SVI và SVV đo bằng hai phương pháp không khác nhau có ý nghĩa thống kê.

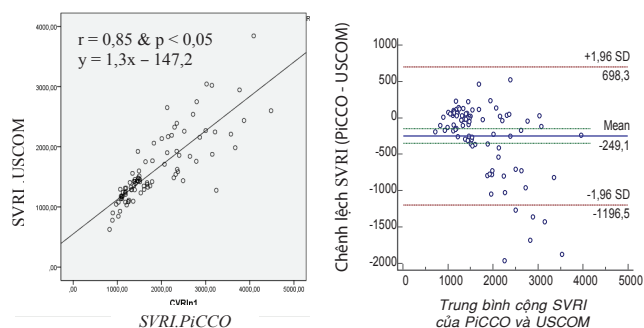
Mối tương quan và sự phù hợp giữa CI đo bằng USCOM và PiCCO thể hiện ở hình 2.



Hình 2: tương quan ($r=0,85$ với $p<0,05$) và sự phù hợp Bland-Altman giữa CI đo bằng USCOM và PiCCO

Nhận xét: có mối tương quan mạnh, chặt chẽ và sự phù hợp tốt giữa CI đo bằng hai phương pháp.

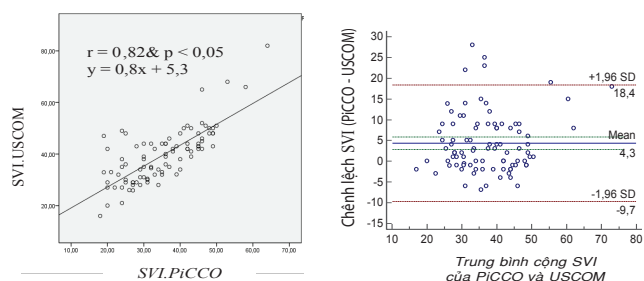
Mối tương quan và sự phù hợp giữa SVRI đo bằng USCOM và PiCCO thể hiện ở hình 3.



Hình 3: tương quan ($r=0,85$ với $p<0,05$) và sự phù hợp Bland-Altman giữa SVRI đo bằng USCOM và PiCCO

Nhận xét: có mối tương quan mạnh, chặt chẽ và sự phù hợp tốt giữa SVRI đo bằng hai phương pháp.

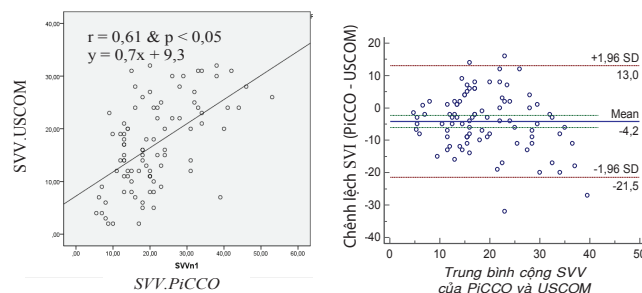
Mối tương quan và sự phù hợp giữa SVI đo bằng USCOM và PiCCO được trình bày ở hình 4.



Hình 4: tương quan ($r=0,82$ với $p<0,05$) và sự phù hợp Bland-Altman giữa SVI đo bằng USCOM và PiCCO

Nhận xét: có mối tương quan mạnh, chặt chẽ và sự phù hợp tốt giữa SVI đo bằng hai phương pháp.

Mối tương quan và sự phù hợp giữa SVV đo bằng USCOM và PiCCO được trình bày ở hình 5.



Hình 5: tương quan ($r=0,61$ với $p<0,05$) và sự phù hợp Bland-Altman giữa SVV đo bằng USCOM và PiCCO

Nhận xét: có mối tương quan mạnh, chặt chẽ và sự phù hợp tốt giữa SVV đo bằng hai phương pháp.

Bàn luận

Đặc điểm chung: các bệnh nhân trong nghiên cứu này đều là người lớn có tuổi trung bình $52,3 \pm 21,4$, cao nhất là 90 tuổi. Trên thế giới có nhiều nghiên cứu khẳng định độ tin cậy của thăm dò huyết động bằng USCOM cho các bệnh nhân từ sơ sinh (đủ tháng, thiếu tháng) đến người cao tuổi [1, 6, 7]. Các bệnh lý trong nhóm nghiên cứu này hay gặp tại Phòng Hồi sức ngoại khoa (như chấn thương, sốc nhiễm trùng, ghép gan...) phù hợp với các loại bệnh mà các tác giả khác áp dụng USCOM trong lâm sàng [4, 9, 10].

Độ tin cậy của các chỉ số huyết động đo bằng USCOM so với PiCCO: nghiên cứu trên 50 bệnh nhân mổ bắc cầu động mạch vành, Chand và cộng sự (2006) thấy giữa các giá trị lưu lượng tim đo bằng USCOM và bằng catheter Swan-Ganz có sự chênh lệch nhau không có ý nghĩa thống kê: $-0,14 \pm 0,79$ l/min và $-0,03 \pm 0,55$ l/min [2]. Khi đo lưu lượng tim ở 37 trẻ sơ sinh non tháng, Phillips và cộng sự (2006) thấy giá trị đo lưu lượng tim bằng USCOM và bằng siêu âm tim có tương quan mạnh, chặt chẽ với $r=0,91$ ($p<0,005$) và độ chênh lệch trung bình là $0,00 \pm 0,08$ l/min [7]. Phillips và cộng sự (2006) cũng chứng minh không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê về độ chênh lệch lưu lượng tim ($0,002 \pm 0,204$ l/min) đo bằng USCOM trên 23 bệnh nhân so với đo bằng các phương pháp khác như CardioWest (7 bệnh nhân), Fick (3 bệnh nhân), siêu âm tim (2 bệnh nhân) và catheter Swan-Ganz (11 bệnh nhân) [7]. Tiến hành nghiên cứu đo lưu lượng tim bằng USCOM và PiCCO trên 36 bệnh nhân

cộng sự (2005) cho thấy lưu lượng tim đo bằng hai phương pháp này có mối tương quan chặt chẽ với $r=0,79$ ($p<0,01$) và độ chênh lệch trung bình $-0,23\pm 1,01$ l/min [5]. Hoster và cộng sự nghiên cứu ở bệnh nhân sốc nhiễm trùng cũng thấy lưu lượng tim đo bằng USCOM và PiCCO có độ chênh lệch $0,36\pm 0,66$ l/min, có mối tương quan mạnh, chặt chẽ với $r=0,89$ ($p<0,05$) và có sự phù hợp tốt [4]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự về CI với hệ số tương quan $r=0,85$ ($p<0,05$), về độ chênh $0,32\pm 0,62$ l/min/m² (CI là lưu lượng tim CO/ diện tích cơ thể) và về sự phù hợp tốt.

Kết luận

So với phương pháp xâm lấn PiCCO, phương pháp hoàn toàn không xâm lấn USCOM cho các thông số huyết động CI, SVRI, SVI, SVV đáng tin cậy với giá trị trung bình khác nhau không có ý nghĩa thống kê, có mối tương quan mạnh, chặt chẽ và có sự phù hợp tốt với $r=0,85$ cho CI, $r=0,85$ cho SVRI, $r=0,82$ cho SVI, $r=0,61$ cho SVV.

Tài liệu tham khảo

[1] Chan G.P, Agarwal N, Sin K.K et al (2014), "Age-specific non-invasive transcutaneous Doppler ultrasound derived haemodynamic reference ranges in elderly Chinese adults", *BBA Clinical*, **2**, pp 48-55.

[2] Chand R, Mehta Y, Trehan N (2006), "Cardiac output estimation with a new Doppler device after off-pump coronary artery bypass surgery", *Cardiothorac Vasc Anesth*, **20(3)**, pp

315-319.

[3] Goedje O, Hoeke K, Lichtwarck-Aschoff M et al (1999), "Continuous cardiac output by femoral arterial thermodilution calibrated pulse contour analysis: comparison with pulmonary arterial thermodilution", *Crit Care Med*, **27**, pp 2407-2412.

[4] Horster S, Stemmler H.J, Strecker N (2012), "Cardiac Output Measurements in Septic Patients: Comparing the Accuracy of USCOM to PiCCO", *Critical Care Research and Practice*, Hindawi Publishing Corporation, **vol 212**, article ID 2706311, pp1-5.

[5] Knobloch K, Lichtenberg A, Winterhalter M et al (2005), "Non-invasive cardiac output determination by two-dimensional independent Doppler during and after cardiac surgery", *Annals Of Thoracic Surgery*, **80(4)**, pp 1479.

[6] Patel N, Dodsworth M, Mills J.F (2011), "Cardiac output measurement in newborn infants using the ultrasonic cardiac output monitor: an assessment of agreement with conventional echocardiography, repeatability and new user experience", *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, **96**, F206-F211.

[7] Phillips R, Paradisis M et al (2006), "CO measurement in preterm neonates: validation of USCOM against echocardiography", *Conference Paper: International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine*, Brussels, Belgium.

[8] Sakka S.G, Reinhart K, Meier-Hellmann A (1999), "Comparison of pulmonary artery and arterial thermodilution cardiac output in critically ill patients", *Intensive Care Med*, **25**, pp 843-846.

[9] Wilde R.B.P, Van den Berg D.C.M and Jansen J.R.C (2008), "Review of the PiCCO device; our experience in the ICU", *Neth J Critical Care*, **12(2)**, pp 4-60.

[10] Wong L.G, Young B.H, Young K.K (2008), Comparison of the USCOM Ultrasound Cardiac Output Monitor with Pulmonary Artery Catheter Thermodilution in Patients Undergoing Liver Transplantation", *Liver Transplantation*, **14(7)**, pp 1038-1043.

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ và triển vọng ứng dụng tại Việt Nam

Nguyễn Đình Tảo

Trung tâm Công nghệ phôi, Học viện Quân y

Tại Việt Nam, tới thời điểm hiện nay, hầu hết các cơ sở y tế đều áp dụng kỹ thuật chẩn đoán trước sinh để tư vấn về các bệnh di truyền, khi đó phôi đã trên 3 tháng tuổi. Kỹ thuật này gây ảnh hưởng rất nhiều tới sức khỏe của người mẹ khi quyết định phải bỏ thai. Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ “Pre-implantation Genetic Diagnosis” (PGD) cho phép các cặp vợ chồng có nguy cơ truyền các bệnh lý di truyền cho con có thể có cơ hội sinh con khỏe mạnh.

Nguyên tắc về kỹ thuật của PGD dựa trên việc thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) để tạo phôi, sau đó sinh thiết phôi và phân tích di truyền trước chuyển phôi. Sinh thiết phôi (embryo biopsy) có thể sinh thiết thể cực (polar body biopsy); sinh thiết phôi bào vào giai đoạn phân cắt của phôi (cleavage-embryo biopsy) hoặc sinh thiết phôi nang (blastocyst biopsy).

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ có thể được ứng dụng để chẩn đoán bất thường nhiễm sắc thể (NST): sử dụng kỹ thuật Fluorescent In situ Hybridization - FISH có thể chẩn đoán các bệnh liên quan đến NST như hội chứng Down, hội chứng Patau (Trisomy 13), hội chứng Edwards (Trisomy 18), hội chứng Klinefelter (XXY); sử dụng kỹ thuật QF-PCR (Quantitative PCR) hoặc kỹ thuật lai so sánh bộ gen (CGH= Comparative Genome Hybridization) có thể chẩn đoán được gần 200 bệnh đơn gen khác nhau, ví dụ bệnh Thalassemia, bệnh teo cơ tủy (Spinal muscular atrophy - SMA).

Tại Việt Nam, được sự hỗ trợ của Chương trình khoa học và công nghệ cấp nhà nước KC10/11-15, Học viện Quân y đã và đang triển khai đề tài “Nghiên cứu quy trình chẩn đoán một số bệnh di truyền trước chuyển phôi để sàng lọc phôi TTTON”, thực hiện trên bệnh nhân Thalassemia và SMA. Những kết quả của đề tài sẽ mang lại hạnh phúc cho những cặp vợ chồng với những đứa con khỏe mạnh.

Từ khóa: chẩn đoán di truyền tiền làm tổ, chẩn đoán trước sinh, NST, phôi.

Chỉ số phân loại 3.2

Giới thiệu chung

Tại Việt Nam, tới thời điểm hiện nay, hầu hết các cơ sở y tế đều áp dụng kỹ thuật chẩn đoán trước sinh để tư vấn về các bệnh di truyền, khi đó phôi đã trên 3 tháng tuổi. Kỹ thuật này gây ảnh hưởng rất nhiều tới sức khỏe của người mẹ khi quyết định phải bỏ thai. Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ “Pre-implantation Genetic Diagnosis” (PGD) cho phép các cặp vợ chồng có nguy cơ truyền các bệnh lý di truyền cho con có thể có cơ hội sinh con không mắc bệnh mà không phải chẩn đoán tiền sản sau khi mang thai và bỏ thai khi phát hiện bệnh lý ở thai. Kỹ thuật PGD dựa trên việc phát hiện các bất thường di truyền ở phôi và chỉ cấy trở lại vào lòng tử cung các phôi không có các bất thường về di truyền.

PGD được báo cáo lần đầu tiên trên thế giới vào

năm 1990. Trong bài báo đăng trên Tạp chí Nature, Handyside và cộng sự đã báo cáo các trường hợp có thai từ các phôi đã được sinh thiết và chẩn đoán di truyền bằng cách khuếch đại ADN đặc trưng cho NST Y. Tuy nhiên, từ khi kỹ thuật FISH bắt đầu được áp dụng trong PGD vào năm 1993-1994 để chẩn đoán các bất thường NST đã giúp cho PGD tiếp tục một bước phát triển mới khi người ta bắt đầu xác định được chuyển đoạn NST và ứng dụng vào PGD (năm 1996). Kỹ thuật chẩn đoán di truyền này giúp xác định các phôi không có các chuyển đoạn trước khi cấy vào tử cung.

Từ năm 1999, PGD lại được mở rộng chỉ định để chẩn đoán phôi có mang các gen liên quan đến các bệnh lý về sau này ở đứa trẻ. Chỉ định này cho phép bố mẹ có mang gen tiềm ẩn một bệnh lý được biết trước có thể sinh ra đời một trẻ hoàn toàn không mang

PRE-IMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS AND APPLICATION PROSPECT IN VIETNAM

Summary

At the moment, in Vietnam, almost health facilities are applying prenatal diagnosis while the embryos are 3 months old. This technique greatly affects the health of the mother to have an abortion decision. Pre-implantation genetic diagnosis (PGD) enables couples at risk of transmitting genetic disorders to have the opportunity of having healthy baby.

Principles of PGD technique is based on the implementation of in vitro fertilization (IVF) to create embryos, then make embryo biopsy and genetic analysis before embryo transfer.

Biopsy of embryos may be polar body biopsy, cleavage-embryo biopsy, or blastocyst biopsy.

PGD can be applied to diagnose abnormal chromosomes: using Fluorescent In Situ Hybridization technique (FISH) can diagnose diseases involving chromosome such as Down syndrome, Patau syndrome (Trisomy 13), Edwards syndrome (Trisomy 18), Klinefelter syndrome (XXY); in term of diagnosis of genetic abnormalities, using Quantitative PCR technique (QF-PCR) or Comparative Genome Hybridization (CGH) can diagnose nearly 200 different single-gene diseases such thalassemia, spinal muscular atrophy (SMA).

In Vietnam, under the support of KC10/11-15 program, Military Medical University has been implementing the project "Research on the procedure of diagnosis of some genetic diseases prior to embryo transfer to select IVF embryos" carried out on patients with Thalassemia and SMA. The results of the research are expected to bring infinite happiness for couples to have healthy babies.

Keywords: chromosome, embryos, pre-implantation Genetic Diagnosis, prenatal diagnosis.

Classification number 3.2

gen bệnh. Điều này mang đến khả năng ứng dụng rất lớn của PGD khi các nhà khoa học phát hiện ngày càng nhiều bệnh lý ở người có liên quan đến di truyền.

Kỹ thuật thực hiện

Nguyên tắc về kỹ thuật của PGD dựa trên việc thực hiện TTTON để tạo phôi, sau đó sinh thiết phôi và phân tích NST hoặc ADN bằng kỹ thuật FISH hoặc PCR (polymerase chain reaction). Nhìn chung kỹ thuật PGD gồm 3 bước:

Làm thủng màng trong suốt (zona drilling)

Kỹ thuật làm thủng màng trong suốt nhằm mục đích tạo một lỗ trên màng trong suốt. Thông qua lỗ thủng này, người ta sử dụng kim sinh thiết để hút các tế bào có trong phôi.

Làm thủng màng trong suốt có thể được thực hiện bằng nhiều cách khác nhau: sử dụng acid Tyrodes; xé màng zona bằng phương pháp cơ học; sử dụng tia laser không tiếp xúc.

Sinh thiết phôi (embryo biopsy)

Hiện nay, sinh thiết tế bào để làm chẩn đoán di truyền có thể thực hiện ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển của phôi: (i) Giai đoạn hợp tử: sinh thiết các thể cực; (ii) Giai đoạn phân chia vào ngày thứ 3, khoảng 6-8 tế bào: sinh thiết 1-2 phôi bào; (iii) Giai đoạn phôi nang: sinh thiết các tế bào thuộc lớp trophectoderm.

Sinh thiết thể cực (polar body biopsy): sinh thiết thể cực có ưu điểm là ít ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi, vì đây là các sản phẩm phụ bị loại bỏ trong quá trình phát triển của trứng và hợp tử. Ngoài ra, sinh thiết thể cực có thể được phối hợp với sinh thiết phôi bào để tăng độ chính xác của các chẩn đoán di truyền. Tuy nhiên, sinh thiết thể cực có nhược điểm lớn là chỉ có thể chẩn đoán các bất thường từ mẹ do thể cực chỉ chứa các NST xuất phát từ trứng. Ngoài ra, trong quá trình phát triển thể cực thứ nhất hay bị vỡ thành những mảnh nhỏ, điều này có thể dẫn đến việc thất thoát chất liệu di truyền, làm ảnh hưởng đến kết quả chẩn đoán.

Sinh thiết phôi bào vào giai đoạn phân cắt của phôi (cleavage-embryo biopsy): sinh thiết phôi được thực hiện vào ngày thứ 3 sau thụ tinh. Ở giai đoạn này, phôi có từ 6-8 phôi bào. Một đến hai phôi bào sẽ được sinh thiết để làm chẩn đoán về di truyền. Việc lấy đi 1-2 phôi bào trong giai đoạn này không gây ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi còn lại. Đây là kỹ thuật sinh thiết phôi phổ biến nhất hiện nay.

Trong trường hợp này, phôi bào sinh thiết cần được chẩn đoán di truyền sớm để dựa vào kết quả chẩn đoán này, người ta sẽ chọn phôi và cấy vào buồng tử

cung vào 1-2 ngày sau. Hiện tượng liên kết giữa các phôi bào có thể đã bắt đầu vào thời điểm này, để chuẩn bị sang giai đoạn phôi dâu vào ngày tiếp theo. Do đó, có thể gặp khó khăn khi sinh thiết phôi bào ở giai đoạn phân chia. Việc chẩn đoán di truyền được thực hiện chỉ trên 1 hoặc 2 tế bào có được cũng là một thách thức của kỹ thuật. Ngoài ra, hiện tượng khảm (mosaicism) vẫn có thể xảy ra ở giai đoạn này. Điều này dẫn đến kết quả chẩn đoán di truyền trên phôi bào sinh thiết được có thể không thể hiện chính xác cấu trúc di truyền của phôi.

Sinh thiết phôi nang (blastocyst biopsy): đây là một kỹ thuật mới, chỉ được ứng dụng lâm sàng gần đây. Phôi sẽ được nuôi cấy đến ngày thứ 5 hoặc 6 sau khi thụ tinh. Sau khi làm thủng màng trong suốt, trophectoderm bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt qua lỗ thủng. Một số tế bào (5-10 tế bào) thuộc lớp trophectoderm sẽ được sinh thiết để làm chẩn đoán di truyền.

Kỹ thuật này có một số ưu điểm nhất định. Chúng ta sẽ có nhiều tế bào hơn để thực hiện chẩn đoán di truyền. Phôi được sinh thiết ở giai đoạn này thường có sức sống cao hơn so với phôi giai đoạn phân cắt. Tuy nhiên, sinh thiết ở giai đoạn phôi nang cũng gặp một số bất lợi như trong quá trình nuôi cấy in vitro, nhiều phôi có thể không phát triển được đến giai đoạn phôi nang. Ngoài ra, kết quả di truyền chẩn đoán được có thể không thể hiện chính xác di truyền của phôi do hiện tượng khảm.

Phôi nang ở người có một lớp tế bào lá nuôi ở phía ngoài (Trophectoderm) sau này sẽ phát triển thành các phần phụ của thai và một khối tế bào cục phôi hay nụ phôi ở bên trong (inner cell mass) sẽ phát triển thành cơ thể thai. Những nghiên cứu gần đây đã tiến hành đánh giá số lượng của các tế bào ở giai đoạn phôi nang cho thấy số lượng đó xấp xỉ tương ứng lần lượt là: 60 tế bào, 80 tế bào và 125 tế bào của phôi nuôi cấy ngày 5, ngày 6 và ngày 7. Những phôi nang có bất thường về mặt hình thái chỉ có số tế bào rất ít, khoảng một nửa so với những con số nêu trên ở những giai đoạn nuôi cấy tương đương về mặt thời gian. Đến giai đoạn phôi nang nuôi cấy ngày thứ 7, số lượng tế bào lá nuôi tăng mạnh so với số lượng tế bào nụ phôi, chiếm khoảng 2/3 tổng số tế bào của phôi nang.

Kỹ thuật FISH (Fluorescent In situ Hybridization)

Các probes sử dụng tập trung vào các NST có ý nghĩa về mặt lâm sàng như: X, Y, 13, 18, 21 và có thể mở rộng với các NST 15, 16, 22. Khi bị lệch bội về các NST trên, phôi vẫn có thể tiếp tục làm tổ và phát

triển trong buồng tử cung. Trong đó, một số có thể tiếp tục phát triển thành thai nhi và sinh sống. Mỗi mẫu dò (probe) đặc trưng cho 1 NST và được đánh dấu huỳnh quang khác nhau để phân biệt. Với kỹ thuật hiện nay, chẩn đoán lệch bội với FISH có thể cho kết quả trong vòng 6-8 giờ. Các phôi bình thường, không phát hiện lệch bội với các NST trên, sẽ được cấy vào buồng tử cung. Ngoài ra, kỹ thuật FISH còn được dùng để chẩn đoán chuyển đoạn NST hoặc chẩn đoán giới tính để loại trừ các bệnh lý di truyền theo giới tính.

Tuy nhiên, dùng kỹ thuật FISH để chẩn đoán bất thường NST cũng có một số vấn đề về mặt kỹ thuật: mất NST trong lúc sinh thiết và cố định tế bào; lai thất bại; các NST chồng lên nhau, khó phân biệt; chỉ chẩn đoán được một số NST nhất định.

FISH là một kỹ thuật trung gian giữa di truyền tế bào và di truyền phân tử trên cơ sở sử dụng các trình tự dò NST có đánh dấu huỳnh quang. Sau khi cho lai trực tiếp trên NST của tế bào tại kỳ nghỉ, nhuộm màu huỳnh quang cho phép ta có thể phân tích xác định số lượng NST hoặc phát hiện chuyển đoạn NST được khảo sát thông qua các tín hiệu khi quan sát trên kính hiển vi huỳnh quang. Ưu điểm là có thể phát hiện bất thường một số NST thường gặp (với bộ kit chuyên dụng), tiến hành với 1 tế bào. Tuy nhiên, phương pháp này bị hạn chế bởi chi phí và thời gian cần thiết để làm kỹ thuật lớn. FISH là kỹ thuật khó khi cố định phôi bào (blastomeres). Một số nhược điểm có thể gặp phải bao gồm cả thất bại khi lai, chồng chéo tín hiệu có thể ảnh hưởng đến tính chính xác khi phân tích. Kỹ thuật FISH phân tích có thể có giá trị chẩn đoán đúng khoảng 83%. Kết quả sai có thể loại bỏ các phôi thai bình thường hoặc dẫn đến chuyển phôi bất thường. Khi làm FISH để phát hiện bất thường NST thì không còn vật liệu để khảo sát gen.

PGD với kỹ thuật PCR

Trước khi thực hiện PGD, cần xác định là việc chẩn đoán gen bệnh là khả thi. Điều này được thực hiện bằng cách lấy máu bố mẹ, xác định trình tự gen bệnh ở bố mẹ và thiết kế mồi. Điều này cần được thực hiện trước khi tiến hành TTTON để tạo phôi. Sau đó, thực hiện TTTON và nuôi cấy phôi. Sinh thiết phôi và cho các tế bào sinh thiết từ mỗi phôi cho vào tube chạy PCR và phân tích các gen bệnh. Chọn các phôi âm tính với gen bệnh để cấy vào buồng tử cung.

Các vấn đề về kỹ thuật của PGD với kỹ thuật PCR bao gồm: số lượng ADN giới hạn; khuếch đại thất bại; "Allelic drop out": chỉ 1 alen được khuếch đại; tạp nhiễm ADN ngoại lai.

Trong tương lai, kỹ thuật microarray với “ADN chip” hy vọng có thể được ứng dụng trong PGD. Kỹ thuật này giúp có thể chẩn đoán đồng thời lệch bội của tất cả NST, nhiều gen trên các NST khác nhau và chuyển đoạn NST cùng một lúc mà chỉ cần sinh thiết 1 tế bào.

Kỹ thuật QF-PCR (Quantitative PCR)

Là nhóm các kỹ thuật PCR định lượng với việc sử dụng nhân gen các trình tự ngắn đánh dấu huỳnh quang, qua đó đánh giá các biến đổi NST thông qua biến đổi liều lượng gen (Gene dosis): trisomy, monosomy.

Kỹ thuật PCR huỳnh quang và PCR định lượng (QF-PCR) dựa trên việc gắn huỳnh quang vào mỗi đầu của các trình tự ngắn đánh dấu gen cần phân tích hoặc mỗi đầu cho các trình tự lặp lại ngắn - STR. Sản phẩm PCR được giải trình tự và phân tích. Qua đó, xác định được tính chất sản phẩm PCR dựa vào màu sắc, kích thước và có thể phân tích liều lượng gen phát hiện các trường hợp lệch bội NST: trisomy hoặc monosomy.

Ưu điểm của kỹ thuật QF-PCR là có độ nhạy cao hơn, cho kết quả nhanh hơn và hiệu suất cao hơn khi phân tích nhiều mẫu, có thể phân tích cả bất thường NST hoặc bất thường gen trên cùng vật liệu ADN tách được. Người ta cũng sử dụng các trình tự STR hoặc Microsatellite để kiểm soát sự nhiễm chéo hoặc sự mất alen trong phản ứng PCR.

Nhược điểm của kỹ thuật này là không phân tích được các trường hợp thể khảm, chuyển đoạn, chiếm khoảng 5% tổng số các trường hợp bất thường NST thường gặp và có thể bị hiện tượng mất alen. Vì vậy, nếu phát triển được kỹ thuật QF-PCR trong PGD sẽ có cơ hội phân tích cả bất thường NST, trong khi vẫn phân tích được cả đột biến gen.

Kỹ thuật lai so sánh bộ gen (CGH= Comparative Genome Hybridization)

Bao gồm hai loại Array-CGH và Metaphase-CGH. Kỹ thuật này có thể đánh giá bất thường với cả 24 NST, trong khi kỹ thuật FISH chỉ đánh giá được một số NST. CGH sử dụng toàn bộ hệ gen như là một đầu dò đánh dấu và một kiểu nhân ở kỳ giữa được gắn trên một slide hiển vi với tư cách là đích. ADN hệ gen từ các tế bào bình thường được đánh dấu màu huỳnh quang và ADN hệ gen từ các tế bào khối u được đánh dấu một màu huỳnh quang khác, sau đó cả hai được trộn lẫn và lai ghép với nhau để đích các NST. Các vùng của NST đích sẽ hiện lên với những khác biệt về huỳnh quang giữa 2 màu và cho thấy sự khác biệt về số bản sao giữa hệ gen khối u và hệ gen bình thường, đồng thời cũng

cho thấy cả những đứt đoạn và khuếch đại. CGH đã trở thành một phương pháp chuẩn mực cho việc phân tích di truyền tế bào từ đầu những năm 90 của thế kỷ trước.

Các ứng dụng của chẩn đoán di truyền tiền làm tổ

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ có thể được chia làm 2 loại chính:

- Chẩn đoán bất thường NST: sử dụng kỹ thuật FISH, có thể chẩn đoán các bệnh liên quan đến NST như: hội chứng Down, hội chứng Patau (Trisomy 13), hội chứng Edwards (Trisomy 18), hội chứng Klinefelter (XXY).

- Chẩn đoán bất thường về gen: sử dụng kỹ thuật PCR có thể chẩn đoán được gần 200 bệnh đơn gen khác nhau, ví dụ bệnh Thalassemia, bệnh teo cơ tủy (Spinal muscular atrophy - SMA).

PGD có nhiều ưu điểm so với chẩn đoán tiền sản thông thường. *Thứ nhất*, có thể tránh được việc phải chấm dứt thai kỳ, bỏ thai. Việc chấm dứt thai kỳ khi phát hiện bệnh lý chẩn đoán tiền sản gặp phải các vấn đề về đạo đức sinh học, cũng như về sức khỏe, di chứng thể chất và tinh thần của người mẹ. *Thứ hai*, đây là một kỹ thuật thích hợp với các cặp vợ chồng bị chuyển đoạn NST, giúp loại trừ khả năng chuyển đoạn không cân xứng (unbalanced translocations) xuất hiện ở thai nhi, thường dẫn đến sảy thai liên tiếp. *Thứ ba*, thích hợp cho các cặp vợ chồng có nguy cơ sinh ra trẻ bị các bệnh lý thường gặp có nguyên nhân di truyền là gen lặn hay trội. *Thứ tư*, các cặp vợ chồng không chỉ có nhu cầu sinh con không bị bệnh mà còn có hệ HLA phù hợp để có thể sử dụng máu cuống rốn điều trị cho anh hoặc chị lớn đã có bệnh lý di truyền.

Tại Việt Nam, được sự hỗ trợ của Chương trình khoa học công nghệ cấp nhà nước KC10/11-15, Học viện Quân y đã và đang triển khai đề tài Nghiên cứu quy trình chẩn đoán một số bệnh di truyền trước chuyển phôi để sàng lọc phôi TTTON (mã số KC10.35/11-15), do GS.TS Nguyễn Đình Tảo làm chủ nhiệm. Đề tài được thực hiện trên bệnh nhân Thalassemia và SMA (teo cơ tủy) với những kết quả đáng ghi nhận.

Kết luận

PGD đã và đang trở thành một kỹ thuật phổ biến trong lĩnh vực di truyền và hỗ trợ sinh sản trên thế giới. Mục đích của PGD là tạo ra những thai kỳ mà thai nhi không bị các bất thường về gen và NST được tầm soát. Kỹ thuật thực hiện PGD ngày càng đơn giản, chính xác. Điều này giúp mở rộng các chỉ định của PGD nhằm loại trừ việc cấy các phôi có bất thường về gen hoặc NST vào tử cung.

Kỹ thuật PGD gắn liền với các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản. Gần đây, ngành hỗ trợ sinh sản ở Việt Nam đã có những bước tiến lớn và theo kịp trình độ các nước trong khu vực trong hầu hết các kỹ thuật. Sự kết hợp giữa hỗ trợ sinh sản và chẩn đoán di truyền để triển khai kỹ thuật PGD ở Việt Nam có thể sẽ là một bước phát triển tiếp theo của ngành y để theo kịp sự phát triển của y học thế giới.

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ PGD là kỹ thuật sàng lọc di truyền, chỉ chọn những phôi khỏe mạnh trước khi cấy phôi vào buồng tử cung, không ảnh hưởng tới sức khỏe bà mẹ. Vì vậy, PGD là một trong những yêu cầu quan trọng, cấp thiết và thực tiễn, có tính nhân văn. Nguyên tắc kỹ thuật của PGD dựa trên việc thực hiện TTON để tạo phôi, sau đó sinh thiết phôi và sàng lọc gen.

Tại Việt Nam, triển vọng trong 5 năm tới, PGD sẽ được áp dụng rộng rãi ở nhiều trung tâm thụ tinh ống nghiệm như Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Bệnh viện Phụ sản Từ Dũ, Trung tâm Di truyền - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP Hồ Chí Minh và có thể sàng lọc nhiều bệnh di truyền khác nhau, hy vọng sẽ mang lại hạnh phúc vô bờ bến cho những cặp vợ chồng khi có cơ hội có những đứa con khỏe mạnh.

Tài liệu tham khảo

1. Trương Đình Kiệt, Hồ Mạnh Tường (2011), *Thiết lập quy trình kỹ thuật trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ các phôi TTON*.
2. Nguyễn Viết Tiến (2012), *Nghiên cứu quy trình chẩn đoán một số bệnh di truyền trước chuyển phôi để sàng lọc phôi TTON*.

3. Devolder K (2005), "Preimplantation HLA typing: having children to save our loved ones", *Journal of Medical Ethics*, **31**, 582-586.
4. Desono P, Staessen C, Fauser B and Devroey P (2007), "Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF", *Human Reproduction Update*, **13**, 15-25.
5. Grace J, Toukhy T and Braude P (2004), "Preimplantation genetic testing", *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, **111**, 1165-1173.
6. Handyside A.H, Kontogiani E.H, Hardy K, Winston R.M.L (1990), "Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification", *Nature*, **344**, 768-70.
7. Katz M Fitzgerald, Bankier A et al (2002), "Issues and concern of couples presenting for PGD", *Prenatal Diagnosis*, **22**, 1117-1122.
8. Kuliev A, Verlinsky Y (2002), Current features of preimplantation genetic diagnosis", *Reprod Biomed Online*, **5**, 296-301.
9. Kuliev A and Verlinsky Y (2007), "Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications", *RBM online*, **16(4)**, 532-538.
10. Lalioti M (2008), "Can preimplantation genetic diagnosis overcome recurrent pregnancy failure?", *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, **20**, 199-204.
11. Munne S, Ary J, Zouves C et al (2006), "Wide range chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors", *Reprod Bio online*, **12**, 340-6.
12. Practice Committee of SART and Practice Committee of ASRM (2007), "Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion", *Fertility Sterility*, **88**, 1497-1504.
13. Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokina A, Sharapova T, Ozen S, Masciangelo C et al (2002), "Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition", *Reprod Biomed online*, **5**, 148-55.

Sử dụng quy hoạch thực nghiệm trong nghiên cứu bào chế viên nén felodipine giải phóng kéo dài hệ cốt thân nước

Hoàng Văn Đức¹, Nguyễn Thị Thanh Duyên², Võ Xuân Minh², Lê Quốc Huy³

¹Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế

²Trường Đại học Dược Hà Nội

³Công ty Cổ phần Dược phẩm Hà Tây

Nghiên cứu này sử dụng quy hoạch hóa thực nghiệm để thiết kế công thức bào chế viên nén felodipine giải phóng kéo dài (GPKD). Dựa trên kết quả thực nghiệm và phân tích của phần mềm Modde 8.0, đánh giá được quy luật ảnh hưởng của các biến đầu vào gồm HPMC E4M và HPMC E15LV lên các biến đầu ra là % giải phóng dược chất (GPDC) tại các thời điểm sau 2, 6 và 10 h. Đã lựa chọn được công thức tối ưu để bào chế viên nén felodipine GPKD hệ cốt thân nước đạt tiêu chuẩn về giải phóng *in vitro* theo yêu cầu đề ra. Động học GPDC từ viên tối ưu giống với viên đối chiếu và theo mô hình động học Korsmeyer - Peppas.

Từ khóa: felodipine, hệ cốt thân nước, hệ phân tán rắn, HPMC E15LV, HPMC E4M.

Chỉ số phân loại: 3.4

USING EXPERIMENTAL PLANNING METHOD TO PREPARE SUSTAINED-RELEASE FELODIPINE TABLETS WITH HYDROPHILIC MATRIX

Summary

This study used the experimental planning method to design the formula of sustained-release felodipine tablets. The process was optimized by taking the influences of the chosen excipients, including HPMC E4M, HPMC E15LV, on the drug release of the formulated tablets as the independent variables. Three dependent variables were the dissolubility percentage of felodipine release at the sampling times of 2 hs, 6 hs, 10 hs (Y_2 , Y_6 , Y_{10} respectively). The release profile of felodipine from the optimized formula almost met the predicted release profile and was similar to that of the reference tablets. The kinetics of drug release from the optimized tablets and reference tablets also complied with the Korsmeyer - Peppas model.

Keywords: felodipine, HPMC E15LV, HPMC E4M, hydrophilic matrix, solid dispersion.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Felodipine là một thuốc hạ huyết áp thuộc nhóm chặn kênh calci, là một trong những thuốc được ưu tiên lựa chọn sử dụng rất phổ biến trong và ngoài nước. Mặc dù hấp thu gần như hoàn toàn qua đường tiêu hóa và thời gian bán thải dài (11-25 h), nhưng felodipine có độ tan trong nước rất thấp, và bị chuyển hóa qua gan lần đầu nhanh nên các dạng viên quy ước thường có sinh khả dụng không cao (15-20%). Do đó, felodipine được bào chế dạng thuốc GPKD nhằm duy trì ổn định nồng độ điều trị trong máu, giảm tác dụng phụ.

Trên thế giới, dạng bào chế GPKD của felodipine được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu [2-5]. Tuy nhiên, ở Việt Nam dạng bào chế GPKD của felodipine vẫn chưa được nghiên cứu rộng rãi và còn nhiều hạn chế. Trong công trình này, chúng tôi sử dụng quy hoạch thực nghiệm để thiết kế công thức và tìm ra công thức tối ưu trong bào chế viên nén felodipine 5 mg GPKD.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Felodipine (Trung Quốc), HPMC E4M (Dow, Mỹ), HPMC E15LV (Dow, Mỹ), magnesi stearat (Trung Quốc), Aerosil (Trung Quốc), lactose monohydrat (Trung Quốc) và các hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn dược dụng.

Thiết bị nghiên cứu: máy thử độ hòa tan (ERWEKA DT600 - Đức), máy đo quang UV-VIS (HITACHI U-1900 - Nhật Bản), máy siêu âm đồng nhất (WiseClean - Hàn Quốc), máy đo pH (EUTECH Instrument - Thụy Điển), máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (Shimadzu CLASS-VP 5.03 - Nhật Bản), máy dập viên tâm sai Korsch (Đức), máy đo độ cứng Pharmatest PTB 511B (Đức) và các thiết bị, dụng cụ khác đạt tiêu chuẩn.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bào chế viên nén: viên nén felodipine được bào chế theo phương pháp dập thẳng: rây lactose monohydrat và HPMC qua rây 250, rây magnesi stearat và Aerosil qua rây 180. Cân các thành phần theo công thức bào chế. Trộn bột kép gồm HPTR chứa felodipine, lactose monohydrat, HPMC. Sau đó, trộn hỗn hợp bột kép với tá dược trơn magnesi stearat và Aerosil. Dập viên hình trụ lõm với khối lượng trung bình viên 215 mg, đường kính viên 9 mm, lực dập 2,5 tấn. Quy mô thực nghiệm 100 viên/mẻ.

Phương pháp bao màng bảo vệ: màng bao sử dụng polymer là HPMC E6 và HPMC E15, chất hóa dẻo PEG 4000. Bao mỗi mẻ 1000 viên nén felodipine và viên placebo vừa đủ 1,5 kg. Tiến hành bao trên máy bao phim KBC-BP-05 với thông số của máy bao được thiết lập: nhiệt độ khí vào 50-55°C, nhiệt độ khí ra 40-45°C, vận tốc quay của nồi bao 6-8 vòng/phút, vận tốc phun dịch 30 ml/phút, áp suất vòi phun 1 bar.

Phương pháp thử độ hòa tan: sử dụng máy thử độ hòa tan ERWEKA DT600 (Đức), kiểu giỏ tĩnh, cánh khuấy: môi trường hòa tan là 500 ml dung dịch natri lauryl sulfat (NaLS) 1% trong đệm phosphat pH 6,5, nhiệt độ 37±0,5°C, tốc độ khuấy 50 vòng/phút. 12 ml dịch hòa tan được lấy ra tại các thời điểm nghiên cứu, ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, định lượng dịch trong sau ly tâm theo phương pháp thêm chuẩn đo quang: đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử ở bước sóng 363,2 nm [8]. Yêu cầu GPDC: sau 2 h: 10-30%, sau 6 h: 42-68%, sau 10 h: ≥ 75%. Sử dụng viên đối chiếu Plendil® 5 mg GPKD (Astrazeneca, Thụy Điển).

Đánh giá sự tương quan giữa hai đồ thị giải phóng:

hệ số f_2 được tính theo công thức:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

trong đó: i là số thứ tự điểm lấy mẫu, n là số điểm lấy mẫu thử, R_t , T_t : % felodipine giải phóng tại thời điểm t của mẫu đối chiếu và mẫu thử. Hai đồ thị được coi là giống nhau khi f_2 có giá trị trong khoảng 50-100, f_2 càng gần 100 thì hai đồ thị càng giống nhau [1].

Đánh giá động học GPDC từ viên: sử dụng phần mềm MathCAD 14, phân tích dữ liệu hòa tan theo mô hình động học Wagner, bậc 0, Weibull, Higuchi, Hixson - Crowell, Korsmeyer - Peppas, Hopfenger, Hill, Weibull, Makoid - Banakar... Căn cứ vào giá trị AIC và R^2 hiệu chỉnh để xác định mô hình giải phóng phù hợp nhất cho viên, mô hình nào có giá trị AIC nhỏ nhất và R^2 hiệu chỉnh lớn nhất thì mô hình đó phản ánh đúng nhất động học giải phóng của viên.

Phương pháp quy hoạch thực nghiệm: sử dụng phần mềm MODDE 8.0, thiết kế thí nghiệm theo mô hình CCC.

Kết quả và thảo luận

Nghiên cứu thiết kế công thức viên nén felodipine GPKD

Qua tham khảo một số tài liệu [2-7] và khảo sát thực nghiệm, chúng tôi lựa chọn các tá dược sau để nghiên cứu bào chế viên nén felodipine 5 mg GPKD hệ cốt thân nước:

- HPMC: tá dược kiểm soát giải phóng felodipine theo cơ chế trương nở trong nước tạo thành hàng rào gel, làm chậm tốc độ GPDC. Môi trường hòa tan khuếch tán qua lớp gel thấm vào trong cốt hòa tan dược chất và cốt. Quá trình khuếch tán của dược chất từ dung dịch bão hòa bên trong cốt ra môi trường hòa tan.

- Lactose monohydrat: tá dược độn, hòa tan ăn mòn.

- Aerosil và magnesi stearat: tá dược trơn nhằm cải thiện độ trơn chảy của khối hạt, giảm ma sát, chống dính chày cối, làm bề mặt viên bóng đẹp, góp phần kiểm soát GPDC.

Thiết kế thí nghiệm

* Lựa chọn biến độc lập: qua tham khảo tài liệu và nghiên cứu sàng lọc, chúng tôi lựa chọn 2 tá dược có ảnh hưởng nhiều nhất đến sự GPDC từ viên làm biến đầu vào (biến độc lập), được ký hiệu và đưa ra các mức ở bảng 1.

Bảng 1: Ký hiệu và các mức của biến độc lập

Biến độc lập	Ký hiệu	Mức dưới (-1)	Mức gốc (0)	Mức trên (+1)
Khối lượng HPMC E4M	X_1	53,2	57,2	61,2
Khối lượng HPMC E15LV	X_2	15,2	20,2	25,2

Ghi chú: các biến đầu vào như tá dược trơn (magnesi stearat 2 mg, Aerosil 1 mg), hệ phân tán rắn felodipine (tương ứng 5 mg felodipine) là cố định, lactose thêm vào vừa đủ khối lượng viên (215 mg)

* Lựa chọn biến phụ thuộc: với mục tiêu bào chế được viên nén felodipine GPKD có mô hình giải phóng giống như viên đối chiếu, chúng tôi chọn biến phụ thuộc và các mức ở bảng 2.

Bảng 2: Ký hiệu và các mức của biến phụ thuộc

Biến	Ký hiệu	Mục tiêu	Giới hạn
% felodipine giải phóng sau 2 h	Y_2	15,46%	10-30%
% felodipine giải phóng sau 6 h	Y_6	49,64%	42-68%
% felodipine giải phóng sau 10 h	Y_{10}	89,80%	$\geq 75\%$

* Thiết kế thí nghiệm theo mô hình CCC trong phần mềm Modde 8.0 với 11 thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm ở tâm. Tiến hành bào chế và thử độ hòa tan của 11 công thức theo phương pháp đã trình bày ở mục "Phương pháp nghiên cứu" thu được kết quả trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: các mẫu viên và % felodipine giải phóng

Công thức	Biến độc lập		% GPDC từ viên thực nghiệm		
	HPMC E4M (X_1)	HPMC E15LV (X_2)	% GP 2h (Y_2)	%GP 6h (Y_6)	%GP 10h (Y_{10})
N1	53,2	15,2	22,1	61,11	102,5
N2	61,2	15,2	12,63	46,04	81,57
N3	53,2	25,2	17,2	53,69	100,07
N4	61,2	25,2	7,53	29,98	67,16
N5	51,544	20,2	19,84	61,85	102,33
N6	62,856	20,2	10,67	41,62	75,01
N7	57,2	13,13	16,8	51,09	97,59
N8	57,2	27,27	11,24	44,02	79,49
N9	57,2	20,2	13,23	49,39	88,02
N10	57,2	20,2	12,57	46,12	85,12
N11	57,2	20,2	14,55	49,55	88,86

Phân tích kết quả thực nghiệm

Sử dụng phần mềm Modde 8.0 để phân tích dữ

liệu về sự ảnh hưởng của biến độc lập lên biến phụ thuộc, kết quả được mô tả theo phương trình hồi quy bậc 2 có dạng:

$$Y_i = A_0 + A_1 \cdot X_1 + A_2 \cdot X_2 + A_{11} \cdot X_1^2 + A_{22} \cdot X_2^2 + A_{12} \cdot X_1 \cdot X_2$$

trong đó: Y_i là phần trăm dược chất giải phóng sau giờ thứ i ($i = 2, 6, 10$); $A_0, A_1, A_2, A_{11}, A_{22}, A_{12}$ là hệ số của phương trình hồi quy. Phần mềm cho kết quả phương trình hồi quy như bảng 4.

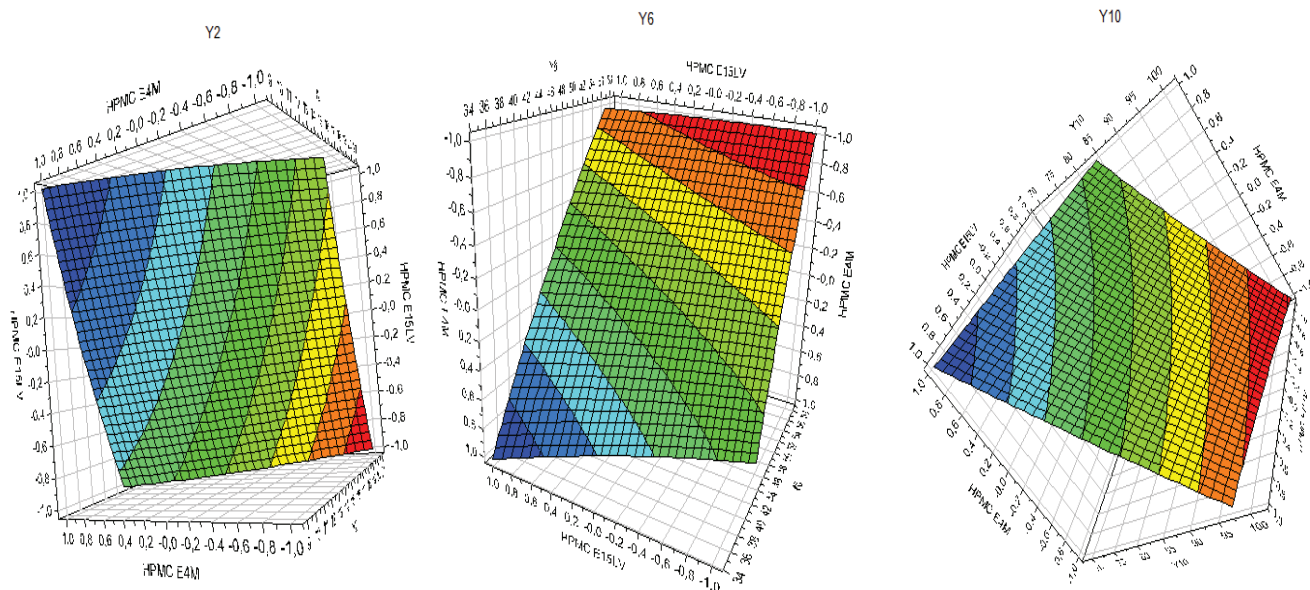
Bảng 4: kết quả phương trình hồi quy

$Y_2 = 13,45 - 4,01 \cdot X_1 - 2,23 \cdot X_2$	$R^2 = 0,96$; hệ số lặp lại = 0,94
$Y_6 = 48,3537 - 8,42443 \cdot X_1 - 4,18525 \cdot X_2$	$R^2 = 0,93$; hệ số lặp lại = 0,95
$Y_{10} = 87,3335 - 11,5606 \cdot X_1 - 5,30497 \cdot X_2$	$R^2 = 0,97$; hệ số lặp lại = 0,97

Nhận xét: ta thấy $R^2 > 0,9$ và hệ số lặp lại $> 0,9$, do vậy kết quả thực nghiệm là có ý nghĩa thống kê và có độ lặp lại tốt, mô hình tìm được là phù hợp, mô tả đúng kết quả thực nghiệm. Phương trình thể hiện sự ảnh hưởng của các biến độc lập đến GPDC từ viên. Nhìn vào phương trình hồi quy ta thấy, các yếu tố đầu ra Y_i phụ thuộc các yếu tố đầu vào X_i theo hàm số bậc nhất. Các hệ số của X_i đều (-) cho thấy khi tăng lượng HPMC E4M, HPMC E15LV thì đều làm giảm giải phóng felodipine từ viên.

Dữ liệu phân tích từ phần mềm cho thấy, khi tăng HPMC E15LV từ 13,13 lên 27,27 mg, giữ nguyên HPMC E4M thì % GPDC từ viên giảm: Y_2 giảm từ 16,8 xuống 11,24% (5,56%); Y_6 giảm từ 51,09 xuống 44,02% (7,07%); Y_{10} giảm từ 97,59 xuống 79,49% (18,1%). Khi tăng HPMC E4M từ 51,544 lên 62,856 mg, giữ nguyên HPMC E15LV thì % GPDC từ viên giảm: Y_2 giảm từ 19,84 xuống 10,67% (9,17%); Y_6 giảm từ 61,85 xuống 41,62% (20,23%); Y_{10} giảm từ 102,33 xuống 75,01% (27,32%). Cả 2 loại tá dược này đều tham gia vào tạo cốt kiểm soát GPDC. Trong đó, HPMC E15LV tạo gel nhanh, giúp kiểm soát giải phóng felodipine trong các giờ đầu, nhưng hàng rào gel này lỏng lẻo nên làm tăng nhanh tốc độ ăn mòn cốt - giúp điều chỉnh tốc độ ăn mòn hàng rào gel đặc biệt phù hợp cho kiểm soát GPDC ít tan hoặc tan kém trong nước. HPMC E4M là tá dược tạo gel nhanh khi gặp môi trường hòa tan, khống chế GPDC ra khỏi cốt. Hơn nữa, hàng rào gel do HPMC E4M tạo ra tương đối bền vững và duy trì một thời gian dài trong môi trường hòa tan, giúp kiểm soát GPDC trong các giờ sau và kiểm soát giải phóng mạnh hơn HPMC E15LV.

Sự ảnh hưởng của 2 tá dược lên % GPDC từ viên thể hiện rõ hơn thông qua một số mặt cắt sau:



Hình 1: ảnh hưởng của HPMC E4M, HPMC E15LV đến GPDC felodipine

Lựa chọn công thức tối ưu

Qua kết quả xử lý của phần mềm Modde 8.0, với yêu cầu của biến đầu ra có GPDC như viên đối chiếu, chúng tôi thu được công thức tối ưu cho các biến đầu vào là: HPMC E4M = 58,26 mg; HPMC E15LV = 16,95 mg.

Công thức tối ưu cho viên nén phần mềm dự đoán như sau: hệ phân tán rắn: 50 mg; HPMC E4M: 58,26 mg; HPMC E15LV: 16,95 mg; tá dược trơn: 3 mg (*Magnesi stearat*:*Aerosil* = 2 mg:1 mg); lactose monohydrat: vừa đủ 215 mg.

Tiến hành bào chế viên theo công thức tối ưu ở quy mô 1000 viên x 3 mẻ, thử độ GPDC từ viên. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: % giải phóng felodipine từ viên bào chế theo công thức tối ưu và mẫu viên đối chiếu ($n=12$, $\bar{X} \pm SD$)

	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	f_{2dc}	f_{2dd}
VĐC	15,46	30,61	49,64	68,02	89,80	100	
KQĐĐ	14,22		50,84		87,31		
Mê 1	14,52±0,14	30,82±0,39	48,70±1,74	68,38±2,08	87,95±2,14	92,09	89,24
Mê 2	14,89±0,22	31,25±0,48	51,09±1,51	64,41±2,34	86,14±2,78	79,10	94,72
Mê 3	15,15±0,16	32,74±0,33	50,03±1,83	70,89±2,27	93,33±2,03	80,37	71,67
Yêu cầu	10-30		42-68		≥ 75		

Ghi chú: KQĐĐ: % GPDC từ viên nén tối ưu do phần mềm Modde 8.0 dự đoán; f_{2dc} là so sánh giữa viên các mẻ với viên đối chiếu (VĐC); f_{2dd} là so sánh giữa viên các mẻ với kết quả sự đoán

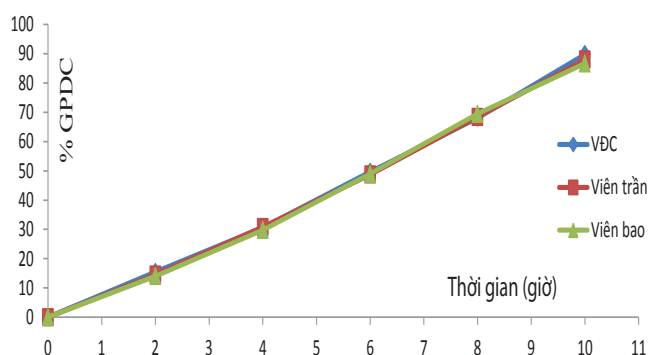
Nhận xét: từ số liệu ở bảng 5 cho thấy: Y_2 , Y_6 , Y_{10} đều đạt tiêu chuẩn đề ra. Với giá trị của $f_{2dd} > 70$ chúng tôi viên bào chế được theo công thức tối ưu so với dự đoán được coi là giống nhau và $f_{2dc} > 75$ chúng tôi viên bào chế theo công thức tối ưu cho giải phóng giống với viên đối chiếu Plendil® 5 mg GPKD (Astrazeneca, Thụy Điển). Như vậy, kết quả dự đoán phù hợp với thực nghiệm và viên bào chế theo công thức tối ưu đạt yêu cầu về kiểm soát GPDC.

Đánh giá ảnh hưởng của màng bao đến khả năng giải phóng felodipine

Để bảo vệ viên khỏi bị hút ẩm trong không khí, chúng tôi tiến hành bao màng bảo vệ. Thực nghiệm trên 3 mẻ, mỗi mẻ chứa 1000 viên nén felodipine và viên placebo vừa đủ 1,5 kg. Tiến hành trên máy bao phim KBC-BP-05 với các thông số của máy bao được thiết lập như trình bày ở phần “Phương pháp nghiên cứu”. Sau khi bao, tiến hành thử độ hòa tan so sánh với viên trần. Kết quả được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6: lực gây vỡ viên và % felodipine giải phóng

	% GPDC trung bình theo thời gian ($n=6$, $\bar{X}$)					Lực gây vỡ viên (N)
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	
VĐC	15,46	30,61	49,64	68,02	89,80	76,2±5,21
Viên trần	14,52	30,82	48,70	68,38	87,95	45,4±4,56
Viên bao	14,04	29,76	48,95	69,45	86,62	66,8±8,75



Hình 2: đồ thị biểu diễn % giải phóng felodipine từ viên trần, viên bao và viên đối chiếu

Nhận xét: sau khi bao màng khối lượng viên tăng lên xấp xỉ 4%, kết quả cho thấy độ cứng của viên được tăng lên rõ rệt nhưng tốc độ giải phóng felodipine theo thời gian của viên trần và viên bao là không khác nhau và tương đối đồng đều, gần giống như viên đối chiếu. Điều đó cho thấy, ảnh hưởng của màng bao tới khả năng giải phóng hoạt chất là không đáng kể. Vì vậy, công thức màng bao và quy trình bao được chọn để nghiên cứu tiếp.

Đánh giá động học giải phóng từ viên nén felodipine GPKD bào chế theo công thức tối ưu

Đánh giá động học giải phóng viên bao bằng phần mềm MathCAD 14, kết quả được trình bày ở bảng 7.

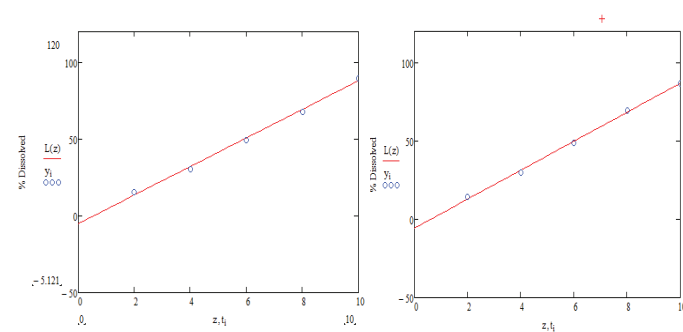
Bảng 7: phương trình động học GPDC của viên đối chiếu và viên thực nghiệm

Viên	Tên mô hình	Phương trình động học	R^2_{hc}	AIC
Viên đối chiếu	Bậc 0	$C(t) = -5,15 + 9,36.t$	0,995	8,554
	Korsmeyer - Peppas	$C(t) = 6,374.t^{1,145}$	0,999	2,418
Viên thực nghiệm	Bậc 0	$C(t) = -5,69 + 9,24.t$	0,998	4,893
	Korsmeyer - Peppas	$C(t) = 6,319.t^{1,142}$	0,998	3,364

Nhận xét: từ kết quả trên cho thấy, viên đối chiếu và viên thực nghiệm có mô hình giải phóng gần giống với mô hình bậc 0 và mô hình Korsmeyer - Peppas (đều có R^2_{hc} gần bằng 1), tuy nhiên hệ số AIC của cả 2 viên nhỏ nhất đều thuộc mô hình Korsmeyer - Peppas. Với mô hình Korsmeyer - Peppas, do hệ số mũ xấp xỉ bằng 1, nên động học giải phóng của viên cũng gần giống với mô hình động học bậc 0. Như vậy, viên đối chiếu và viên thực nghiệm tuân theo mô hình động học Korsmeyer - Peppas vì có AIC nhỏ nhất.

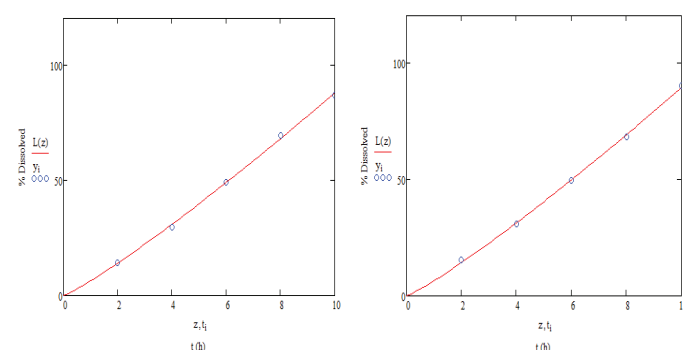
Phương trình động học: viên đối chiếu $C(t) = 6,374.t^{1,145}$; viên thực nghiệm $C(t) = 6,319.t^{1,142}$. Đây

là mô hình phù hợp với thuốc GPKD, được chất giải phóng khỏi dạng thuốc đảm bảo nồng độ điều trị trong thời gian dùng thuốc, phản ánh sự phù hợp đặc tính của dạng cốt trương nở, hòa tan chứa được chất ít tan trong nước.



(a) Mô hình bậc 0 của viên đối chiếu

(b) Mô hình bậc 0 của viên thực nghiệm



(c) Mô hình Korsmeyer-Peppas của viên đối chiếu

(d) Mô hình Korsmeyer-Peppas của viên thực nghiệm

Hình 3: đồ thị % GPDC từ viên đối chiếu và viên thực nghiệm

Kết luận

Đã sử dụng quy hoạch hóa thực nghiệm để thiết kế công thức bào chế viên nén felodipine GPKD. Dựa trên kết quả thực nghiệm và phân tích của phần mềm Modde 8.0, đánh giá được quy luật ảnh hưởng của các biến đầu vào gồm HPMC E4M và HPMC E15LV lên các biến đầu ra là % GPDC tại các thời điểm. Công thức tối ưu để bào chế viên nén felodipine GPKD hệ cốt thân nước được lựa chọn và cho viên đạt tiêu chuẩn về giải phóng *in vitro* theo yêu cầu đề ra. Động học GPDC từ viên tối ưu giống với viên đối chiếu và theo mô hình động học Korsmeyer - Peppas.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp nhà nước mã số KC10.15/11-15, thuộc Chương trình nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ tiên tiến phục vụ bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cộng đồng (KC10/11-15).

Tài liệu tham khảo

- [1] P. Costa et al (2001), "An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing", *Int. J. Pharm*, **200**, pp.77-83.
- [2] Karavas E. et al (2006), "Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **63(2)**, pp.103-197.
- [3] Kiran Kumar S. et al (2013), "Controlled release formulation development and evaluation of felodipine matrix tablets by using hydrophobic polymers", *International Journal of Pharmaceutics*, **4(1)**, pp.506-511.
- [4] Lee K.K et al (2003), "Controlled release composition comprising felodipine and method of preparation thereof", WO03/105905 A1.
- [5] Lee K.R, E.J Kim et al (2008), "Effect of poloxamer on the dissolution of felodipine and preparation of controlled release matrix tablets containing felodipine", *Archives of Pharmacal Research*, **31(8)**, pp.1023-1028.
- [6] Raess et al (2009), "Influence of some formulation factors on the release of Felodipine from extended release hydrophilic matrix tablets", *Farmaci*, **57(5)**, pp.582-588.
- [7] Tejaswi et al (2013), "Design and evaluation of felodipine extended release tablets employing a new starch based polymer", *International Journal of Biopharmaceutics*, **4(1)**, pp.27-33.
- [8] USP 34 - NF 29 (2011), "Felodipine Extended - Release Tablets", pp.2113.

Nghiên cứu sản xuất chế phẩm Etanercept bằng công nghệ protein tái tổ hợp dùng trong điều trị viêm khớp dạng thấp

Nguyễn Thị Thùy Trang, Đoàn Chính Chung, Nguyễn Mai Khôi, Nguyễn Minh Hòa, Đoàn Ngọc Trung, Đỗ Xuân Hòa, Trần Hữu Huy, Nguyễn Quang Huy, Hồ Nhân, Đỗ Minh Sĩ

Công ty TNHH Công nghệ sinh học dược Nanogen

Viêm khớp dạng thấp là bệnh tự miễn liên quan đến yếu tố TNF. Các nghiên cứu gần đây liên quan đến điều trị bệnh tập trung vào việc khóa con đường truyền tín hiệu liên quan tới TNF, mà một trong số các giải pháp đã được Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cấp phép là dùng Etanercept (một protein kép gồm thụ thể TNF và chuỗi nặng kháng thể người). Etanercept được sản xuất bằng công nghệ protein tái tổ hợp sử dụng tế bào CHO.

Công ty TNHH Công nghệ sinh học dược Nanogen đã thực hiện thành công Dự án xây dựng ngân hàng giống tế bào CHO có khả năng sản xuất Etanercept; tạo được quy trình nuôi cấy tế bào CHO có khả năng sản xuất khoảng 2 g Etanercept/lít lên men; tinh chế Etanercept với độ tinh khiết $\geq 94\%$, có hoạt tính sinh học đạt tiêu chuẩn làm thuốc tiêm và tương đương với thuốc đối chiếu Enbrel.

Từ khóa: CHO, Etanercept, protein tái tổ hợp, viêm khớp dạng thấp, yếu tố TNF.

Chỉ số phân loại 3.4

RESEARCHING AND DEVELOPING ETANERCEPT USING RECOMBINANT PROTEIN TECHNOLOGY FOR TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Summary

Rheumatoid Arthritis (RA) is an auto immunity disease that relates to the tumour necrosis factor (TNF). Recent studies concerning how to treat RA have focused on blocking the TNF signaling pathway. One of the TNF blocking agents that have been approved by FDA is Etanercept (a fusion protein containing TNF receptor and the human immunoglobulin). Etanercept has been produced by recombinant protein technology using CHO cell line. This project has been successfully done by establishing the master cell bank of CHO cells and the culturing process that could be able to produce approximately 2 g Etanercept per liter of cell broth, develop and validate the downstream process purify of Etanercept with the purity of over 94%, recovery rate of over 70%. The purified protein has the biological activity and the biosimilarity equal to the control drug (Enbrel).

Keywords: CHO, Etanercept, recombinant protein, Rheumatoid Arthritis, TNF.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Viêm khớp dạng thấp là bệnh viêm mạn tính ở nhiều khớp ngoại biên (khớp tay, chân, gối...). Bệnh xảy ra khắp nơi trên thế giới, tỷ lệ từ 0,5 đến 3% dân số trên 15 tuổi. Số người mới mắc bệnh hàng năm là 25-30 người/100000 dân. Bệnh gặp ở mọi lứa tuổi nhưng thường gặp nhất là tuổi 30-60, là độ tuổi lao động của xã hội [1]. Hiện nay, đã và đang có rất nhiều công trình trên thế giới và ở Việt Nam được công bố liên quan đến việc tìm ra nguyên nhân cũng như đề xuất biện pháp điều trị căn bệnh này. Trong những năm gần đây, các công trình nghiên cứu tập trung vào việc phát triển các liệu pháp nhằm vào các con đường truyền tín hiệu (signaling pathway) của việc hình thành và phát triển bệnh. Một trong số các biện pháp đó là sử dụng các thụ thể (receptor) khóa các yếu tố thể dịch liên quan đến tự miễn như TNF. FDA đã cấp phép lưu hành sản phẩm Etanercept (tên thương mại là Enbrel) từ năm 1998 [2, 6]. Etanercept là dạng protein kép, được tạo thành do quá

trình nối giữa thụ thể TNF và chuỗi nặng của kháng thể người. Etanercept kim hãm hoạt động của TNF α bằng cách liên kết cạnh tranh với TNF α , ngăn chặn TNF α liên kết với thụ thể nội sinh trên bề mặt tế bào bằng cách bất hoạt TNF α về mặt sinh học [4]. Etanercept được sản xuất bằng công nghệ protein tái tổ hợp sử dụng tế bào CHO. Dù đã được sử dụng rộng rãi trên thế giới hơn 10 năm nay, nhưng cho đến thời điểm hiện nay, Etanercept vẫn chưa hiện diện ở nước ta, chủ yếu là do rào cản về giá cả. Đây là một thiệt thòi cho ngành y tế nước ta, đặc biệt là cho các bệnh nhân viêm khớp dạng thấp đang có nguy cơ bị tàn phế, không thể tiếp cận với tiến bộ khoa học trên thế giới.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Tạo dòng tế bào CHO DG-44 mang gen sản xuất Etanercept

Gen mã hóa cho Etanercept (gồm phần 3' mã hóa cho vùng CH2-CH3 của chuỗi nặng kháng thể người và phần 5' mã hóa cho phần p75 của thụ thể TNF α người) được thiết kế dựa trên trình tự của Etanercept được công bố tại Drugbank và gửi đi tổng hợp bởi Công ty Genscript (Mỹ). Gen Etanercept được tạo dòng vào vector pZIC (là vector được thiết kế bởi Công ty TNHH Công nghệ sinh học Nanogen chuyên dùng cho biểu hiện protein ở tế bào CHO) tạo thành vector pZIC-ETA và được chuyển vào tế bào CHO DG44 (Invitrogen). Sau quá trình chọn lọc bằng kháng sinh, quá trình khuếch đại gen bằng MTX, quá trình tạo dòng đơn bằng phương pháp pha loãng tới hạn và quá trình chọn dòng tế bào đơn. Dòng tế bào DG44-pZIC-ETA được sử dụng để tạo ngân hàng tế bào giống và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu quy trình nuôi cấy tế bào DG44 sản xuất Etanercept

Quá trình nghiên cứu quy trình tế bào DG44-pZIC-ETA sản xuất Etanercept được thực hiện qua 2 giai đoạn: nuôi cấy nhỏ (chai 1 l) để tối ưu hóa các thông số cần thiết và lên men bồn 50 l [7]. Các nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy tế bào sản xuất Etanercept gồm môi trường nuôi cấy, quy trình bổ sung các chất dinh dưỡng, thời gian nuôi cấy, vận tốc lắc... Quá trình lên men lớn sản xuất Etanercept được tiến hành bằng hệ thống bồn lên men 50 l (Kuhner).

Nghiên cứu quy trình tinh chế Etanercept [4, 1]

Quy trình tinh chế Etanercept gồm các bước tiến hành như sau: sơ chế (clarification), tinh chế bằng sắc ký ái lực miễn dịch (immune affinity chromatography), sắc ký trao đổi ion (anion exchange chromatography), sắc ký lọc gel (gel filtration) và cô mẫu (protein concentration) [3].

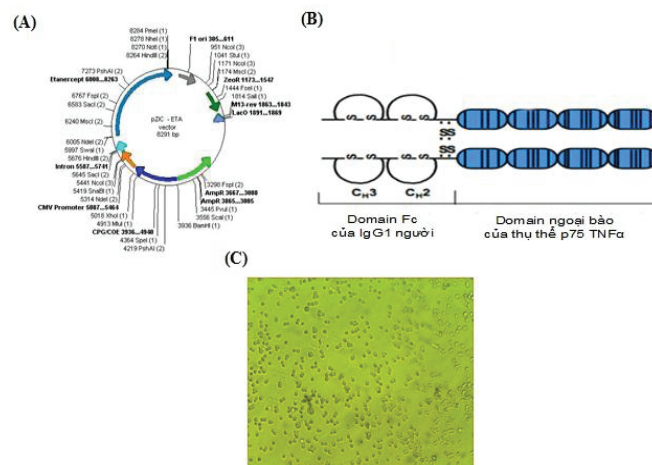
Quá trình sơ chế được thực hiện bằng hệ thống Akta Flux 6 (GE healthcare) sử dụng màng lọc 30KDa để loại bỏ các tạp dưới 30KDa và trao đổi dung dịch đệm. Quá trình tinh chế Etanercept được tiến hành trên hệ thống Akta Pilot và Akta Purifier của GE healthcare bắt đầu bằng sắc ký ái lực miễn dịch sử dụng gel Mabselect (GE healthcare) [5]. Gel Mabselect có liên kết với Protein A (là receptor cho phân đoạn Fc của kháng thể) sẽ tinh sạch >90% Etanercept. Dịch sau tinh chế sẽ được tiếp tục tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion (gel SP của GE healthcare) để loại bỏ tạp, endotoxin, DNA và peptid của tế bào chủ... Đồng thời, loại bỏ dimer và các Etanercept bị thủy phân bằng phương pháp lọc gel. Quá trình cô mẫu được tiến hành bằng hệ thống TFF của Satorius.

Nghiên cứu tương đương sinh học chế phẩm Etanercept

Quá trình nghiên cứu tương đương sinh học (Biosimilar) của chế phẩm Etanercept so với thuốc đối chứng Enbrel (Amgen) được tiến hành theo các quy định của ICH và WHO. Các nghiên cứu gồm có nghiên cứu tương đương về công thức, về nguồn gốc, chất lượng, tiền lâm sàng và lâm sàng.

Kết quả và bàn luận

Tạo dòng tế bào CHO DG-44 (hay DG44) mang gen mã hóa protein Etanercept



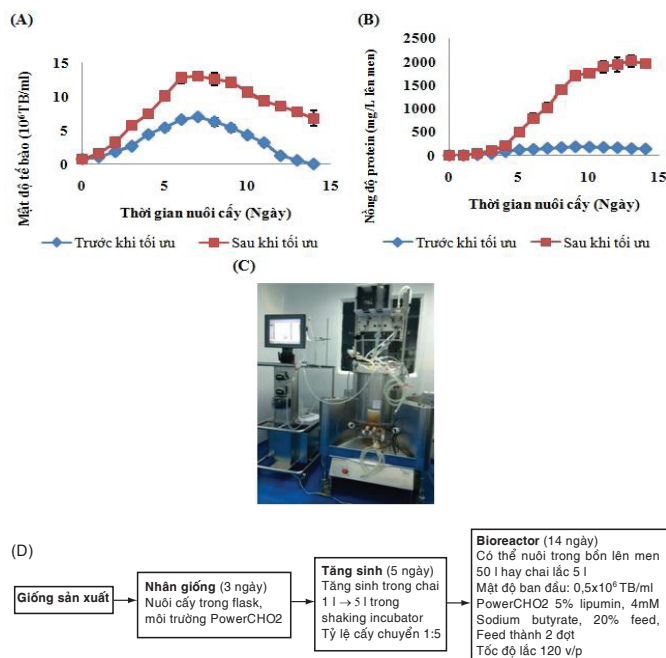
Hình 1: vector biểu hiện pZIC-ETA mang gen mã hóa cho Etanercept (A) và cấu trúc phân tử Etanercept (dimer với đầu C là domain CH2-CH3 của chuỗi nặng kháng thể người, đầu N là Domain ngoại bào p75 của thụ thể TNF α). (B). Tế bào DG44-pZIC-ETA nuôi cấy trong môi trường tăng sinh (C)

Etanercept có trình tự protein như sau:

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQM
CCSKCSPGQHAQVFCTKTSDTVCDSCEDSTYT
QLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQN
RICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGF

GVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICR
PHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPG
AVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPM
GPSPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPQVKFNWYVDGVQVHNAKTKPREQQYNST
YRVVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVSMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

Gen mã hóa protein Etanercept được tạo dòng vào vector pZIC-ETA gồm phần 3' mã hóa cho vùng CH2-CH3 của chuỗi nặng kháng thể người và phần 5' mã hóa cho vùng p75 của thụ thể TNF α người. Mỗi chuỗi polypeptid có trọng lượng phân tử 75Kda, dạng dimer sẽ có trọng lượng phân tử 150Kda. Việc sử dụng vùng Fc globulin miễn dịch như là yếu tố hợp nhất trong cấu trúc của một thụ thể nhai phân làm cho thụ thể TNF có hoạt tính sinh học và tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh dài hơn (hình 1A, 1B). Tế bào DG44-pZIC-ETA sau khi tạo dòng (hình 1C) được sử dụng để tạo ngân hàng tế bào chủng gốc và chủng sản xuất. Chủng gốc và chủng sản xuất được bảo quản trong nitơ lỏng. Tế bào DG44-pZIC-ETA được kiểm tra theo quy định của WHO, có ít nhất 10 copy của gen Etanercept được chèn vào bộ gen của tế bào chủ, không nhiễm Mycoplasma và virus động vật, ổn định về di truyền, có khả năng sản xuất khoảng 150-180 mg Etanercept/l.



Hình 2: nghiên cứu quy trình nuôi cấy sản xuất Etanercept. Đường cong tăng trưởng của tế bào DG44-pZIC-ETA (A) và đường biểu diễn nồng độ protein Etanercept (B) trước và sau khi tối ưu hóa, giá trị = Trung bình $\pm$ SD. Quy trình nuôi cấy Etanercept trong bồn lên men 50 l được đề xuất (C, D)

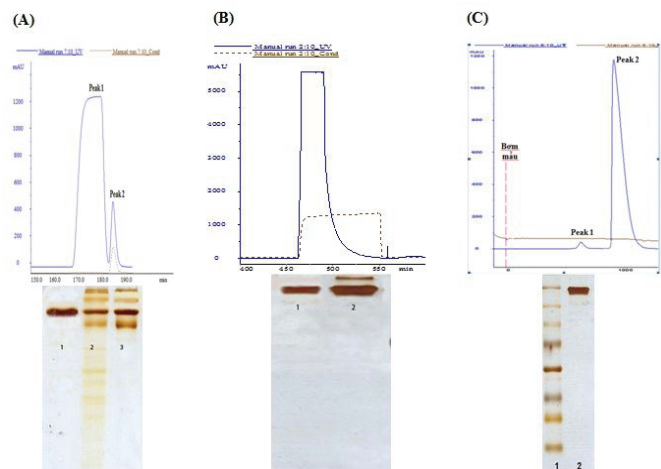
Kết quả nghiên cứu quy trình nuôi cấy tế bào DG44-pZIC-ETA nhằm sản xuất Etanercept

Các thông số của quy trình nuôi cấy tế bào DG44-pZIC-ETA sản xuất Etanercept đã được tối ưu hóa gồm: môi trường PowerCHO-2 (Lonza) cho hiệu suất nuôi cấy cao nhất, Lipumin 5% Sodium butyrat 4 mM. Kết quả nghiên cứu cho thấy: hàm lượng Etanercept biểu hiện tốt nhất đồng thời đảm bảo duy trì mật độ tế bào cao nhất. CHO Xtreme Feed (Lonza) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (20%) đảm bảo mật độ tế bào ở mức cao với thời gian lên men kéo dài và tiết kiệm chi phí nhất. Vận tốc lắc là 100 vòng/phút vào ngày thứ 3 (sau khi bổ sung môi trường), 110 vòng/phút vào ngày thứ 5 (sau khi bổ sung môi trường) và 120 vòng/phút vào các ngày tiếp theo sẽ cho hiệu quả nuôi cấy tốt nhất.

Quy trình nuôi cấy tế bào DG44-pZIC-ETA sản xuất Etanercept được đề xuất theo hình 2D. Sau khi áp dụng quy trình này để sản xuất Etanercept trong bồn lên men 50 l (hình 2C), mật độ tế bào đạt được cao nhất là 12×10^6 tế bào/ml, nồng độ protein Etanercept trước tinh chế là 1,8-2 g/l lên men (hình 2A, 2B).

Kết quả nghiên cứu quy trình tinh sạch Etanercept

Kết quả quá trình tinh chế Etanercept qua các bước tinh chế bằng sắc ký ái lực miễn dịch (hình 3A), sắc ký trao đổi ion (hình 3B), sắc ký lọc gel (hình 3C) được xây dựng và thẩm định. Quá trình này có khả năng tinh chế Etanercept với độ tinh sạch $\geq 94\%$, tỷ lệ thu hồi $>70\%$.



Hình 3: phổ đồ và bản điện di các giai đoạn tinh chế Etanercept. (3A) Cột 1: Etanercept chuẩn, cột 2: dịch nuôi cấy, cột 3: dịch Etanercept sau khi tinh chế qua cột ái lực; (3B) Cột 1: Etanercept chuẩn, cột 2: dịch Etanercept sau khi tinh chế qua cột anion; (3C) Cột 1: thang chuẩn protein, cột 2: dịch Etanercept sau khi tinh chế qua cột lọc gel

Kết quả nghiên cứu tương đương sinh học chế phẩm Etanercept

Bảng 1: kết quả tổng kết nghiên cứu tương đương sinh học của Etanercept

Thử nghiệm	Nội dung thực hiện	Etanercept của Nanogen	Etanercept đối chứng (Enbrel)
Đặc tính lý hóa	Nhận diện	Dương tính với kháng thể kháng Etanercept người.	Tương tự
	Trọng lượng phân tử	Khoảng 150Kda (dạng không khử) và 75Kda (dạng khử) sử dụng phương pháp SDS-PAGE, tương đương với thuốc đối chiếu Etanercept (Enbrel).	Tương tự
	Giải trình tự đầu N và đầu C	Amino acid đầu N có trình tự như sau: L-D-R-Q-V-A-F-T-P-Y, giống 100% so với đầu N của Etanercept người trong Drugbank. Amino acid đầu C có trình tự như sau: S-L-S-L-S-D-G, giống 100% so với đầu C của Etanercept người trong Drugbank.	Tương tự
Hoạt tính sinh học	Phương pháp tăng sinh tế bào A375	Thành phẩm Etanercept có hoạt tính 1,3-1,94 MIU/mg.	1,62 MIU/mg
Thử nghiệm bám thụ thể TNF α	ELISA	70-150 BU/20ng protein.	70-150 BU/20ng protein
Độ tinh khiết, tạp liên quan	Độ tinh sạch	$\geq 94\%$.	$\geq 94\%$
	Nội độc tố	≤ 2 EU/mg.	≤ 2 EU/mg
Lão hóa cấp tốc	Nhiệt độ 25°C, độ ẩm 65%	Etanercept ổn định trong 3 tháng ở điều kiện nhiệt độ 25°C, độ ẩm 65%.	Không tiến hành
Thử nghiệm tiền lâm sàng	Dược động học, dược lực học tiền lâm sàng	Dược lực học tiền lâm sàng: quá trình nghiên cứu dược lực học tiền lâm sàng của sản phẩm Etanercept được thiết kế dựa trên khả năng trung hòa yếu tố TNFα trung gian gây ức chế tăng trưởng tế bào A375. Kết quả cho thấy, Etanercept của Công ty Nanogen có hoạt tính làm trung hòa yếu tố TNFα trung gian gây ức chế tăng trưởng tế bào A375 với hoạt tính nằm trong khoảng 1,3-1,94 MIU/mg tương đương với mẫu chuẩn. Dược động học tiền lâm sàng: sau các liều tiêm nhắc lại, Etanercept chủ yếu lưu hành trong máu, không tích tụ tại các cơ quan gan, thận, lách. Trong nghiên cứu này, Etanercept lưu hành trong máu và một phần bị bài tiết theo con đường nước tiểu, phần khác sẽ bị phân hủy theo cơ chế tự nhiên bên trong cơ thể (enzym protease phân giải). Etanercept có thời gian bán rã (half life) trong máu chuột khoảng 15,1 h.	Không có số liệu
	An toàn tiền lâm sàng	Độc tính cấp: kết quả thử nghiệm độc tính cấp của Etanercept (với 3 liều khảo sát: liều thấp 1 mg/kg thể trọng, liều trung bình 5 mg/kg thể trọng và liều cao 15 mg/kg thể trọng) trên chuột với các đường tiêm tĩnh mạch, tiêm cơ và đường uống không cho thấy các dấu hiệu sinh lý bất thường như xù lông, chán ăn, ủ rũ... Các kết quả phân tích đại phẫu và mô học của chuột cũng không thể hiện dấu hiệu bất thường, xung huyết hay hoại tử của các cơ quan gan, thận, lách. Độc tính trường diễn: thử nghiệm được tiến hành với 3 liều khảo sát: liều thấp 1 mg/kg thể trọng, liều trung bình 5 mg/kg thể trọng và liều cao 15 mg/kg thể trọng, động vật thí nghiệm được tiêm 2 lần/tuần, trong vòng 8 tuần, không có bất kỳ dấu hiệu bất thường nào được ghi nhận ở các chỉ số sinh hóa máu, nước tiểu, huyết học của động vật thí nghiệm so với nhóm đối chứng. Các kết quả phân tích đại phẫu và mô học của chuột cũng không thể hiện dấu hiệu bất thường, xung huyết hay hoại tử của các cơ quan gan, thận, lách. Tính quá mẫn miễn dịch: thử nghiệm phản ứng quá mẫn miễn dịch được thực hiện trên chuột lang để khảo sát độc tính miễn dịch của sản phẩm Etanercept của Nanogen. Khảo sát ở 2 mức độ liều: liều cao (15 mg/kg thể trọng) và liều thấp (1 mg/kg thể trọng). Sau giai đoạn 2 tuần gây nhạy cảm với thuốc, chuột được tiêm 1 lần nữa với 1 liều cao (15 mg/kg thể trọng) vào tĩnh mạch ở tuần thứ 3 và kiểm tra tính quá mẫn của chuột. Tính kích ứng tại chỗ: kết quả thử nghiệm tiêm dưới da trên thỏ cho thấy Etanercept không gây tính kích ứng tại chỗ tiêm trên mô hình động vật thí nghiệm với liều khảo sát 15 mg /kg thể trọng. Độc tính di truyền (in vitro): dưới các điều kiện thử nghiệm, Etanercept do Nanogen sản xuất không gây độc tính di truyền.	

Kết luận

Dòng tế bào DG44-pZIC-ETA sau khi tạo ra được sử dụng trong nghiên cứu quy trình sản xuất Etanercept. Quy trình nuôi cấy tế bào được tối ưu hóa với môi trường và các chất dinh dưỡng được bổ sung phù hợp. Quy trình này có khả năng sản xuất ra Etanercept với hàm lượng khoảng 2 g/l lên men. Quy trình tinh chế đã được hoàn thiện để tạo ra protein Etanercept với độ tinh khiết >94%, trọng lượng phân tử đạt 150Kda (dạng không khử, phân tử tồn tại dạng dimer), 75Kda (dạng khử, phân tử dạng monomer). Sản phẩm protein sau tinh chế đạt tiêu chuẩn nội độc tố (theo EP 7.0), có hoạt lực (được thử nghiệm trên dòng tế bào A375) đạt khoảng 1,62 MIU/mg protein. Đồng thời, nghiên cứu cũng đã chứng minh tính tương đương sinh học với sản phẩm với thuốc đối chứng Enbrel.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Đăng Dũng, Phạm Mạnh Hùng, Lê Văn Đông (2011), “Miễn dịch học trong điều trị viêm khớp dạng thấp”, *Tạp chí thông tin Y Dược*, **10**, 47-54.
- [2] Emery P (2006), “Treatment of rheumatoid arthritis”, *BMJ*, **332(7534)**, 152-155.
- [3] Farhner R.L, Knudsen H, Basey C.D, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, Blank G.S (2001), “Industrial purification of pharmaceutical antibodies: Development, operation and validation of chromatography processes”, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **18**, 301-327.
- [4] Feldmann M (2002), “Development of anti- TNF therapy for rheumatoid arthritis”, *Nature Reviews Immunology*, **2(5)**, 364-371.
- [5] General Electric Co. (GE) (2002), *Antibody Purification Handbook*, chapter 3, 27-45.
- [6] Roy F, Dave S.H (2003), “Developing a new generation of TNF α Antagonists for treatment of Rheumatoid Arthritis”, *Molecular interventions*, **3(6)**, 310-317.
- [7] Wurm F (2004), “Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells”, *Nature Biotechnology*, **22(11)**, 1393-1398.

Nghiên cứu bào chế thuốc tiêm Paclitaxel dạng dung dịch pha tiêm truyền và dạng bột đông khô

Nguyễn Thanh Hà¹, Lê Minh Trí²
Lê Nguyễn Nguyệt Minh², Nguyễn Thiện Hải²

¹ Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh

² Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu cải thiện độ tan của Paclitaxel (PTX), trên cơ sở đó bào chế chế phẩm thuốc dạng tiêm. Công thức thuốc tiêm pha truyền tĩnh mạch chứa PTX với 2 dạng bào chế: dung dịch đậm đặc và bột đông khô, được xây dựng bằng 2 phương pháp: sử dụng chất trung gian hòa tan (Kolliphor ELP®) và tạo phức với 2-hydroxyl propyl β cyclodextrin (HP β CD). Sự phân bố thuốc trên mô thử của dạng dung dịch đậm đặc gần tương tự như của thuốc đối chiếu Stragen®, trong khi thuốc bột đông khô cho thấy, nồng độ PTX trong huyết tương thấp hơn thuốc đối chiếu nhưng nồng độ thuốc phân phối vào các mô cao hơn. Đánh giá sơ bộ độ ổn định cho thấy, hai dạng chế phẩm đều đạt các chỉ tiêu đặt ra.

Từ khóa: đông khô, Kolliphor ELP, Paclitaxel, 2-hydroxyl propyl β cyclodextrin.

Chỉ số phân loại 3.4

PREPARATION OF PACLITAXEL INTRAVENOUS DRUG AT CONCENTRATED SOLUTION AND LYOPHILIZED POWDER DOSAGE FORMS

Summary

The aim of this research is to enhance solubility of Paclitaxel (PTX) and develop PTX formulations for intravenous (IV) infusion. The two PTX dosage forms for IV infusion, concentrated solution and lyophilized powder, have been formulated by 2 different methods: using solubilized agent (Kolliphor ELP®) and complexation (using 2-hydroxyl propyl β cyclodextrin - HP β CD) respectively. PTX plasma concentration and tissue distribution (rabbits have been used as test animals) of the concentrated solution have been similar to those of Stragen® (reference drug), while PTX plasma concentration of the lyophilized powder has been lower than Stragen®'s; the former's tissue distribution has been higher than those of the latter. Short-term stability tests under normal and stress conditions have shown that the two dosage forms meet expected standards.

Keywords: Kolliphor ELP, lyophilization, Paclitaxel, 2-hydroxyl propyl β cyclodextrin.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Bệnh ung thư ngày càng trở nên phổ biến trong xã hội hiện đại với tỷ lệ tử vong gia tăng rất nhanh, chỉ đứng hàng thứ hai sau các bệnh về tim mạch. PTX là một hoạt chất được chấp nhận sử dụng trong điều trị ung thư vú, ung thư cổ tử cung và ung thư phổi tế bào nhỏ. PTX hấp thu kém qua đường tiêu hóa, phân bố vào các mô kém nên sinh khả dụng thấp, chủ yếu được dùng qua đường tiêm truyền tĩnh mạch (nồng độ 0,3-1,2 mg/ml) [1]. Bên cạnh đó, PTX tan rất kém trong nước cũng như một số dung môi thông dụng nên gặp nhiều khó khăn trong việc nghiên cứu dạng thuốc dùng qua đường tiêm truyền. Các nghiên cứu trên thế giới hiện nay chủ yếu tập trung cải thiện độ tan và nâng cao sinh khả dụng của chế phẩm PTX nhưng vẫn chưa có dạng bào chế nào thật sự nổi trội, chủ yếu vẫn là dung dịch đậm đặc pha truyền tĩnh mạch [2, 3, 5]. Ở Việt Nam hiện nay chưa có nghiên cứu nào về cải thiện độ tan PTX làm chế phẩm tiêm truyền.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm các mục tiêu: 1) Xây dựng công thức và quy trình bào chế dạng thuốc tiêm dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm chứa PTX; 2) Xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm của các chế

phẩm; 3) Xác định sự phân bố trong mô và trong huyết tương của chế phẩm, so sánh với thuốc ngoại nhập; 4) Theo dõi độ ổn định của các chế phẩm bào chế được trong điều kiện tự nhiên và lão hóa cấp tốc ở 25°C.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng: nguyên liệu PTX đạt tiêu chuẩn USP.35 [4]. Chế phẩm đối chiếu PTX Stragen® 30 mg/5 ml (hãng Haupt Pharma Wofratshausen GmbH - Đức, số lô X070, VN1-423-11).

Nguyên liệu: Kolliphor ELP®, Tween® 80, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Kleptose®), Pearlitol®, ethanol khan, acid citric, polyethylen glycol 400, polyvinyl pyrrolidon K30 (PVP K30), amoni acetat.

Thiết bị: máy sắc ký lỏng Shimadzu SPD M20A, máy đông khô Christ Delta 2-24 LSC Plus, máy ly tâm thường MRC, máy ly tâm lạnh MICRO 220R, máy vortex IKA ms3, máy lọc tế bào SONICATOR 3000, buồng già hoá cấp tốc Binder (Đức), máy theo dõi độ ổn định dài hạn LG (Hàn Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng quy trình định lượng PTX và tạp chất liên quan của PTX trong chế phẩm: hàm lượng PTX và tạp chất liên quan của PTX (tạp chính là 10-deacetyl-7-epiPTX - tạp B) được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [4].

Xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc tiêm truyền chứa PTX với hai dạng bào chế dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền:

- Khảo sát tính chất lý hóa của chế phẩm, đối chiếu về các chỉ tiêu cảm quan, hàm lượng và độ ổn định sau khi pha loãng trong các dung dịch tiêm truyền.

- Xây dựng công thức dung dịch PTX bằng phương pháp dùng chất trung gian hòa tan. Khảo sát loại, tỷ lệ chất trung gian hòa tan và dung môi hòa tan PTX: pha chế dung dịch PTX nồng độ 6 mg/ml bằng các hệ dung môi Tween 80 - ethanol khan (T80-E) hoặc Kolliphor ELP - ethanol khan (K-E) với các tỷ lệ khác nhau. Pha loãng các dung dịch đậm đặc này với NaCl 0,9% và glucose 5%, nhận xét cảm quan và xác định hàm lượng PTX trong dung dịch khi mới pha xong và sau khi pha 24 giờ. Khảo sát ảnh hưởng của acid citric đến độ ổn định của dung dịch đậm đặc và dung dịch sau khi pha loãng: pha chế công thức tỷ lệ T80-E và K-E đã lựa chọn với lượng acid citric thêm vào ở mức 0,01M.

Đánh giá tính chất dung dịch pha chế: tiến hành lặp lại công thức lựa chọn với lượng pha chế lớn hơn (gấp 30 lần ~ 150 ml dung dịch đậm đặc). Pha loãng với NaCl 0,9% và glucose 5% đến 3 mức nồng độ 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml và 1,2 mg/ml. Định lượng các dung dịch bằng phương pháp HPLC tại các thời điểm 0, 24, 48 và 72 giờ sau khi pha loãng. Các dung dịch sau pha loãng phải ổn định trong ít nhất 24 giờ, hàm lượng PTX $\geq 90\%$. So sánh đồng thời với chế phẩm đối chiếu Stragen®.

Nghiên cứu xây dựng quy trình bào chế dung dịch đậm đặc pha tiêm truyền: xây dựng quy trình bào chế dung dịch PTX đậm đặc quy mô 50 đơn vị (250 ml) trên 3 lô nguyên liệu đạt chỉ tiêu về độ vô khuẩn và nội độc tố vi khuẩn.

- Nghiên cứu xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc bột đông khô pha truyền tĩnh mạch chứa PTX dựa trên tạo phức với HP β CD.

Khảo sát ảnh hưởng của HP β CD lên khả năng cải thiện độ tan của PTX: khảo sát tỷ lệ HP β CD-PTX trong hỗn hợp nước - ethanol (1:1) đến giới hạn cho phép của HP β CD theo FDA (tối đa là 0,4%), đánh giá sự hòa tan PTX sơ bộ bằng cảm quan, chọn lựa tỷ lệ thích hợp và xác định hàm lượng PTX.

Khảo sát ảnh hưởng của chất ổn định phức: công thức được lựa chọn với tỷ lệ HP β CD-PTX tiềm năng sẽ được khảo sát độ ổn định khi có mặt PVP K30, Tween 80 và PEG 400. Tiêu chí lựa chọn là công thức sau khi pha loãng cho dung dịch trong ít nhất 24 giờ.

Khảo sát công thức và quy trình điều chế bột đông khô chứa PTX: Mannitol được thêm vào với tỷ lệ thích hợp (tối đa 7,5% - theo FDA) nhằm tăng khả năng đông khô tạo khối thuốc cho dung dịch. Khảo sát các thông số quy trình đông khô.

Kiểm tra, đánh giá chất lượng sản phẩm bột đông khô chứa PTX: bột đông khô phải đảm bảo đạt các yêu cầu chung của chế phẩm đông khô như: hình thức khối thuốc, tốc độ tan, độ trong của dung dịch sau khi pha loãng với dịch truyền; pH; độ ổn định hàm lượng PTX sau 24, 48, 72 giờ. Tiêu chí lựa chọn là công thức cho dung dịch có nồng độ PTX ít nhất sau 24 giờ đạt trên 90% so với lúc đầu.

Sơ bộ đánh giá sự phân bố của PTX trong mô và huyết tương thỏ: các mẫu thuốc thử dung dịch đậm đặc pha truyền tĩnh mạch (công thức A) và dung dịch trước khi đông khô (công thức B) được thử sơ bộ trên thỏ về nồng độ thuốc trong huyết tương và nồng độ thuốc phân phối vào các mô (gan, thận,

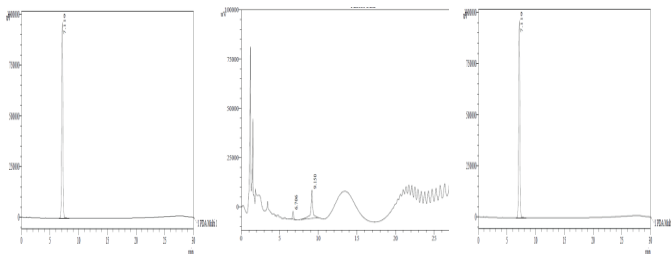
phối, buồng trứng) theo thời gian; so sánh với thuốc đối chiếu PTX Stragen® 30 mg/5 ml (C).

Sơ bộ đánh giá độ ổn định của hai chế phẩm: đánh giá độ ổn định chế phẩm ở điều kiện thường ($5\pm 2^\circ\text{C}$, tránh ánh sáng) sau 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 tháng và điều kiện lão hóa ($25\pm 2^\circ\text{C}/60\%\pm 5\%\text{ RH}$) sau 0, 3, 6 tháng.

Kết quả và bàn luận

Thẩm định quy trình định lượng PTX và tạp chất liên quan của PTX trong chế phẩm

Quy trình định lượng PTX trong chế phẩm được thẩm định đầy đủ và phù hợp để xác định hàm lượng PTX trong khoảng từ 98,208 đến 1473,120 $\mu\text{g/ml}$, với điều kiện sắc ký như sau: cột Nucleodur® PFP 250 x 4,0 mm, 5 μm , nhiệt độ cột 25°C , thể tích tiêm mẫu 10 μl , tốc độ dòng 1,2 ml/phút, đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 227 nm, pha động: hỗn hợp nước - acetonitril, rửa giải theo chương trình (hình 1, 2, 3).

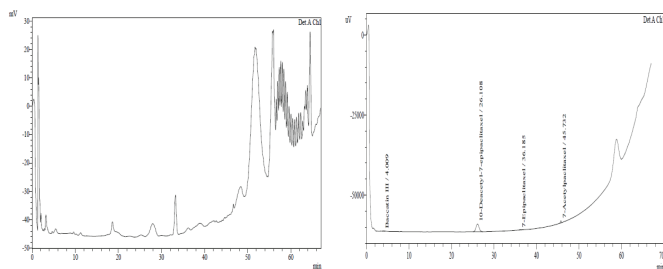


Hình 1: sắc ký đồ PTX chuẩn

Hình 2: sắc ký đồ của mẫu trắng

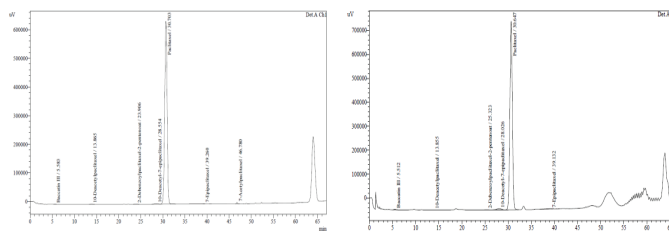
Hình 3: sắc ký đồ của mẫu thử

Quy trình định lượng tạp chất liên quan của PTX trong chế phẩm được thẩm định đầy đủ và phù hợp để xác định lượng tạp chất liên quan của PTX: 2,94-14,7 $\mu\text{g/ml}$, với điều kiện sắc ký như sau: cột Gemini® NX 150 x 4,6 mm, 5 μm , nhiệt độ cột 25°C , thể tích tiêm mẫu 10 μl , tốc độ dòng 1 ml/phút, đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 227 nm, pha động: hỗn hợp nước - acetonitril, rửa giải theo chương trình (hình 4, 5, 6, 7).



Hình 4: sắc ký đồ của mẫu trắng

Hình 5: sắc ký đồ của tạp chuẩn B



Hình 6: sắc ký đồ mẫu chuẩn PTX và tạp chuẩn B

Hình 7: sắc ký đồ của mẫu thử

Xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc tiêm truyền chứa PTX với hai dạng bào chế dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền

Khảo sát tính chất lý hóa của chế phẩm đối chiếu: chế phẩm Stragen® có dạng dung dịch đậm đặc trong suốt, hơi nhớt, đóng trong lọ thủy tinh trong, nút cao su, ngoài có niềng nắp nhôm, pH = 6,14 (pha loãng 10 lần với NaCl 0,9%). Hàm lượng đạt 90-110% hàm lượng ghi trên nhãn. Các dung dịch sau khi pha loãng đều đạt độ ổn định về cảm quan và hàm lượng trong vòng 72 giờ sau khi pha.

Xây dựng công thức dung dịch PTX bằng phương pháp trung gian hòa tan

Khảo sát loại, tỷ lệ chất trung gian hòa tan và dung môi hòa tan PTX: khi dùng hỗn hợp T80-E tỷ lệ (2:1) (3:1) (4:1) và hỗn hợp K-E tỷ lệ (1:1) (2:1) (3:1) (4:1), dung dịch đậm đặc khi pha loãng 10 lần ổn định trong vòng 24 giờ sau khi pha về cảm quan và hàm lượng trong giới hạn cho phép. Với tỷ lệ T80-E nhỏ hơn (2:1) và K-E tỷ lệ nhỏ hơn (1:1), dung dịch tủa sau khi pha loãng 24 giờ và không đạt giới hạn hàm lượng cho phép. Do đó, lựa chọn công thức T80-E (2:1) và K-E (1:1) làm cơ sở nghiên cứu vì đây là công thức với tỷ lệ Tween 80 và Kolliphor ELP ít nhất cho dung dịch có độ ổn định trong vòng 24 giờ sau khi pha loãng (hàm lượng PTX lần lượt là 97,70% và 94,69%). Công thức với tỷ lệ T80-E (2:1) acid citric 0,01M khi pha loãng đến nồng độ 0,3 mg/ml với các dung dịch NaCl 0,9% và Glucose 5% đạt độ ổn định về hàm lượng sau hơn 72 giờ. Khi pha loãng ở nồng độ 0,6 mg/ml và 1,2 mg/ml đến khoảng 72 giờ, dung dịch bắt đầu xuất hiện những hạt tủa nhỏ li ti. Công thức dùng K-E (1:1) acid citric 0,01M, các dung dịch pha loãng ở 3 nồng độ ổn định trong vòng 48 giờ sau khi pha. Các dung dịch pha loãng với nồng độ thấp (0,6 mg/ml và 0,3 mg/ml) vẫn ổn định trong vòng 72 giờ sau khi pha. Kết quả trên cho thấy công thức dùng T80-E (2:1) acid citric 0,01M không có cải thiện so với không dùng acid citric. Ngược lại, công thức sử dụng K-E (1:1) acid citric 0,01M cho thấy sự cải thiện về độ ổn định so với không dùng acid citric. Do đó, chọn công thức T80-E (2:1) (CT1), K-E (1:1) acid citric 0,01M (CT2) để khảo sát.

Đánh giá tính chất dung dịch pha chế: các dung dịch sau khi pha loãng từ 2 công thức CT1 và CT2 đều trong và có độ ổn định sau khi pha 72 giờ về cảm quan và định lượng. Tuy nhiên, CT2 được lựa chọn để pha chế với quy mô lớn hơn (50 lọ ~ 250 ml, tiến hành trên 3 lô), do công thức này có nồng độ Kolliphor ELP sử dụng trong khoảng cho phép của FDA (<52,5%), còn CT1 khi pha loãng ở nồng độ 1,2 mg/ml thì nồng độ Tween là 13%, cao hơn mức được FDA cho phép (8%), hơn nữa CT2 có độ nhớt nhỏ hơn CT1.

Xây dựng quy trình bào chế dung dịch đậm đặc chứa PTX pha tiêm truyền: dung dịch đậm đặc có độ nhớt lớn nên khó thực hiện tiết khuẩn bằng biện pháp lọc vô trùng trong điều kiện pha chế nhỏ. Từ đó, đề xuất phương pháp hấp tiết trùng phù hợp cho từng thành phần trong công thức và pha chế trong khu vực vô trùng (cấp A).

Công thức pha chế 250 ml dung dịch đậm đặc chứa PTX: PTX 1500 mg; acid citric 500 mg; Kolliphor ELP - ethanol khan (1:1) vừa đủ 250 ml.

Kết quả về cảm quan, hàm lượng và độ vô trùng được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: kết quả về cảm quan, hàm lượng và độ vô trùng của chế phẩm (n = 3)

Chỉ tiêu	0 giờ	24 giờ
Hàm lượng PTX (%)	100,77	98,79
pH		3,62-4,74
Nội độc tố vi khuẩn (*)		Đạt
Độ vô trùng (**)		Đạt

(*) Thử trên thỏ theo chuyên luận ĐDVN IV (Phụ lục 13.4);

(**) Cấy mẫu bằng phương pháp màng lọc trong môi trường thioglycolat và soybean-casein theo chuyên luận ĐDVN IV (Phụ lục 13.7)

Nghiên cứu xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc bột đông khô pha truyền tĩnh mạch chứa PTX dựa trên tạo phức với HPβCD

Khảo sát ảnh hưởng của HPβCD lên khả năng cải thiện độ tan của PTX: kết quả khảo sát cho thấy, với tỷ lệ HPβCD thấp (<0,3%) dung dịch phức tan ngay khi phối hợp. Với nồng độ HPβCD là 0,35% và 0,4%, dịch pha loãng tại thời điểm lúc đầu trong, chứng tỏ lượng HPβCD sử dụng đủ để tạo phức bao với PTX. Tuy nhiên, khi quan sát thêm khoảng hơn 10 phút, dung dịch có nồng độ HPβCD 0,35% vẩn, trong khi dung dịch có nồng độ HPβCD 0,4% bền hơn 30 phút. Dung dịch vẩn chứng tỏ phức tạo thành không ổn định và cần phải sử dụng thêm tá dược để ổn định phức. Tỷ lệ nồng độ HPβCD lựa chọn sử dụng là 0,4%.

Khảo sát ảnh hưởng của chất ổn định phức:

Anh hưởng của chất làm tăng độ nhớt: khi hòa tan PVP K30 vào dung dịch HPβCD trước khi tạo phức với PTX dung dịch trong lâu hơn (gần 120 phút) so với khi hòa tan PVP K30 vào dung dịch sau khi tạo phức (60 phút). Thời gian duy trì độ ổn định phức tỷ lệ thuận với nồng độ PVP K30 sử dụng. Cụ thể, để duy trì độ trong của dung dịch đến khoảng 2 giờ, PVP K30 tối thiểu phải là 2%.

Khảo sát ảnh hưởng chất trợ tan: kết quả khảo sát ảnh hưởng của các chất trợ tan PEG 400 và Tween 80 với các tỷ lệ khác nhau được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: kết quả đánh giá cảm quan dung dịch đậm đặc

Thời gian (giờ)	Công thức (% PEG 400 - % Tween 80)									
	10-0	10-2	10-5	0-8	2-8	2-7	3-7	3-6	4-6	4-5
0	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
24	↓	-	+	↓	+	+	+	-	+	+
48	↓	↓	+	↓	+	-	+	↓	+	-
72	↓	↓	+	↓	+	↓	+	↓	+	+

(+): dung dịch trong; (-): dung dịch vẩn nhẹ; (↓): dung dịch vẩn nhiều

Các công thức chỉ sử dụng một loại chất trợ tan PEG 400 hoặc Tween 80 không đảm bảo độ bền của dung dịch (tối đa đến 24 giờ có vẩn xuất hiện). Với tỷ lệ PEG 400 sử dụng tối đa đến 10% và lượng Tween 80 sử dụng từ tỷ lệ 5% trở lên, dung dịch duy trì độ trong được đến 72 giờ. Tương tự, với tỷ lệ Tween 80 sử dụng tối đa đến 8% và lượng PEG 400 sử dụng từ 2% trở lên, dung dịch mới duy trì được độ trong đến 72 giờ. Từ đó cho thấy, nồng độ PEG 400 trong khoảng 2-10% và Tween 80 trong khoảng 5-8% giúp duy trì độ bền của dung dịch phức.

Khảo sát công thức và quy trình điều chế thuốc bột đông khô pha tiêm truyền: chọn các công thức 10-5, 2-8, 3-7, 4-6, 5-5 (bảng 2), phối hợp với mannitol lượng tối đa cho phép sử dụng để khảo sát thông số của quy trình đông khô. Sau khi khảo sát một loạt các thông số nhằm thu được khối thuốc đạt yêu cầu về tính chất cơ học (rắn chắc, mịn, không bị nứt) và khả năng tái hòa tan, quy trình đông khô được thực hiện với các thông số sau: thời gian đông lạnh 48 giờ; áp suất giai đoạn làm khô sơ cấp và thứ cấp là 0,0108 mbar và 0,0026 mbar.

Khảo sát ảnh hưởng của tá dược đến tính chất sản phẩm đông khô: pha chế các công thức với các tỷ lệ tá dược thay đổi trong giới hạn đã khảo sát ở trên, tiến hành đông khô. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: kết quả định lượng PTX và pH các mẫu nghiên cứu

Công thức (% PEG 400: % Tween 80)	Thời gian hòa tan lại (phút)	pH dung dịch sau pha loãng	Hàm lượng PTX trong dung dịch sau pha loãng (%)			
			0 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
10-5	3	4,32	93,53	92,31	91,98	90,88
2-8	2	4,05	90,95	89,52	88,15	85,82
3-8	3	4,07	93,30	90,09	88,55	86,34
3-7	3	4,08	90,14	88,57	87,40	85,04
4-8	4-5	4,24	96,70	93,84	90,52	88,45
4-7	1-2	4,30	91,17	90,61	89,28	85,67
4-6	3-4	4,25	90,04	88,91	87,74	84,89
5-8	6-7	4,22	96,55	95,49	92,93	90,46
5-7	2-3	4,29	98,17	95,72	92,39	88,89
5-6	2	4,26	96,35	95,71	93,74	91,38
5-5	2	4,25	98,24	95,08	93,62	91,30
6-8	5	4,24	96,77	95,44	91,09	90,80
6-7	4	4,26	99,20	95,64	93,40	92,71
6-6	3	4,28	97,74	95,86	95,44	93,92
6-5	1-2	4,25	96,31	94,39	93,74	91,14

Về mặt cảm quan, kết quả cho thấy với tỷ lệ PEG 400 thấp (dưới 5%), khối thuốc có nguy cơ bị nứt bể. Tuy nhiên, khi lượng PEG 400 sử dụng quá cao (10%), lượng tá dược lỏng trong công thức nhiều, làm cho dung dịch thuốc khó đông rắn, giai đoạn làm khô không xảy ra hoàn toàn, dẫn đến sản phẩm khó khô, dễ vỡ (công thức 10-5). Các sản phẩm đông khô khi hòa tan lại với dung dịch NaCl 0,9% rất nhanh (tối đa 5-7 phút). Bên cạnh đó, khảo sát cũng cho thấy, với tỷ lệ Tween 80 sử dụng càng tăng, thời gian hòa tan lại thành dung dịch trong càng lâu. Các công thức khảo sát đều cho kết quả độ bền dung dịch sau khi pha loãng với dung dịch NaCl 0,9% ổn định ít nhất 24 giờ, đặc biệt các công thức có nồng độ PEG 400 cao (từ 5% trở lên) độ bền dung dịch có khả năng duy trì được đến 72 giờ. Từ các kết luận trên, công thức 5-6 được chọn để có sản phẩm đông khô có hình thức đẹp, mịn, chắc, thời gian hòa tan lại nhanh, duy trì được độ trong và hàm lượng PTX trong giới hạn (từ 90 đến 110%) được hơn 24 giờ.

Công thức 1 lọ: PTX 6 mg; Hydroxypropyl- β -cyclodextrin 40 mg; Polyvinyl pyrrolidon K30 200 mg; Polyethylen glycol 400 0,5 ml; Tween 80 0,6 ml; Mannitol 0,75 g; dung môi vừa đủ.

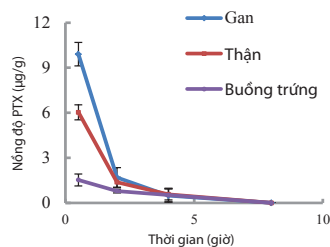
Kiểm tra, đánh giá chất lượng sản phẩm: pha chế 3 mẻ công thức 5-6 và tiến hành đông khô theo quy trình đã chọn để khảo sát tính ổn định của quy trình. Mỗi mẻ pha chế 5 lọ. Sản phẩm trong 3 mẻ đều đạt các chỉ tiêu về mặt cảm quan, độ trong và hàm lượng PTX trong giới hạn (90-110%) đến 72 giờ.

Sơ bộ đánh giá sự phân bố của PTX trong mô và huyết tương thỏ

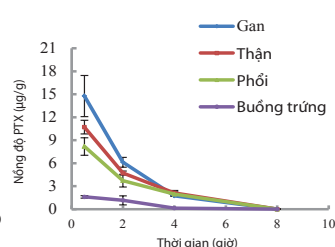
Sự phân bố thuốc trong mô và huyết tương thỏ của dạng dung dịch đậm đặc gần tương tự như thuốc đối chiếu, trong khi thuốc bột đông khô cho thấy nồng độ PTX trong huyết tương thấp hơn thuốc đối chiếu nhưng nồng độ thuốc phân phối vào các mô cao hơn. Kết quả phân bố thuốc trong mô được trình bày trong bảng 4 và hình 8, 9.

Bảng 4: nồng độ PTX ($\mu\text{g/g}$) thu được giữa các nhóm khi tiêm thuốc (liều 6 mg/kg)

Thời gian (giờ)	Gan		Thận		Phổi		Buồng trứng	
	B	C	B	C	B	C	B	C
0,5	14,78	9,90	10,71	6,03	8,19	8,26	1,61	1,53
2	6,13	1,69	4,71	1,37	3,72	1,68	1,15	0,78
4	1,73	0,49	2,12	0,57	1,96	0,57	0,14	0,52
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



Hình 8: đường biểu diễn nồng độ PTX trong mô theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch thuốc chứng (C) với liều 6 mg/kg ($n = 3$)

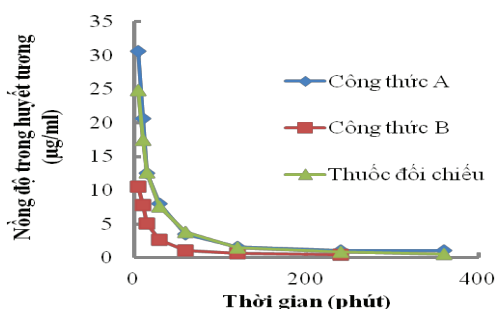


Hình 9: đường biểu diễn nồng độ PTX trong mô theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch thuốc thử (B) với liều 6 mg/kg ($n = 3$)

Kết quả nồng độ thuốc trong huyết tương được trình bày trong bảng 5, 6 và hình 10.

Bảng 5: nồng độ thuốc gốc PTX trong huyết tương thỏ ($\mu\text{g/ml}$) theo thời gian

Thời gian (phút)	Công thức A ($n = 6$)	Công thức B ($n = 6$)	Thuốc đối chiếu (C) ($n = 3$)
5	30,589 $\pm$ 7,455	10,538 $\pm$ 1,756	24,837 $\pm$ 4,116
10	20,624 $\pm$ 8,439	7,816 $\pm$ 1,578	17,473 $\pm$ 3,513
15	12,501 $\pm$ 5,568	5,030 $\pm$ 1,099	12,673 $\pm$ 0,390
30	8,042 $\pm$ 4,084	2,675 $\pm$ 0,794	7,542 $\pm$ 2,485
60	3,521 $\pm$ 0,889	1,063 $\pm$ 0,319	3,756 $\pm$ 1,393
120	1,622 $\pm$ 0,394	0,625 $\pm$ 0,361	1,458 $\pm$ 0,700
240	1,067 $\pm$ 0,180	0,390 $\pm$ 0,129	0,839 $\pm$ 0,404
360	1,029 $\pm$ 0,170	-	0,595 $\pm$ 0,181



Hình 10: đồ thị nồng độ thuốc trong huyết tương theo thời gian của thuốc đối chiếu (C), công thức (A) và công thức (B)

Bảng 6: so sánh giữa thuốc chứng và 2 thuốc thử

Thông số		AUC_{0-6} (µg.giờ/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (µg.giờ/ml)	$T_{1/2}$ (giờ)	K_a	V_d (lít/kg)
Thuốc chứng (C)		14,71±2,31	15,70±2,07	1,15±0,04	0,60±0,01	0,25±0,07
Thuốc thử CT (A)		16,33±2,53	18,38±2,42	1,36±0,21	0,52±0,07	0,21±0,06
Thuốc thử CT (B)			5,55±1,38	0,87±0,09	0,79±0,09	0,57±0,10
So sánh giữa thuốc chứng và thuốc thử A	t	-1,27	-2,05	-2,04	2,54	1,91
	$t_{0,05}$	2,45	2,45	2,57	2,57	2,57
So sánh giữa thuốc chứng và thuốc thử B	t		13,21*	7,06*	-5,58*	-7,84*
	$t_{0,05}$		2,45	2,45	2,57	2,57

Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $t > t_{0,05}$

Sơ bộ đánh giá độ ổn định của hai chế phẩm

Chế phẩm dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền tĩnh mạch được theo dõi độ ổn định dưới điều kiện bảo quản thường và khắc nghiệt. Kết quả dung dịch đậm đặc sau 3 tháng ở 2 điều kiện bảo quản và thuốc bột đông khô ở điều kiện thường sau 2 tuần bảo quản cho thấy, hai chế phẩm đều đạt các yêu cầu chất lượng đề ra (bảng 7-15).

Bảng 7: kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm dung dịch đậm đặc

	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	0 tháng	3 tháng	0 tháng	3 tháng	0 tháng	3 tháng
Hàm lượng PTX (%)	99,7 Trong	100,1 Trong	99,7 Trong	99,6 Trong	100,64 Trong	99,38 Trong
Hàm lượng tạp B (%)	Không có	0,42	0,02	0,05	0,01	0,03
pH	3,62-4,74		3,64-4,73		3,63-4,75	
Chất gây sốt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	Đạt		Đạt		Đạt	

Bảng 8: kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm bảo quản ở điều kiện thường

	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	6 tháng	12 tháng	6 tháng	12 tháng	6 tháng	12 tháng
Hàm lượng PTX (%)	99,42 Trong	100,1 Trong	99,7 Trong	99,6 Trong	100,64 Trong	99,38 Trong
Hàm lượng tạp B (%)	0,43	0,50	0,26	0,05	0,03	0,03
pH	3,62-4,74		3,64-4,73		3,63-4,75	
Chất gây sốt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	Đạt		Đạt		Đạt	

Bảng 9: kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc 25°C, RH = 60%±5%

	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	0 tháng	3 tháng	0 tháng	3 tháng	0 tháng	3 tháng
Hàm lượng PTX (%)	99,7 Trong	101,9 Trong	99,2 Trong	101,7 Trong	99,7 Trong	99,5 Trong
Hàm lượng tạp B (%)	Không phát hiện	0,35		0,07		0,05
pH	3,62-4,74		3,64-4,73		3,63-4,75	
Chất gây sốt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	Đạt		Đạt		Đạt	

Bảng 10: kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc 25°C, RH = 60%±5%

	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	9 tháng	12 tháng	9 tháng	12 tháng	9 tháng	12 tháng
Hàm lượng PTX (%)	99,33 Trong	99,49 Trong	99,3 Trong	99,11 Trong	99,36 Trong	99,2 Trong
Hàm lượng tạp B (%)		0,35		0,07		0,05
pH	3,62-4,74		3,64-4,73		3,63-4,75	
Chất gây sốt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	Đạt		Đạt		Đạt	

Bảng 11: kết quả đánh giá chất lượng thuốc bột đông khô

Mã	Hình thức khối thuốc	pH sau khi pha loãng	Hàm lượng tạp B (%)	Hàm lượng PTX trong dung dịch sau pha loãng (%)		
				24 giờ	48 giờ	72 giờ
1	Khối thuốc trắng mịn, chắc, không rạn nứt	4,23	0,08	94,39	93,73	91,19
2	Khối thuốc trắng mịn, chắc, không rạn nứt	4,25	0,06	94,32	93,68	91,20
3	Khối thuốc trắng mịn, chắc, không rạn nứt	4,26	0,05	94,74	93,91	91,52

Bảng 12: kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm bảo quản ở điều kiện thường

	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	0 tháng	3 tháng	0 tháng	3 tháng	0 tháng	3 tháng
Hàm lượng PTX (%)	100,7 Trắng	100,0 Trắng	99,8 Trắng	99,6 Trắng	100,14 Trắng	99,34 Trắng
Hàm lượng tạp B (%)	Không có	0,02	0,04	0,15	0,1	0,01
pH	3,62-4,74		3,64-4,73		3,63-4,75	
Chất gây sốt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	Đạt		Đạt		Đạt	

Bảng 13: kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm bảo quản ở điều kiện thường

	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	6 tháng	12 tháng	6 tháng	12 tháng	6 tháng	12 tháng
Hàm lượng PTX (%)	97,42 Trắng	97,12 Trắng	99,5 Trắng	99,2 Trắng	100,14 Trắng	98,38 Trắng
Hàm lượng tạp B (%)	0,03	0,04	0,12	0,15	0,13	0,13
pH	3,62-4,74		3,64-4,73		3,63-4,75	
Chất gây sốt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	Đạt		Đạt		Đạt	

Bảng 14: kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm bảo quản ở điều kiện 25°C

	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	0 tháng	3 tháng	0 tháng	3 tháng	0 tháng	3 tháng
Hàm lượng PTX (%)	99,9 Trắng	99,0 Trắng	99,8 Trắng	98,7 Trắng	99,14 Trắng	99,3 Trắng
Hàm lượng tạp B (%)	Không có	0,01	0,03	0,19	0,12	0,1
pH	3,62-4,74		3,64-4,73		3,63-4,75	
Chất gây sốt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	Đạt		Đạt		Đạt	

Bảng 15: kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm bảo quản ở điều kiện 25°C

	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	6 tháng	12 tháng	6 tháng	12 tháng	6 tháng	12 tháng
Hàm lượng PTX (%)	97,52 Trắng ngà	97,22 Trắng ngà	99,3 Trắng ngà	99,0 Trắng ngà	98,24 Trắng ngà	97,18 Trắng ngà
Hàm lượng tạp B (%)	0,02	0,14	0,12	0,05	0,13	0,09
pH	3,62-4,74		3,64-4,73		3,63-4,75	
Chất gây sốt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	Đạt		Đạt		Đạt	

Nhận xét: kết quả khảo sát sơ bộ cho thấy, sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 25°C, chế phẩm bột đông khô pha tiêm PTX vẫn đạt các yêu cầu chất lượng (theo Annex 2 - WHO Technical report series No.953, 2009).

Kết luận

Độ tan của PTX đã được cải thiện bằng hai phương pháp: sử dụng dung môi trung gian Kolliphor ELP phối hợp với acid citric nhằm làm tăng độ ổn định, và tạo phức với HP β CD - phức được ổn định bởi các chất như PVP K30, PEG 400, Tween 80. Trên cơ sở đó, hai chế phẩm dung dịch đậm đặc và bột đông khô PTX pha truyền tĩnh mạch được bào chế thành công với quy trình bào chế, khả năng phân bố thuốc vào mô động vật thử nghiệm (thỏ), độ ổn định đã được khảo sát và đánh giá sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện thường (8°C) và lão hóa cấp tốc (25°C) cho kết quả tốt, chế phẩm vẫn đạt hàm lượng và các chỉ tiêu khác như pH, độ vô trùng và cảm quan.

Tài liệu tham khảo

- [1] FDA (2011), *Approved Drugs Therapeutic Equivalence*, 31 Edition.
- [2] Hiroki Hamada Kohji Ishihara, Noriyoshi Masuoka, Katsuhiko Mikuni, Nobuyoshi Nakajima (2006), "Enhancement of water-solubility and bioactivity of PTX using modified cyclodextrins", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102(4)**, 369-371.
- [3] Robert G. Strickley (2004), "Solubilizing excipients in oral and injectable formulations", *Pharmaceutical Research*, **21(2)**.
- [4] The United States Pharmacopoeia (USP) 35.
- [5] Thorsteinn Loftsson, Marcuse Brewster (1996), "Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins.1. Drug Solubilization and Stabilization", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **85(10)**, 1017-25.

Xây dựng phương pháp định lượng carboplatin trong thuốc tiêm đông khô carboplatin bằng HPLC

Phan Thị Mỹ Hoàng, Bành Thị Ngọc Quỳnh, Mai Tòng Ba, Lý Thị Mỹ Dung

Công ty Cổ phần Dược - Trang thiết bị y tế Bình Định

Đề tài đã xây dựng được phương pháp định lượng carboplatin trong chế phẩm thuốc tiêm đông khô carboplatin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), dựa trên sự tham khảo các dược điển nước ngoài. Phương pháp này đã được thẩm định một cách đầy đủ và xác định được các điều kiện sắc ký thích hợp về: độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác.

Đây là một nội dung nghiên cứu trong dự án cấp nhà nước giai đoạn 2011-2015, mã số KC10.DA04/11-15: "Hoàn thiện quy trình sản xuất thuốc tiêm đông khô carboplatin để điều trị ung thư", do Công ty Cổ phần Dược - Trang thiết bị y tế Bình Định chủ trì.

Từ khóa: carboplatin, sắc ký lỏng hiệu năng cao, thuốc tiêm đông khô.

Chỉ số phân loại 3.4

CARBOPLATIN MEASURING METHOD IN FREEZE-DRIED CARBOPLATIN INJECTION DRUG BY HPLC

Summary

The high performance liquid chromatography (HPLC) is a fast, sensitive and accurate method to measure carboplatin in injection drug. Therefore, the authors have made a carboplatin measuring method in freeze-dried carboplatin 50 mg and 150 mg injection drugs with liquid chromatographic conditions as follows: UV detector at 230 nm wave length; column: RP 18 (250x4.6 mm; 5 μ m); mobile phase: water: acetonitrile (20:80); flow rate: 1ml/min. This method has been evaluated to meet requirements of linear range: linearity range at 0.4-1.4 ppm ($R^2 = 0.9999$); the detecting limit: 2.012 μ g/ml; the quantitation limit: 6.099 μ g/ml; precision: RSD = 0.96%; accuracy (recovery rate): 100.67%, RSD = 0.21%.

Keywords: carboplatin, freeze-dried, HPLC.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Hiện nay, căn bệnh ung thư ngày càng gia tăng mạnh mẽ trong khi giá thành của những loại thuốc điều trị ung thư lại rất cao, đặc biệt là các thuốc nhập khẩu. Chính vì vậy, việc nghiên cứu sản xuất thuốc tiêm đông khô carboplatin dùng điều trị ung thư là một nhiệm vụ cấp thiết nhằm giảm phần nào gánh nặng chi phí điều trị cho cả bệnh nhân và xã hội. Để đánh giá được chất lượng của sản phẩm trong suốt quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng phương pháp định lượng carboplatin trong chế phẩm đông khô bằng các trang thiết bị hiện có của Công ty Cổ phần Dược - Trang thiết bị y tế Bình Định dựa trên sự tham khảo các dược điển nước ngoài.

Phương pháp HPLC ra đời năm 1967-1968 trên cơ sở phát triển và cải tiến từ phương pháp sắc ký cột cổ điển. HPLC là một phương pháp chia tách trong đó pha động là chất lỏng và pha tĩnh chứa trong cột là chất rắn đã được phân chia dưới dạng tiểu phân hoặc một chất lỏng phủ lên một chất mang rắn, hay một chất mang đã được biến bằng liên kết hóa học với các nhóm chức hữu cơ. Phương pháp này được sử dụng ngày càng rộng rãi và phổ biến vì nhiều ưu điểm: thời gian phân tích nhanh, độ phân giải tốt, độ nhạy cao, chính xác và kết quả phân tích ít phụ thuộc vào các thao tác kỹ thuật nên tránh được sai số. Do có độ nhạy cao nên HPLC được áp dụng để tách các chất có hàm lượng nhỏ trong các thuốc đa thành phần. Có thể áp dụng cho nhiều chất: hợp chất cao phân tử và các ion thuộc các đối tượng nghiên cứu y, sinh học, các chất không bền trong tự nhiên, kém bền ở nhiệt độ cao, ví dụ: nucleosid, nucleotid, acid nucleic, các acid amin, protein carbohydrat, vitamin, kháng sinh, chất màu... Bên cạnh đó, cột sắc ký có thể sử dụng được nhiều lần mà không phải tái sinh, mẫu phân tích có thể thu lại được vì đa số các detector không phân hủy mẫu. Chính vì vậy, chúng tôi chọn phương pháp này để định lượng carboplatin trong chế phẩm thuốc tiêm đông khô carboplatin.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Thuốc tiêm đông khô carboplatin 50 mg và 150 mg do Công ty Cổ phần Dược - Trang thiết bị y tế Bình Định nghiên cứu sản xuất.

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng phương pháp định lượng bằng HPLC.

+ *Thiết bị:*

- Hệ thống sắc ký lỏng HITACHI D-7000 với đầu dò UV-VIS, cột RP 18 (250x4,6 mm; 5 μ m).

- Cân điện tử 5 số lẻ Satorius, máy siêu âm Ultrasonik.

- Các dụng cụ thủy tinh chính xác.

+ *Thuốc thử:*

- Acetonitril dùng cho HPLC.

- Dung dịch đối chiếu: carboplatin đối chiếu trong nước.

- Nước cất.

+ *Điều kiện sắc ký:*

Cột RP 18 (250x 4,6 mm; 5 μ m).

Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

Detector UV: 230 nm.

Pha động: nước - Acetonitrile (20: 80), điều chỉnh nếu cần.

Thể tích tiêm: 10 μ l.

+ *Quy trình nghiên cứu:*

- Tính tương thích của hệ thống.

- Thành lập đường cong chuẩn độ xác định khoảng tuyến tính.

- Xác định các giá trị sau đây của phương pháp: giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác.

Kết quả

Chuẩn bị dung dịch chuẩn và thử:

- Dung dịch chuẩn: hòa tan một lượng carboplatin chuẩn trong nước để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

- Dung dịch thử: hòa tan 1 lọ bột đông khô carboplatin đối chiếu trong nước để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

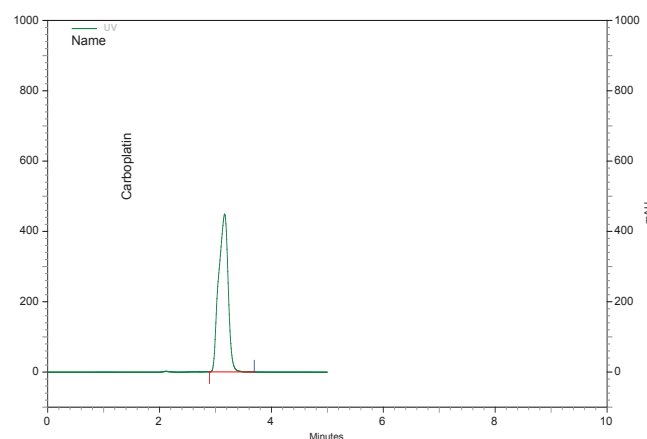
Tính tương thích của hệ thống

Trong điều kiện thí nghiệm, tính tương thích hệ thống khi các thông số sắc ký trong cả hai mẫu: mẫu chuẩn và mẫu thử có $RSD \leq 2\%$ được ghi ở bảng 1.

Bảng 1: các thông số sắc ký trong mẫu chuẩn và mẫu thử

	Thời gian lưu	Diện tích đỉnh	Số đĩa lý thuyết	Hệ số bất đối	Hệ số dung lượng
RSD (%) Mẫu chuẩn	0,31	0,21	1,22	0,53	0,44
RSD (%) Mẫu thử	0,26	0,86	1,10	0,50	0,31

Kết quả lựa chọn pha động cho thấy, trong 5 pha động thì pha động 5 cho các giá trị thông số sắc ký đạt yêu cầu quy định của một quy trình định lượng bằng phương pháp HPLC (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1: pic đồ pha động 5

Tiếp tục tiến hành thẩm định phương pháp định lượng carboplatin với các nội dung: khoảng tuyến tính; xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng; độ đúng; độ chính xác.

Thành lập đường cong chuẩn độ xác định khoảng tuyến tính

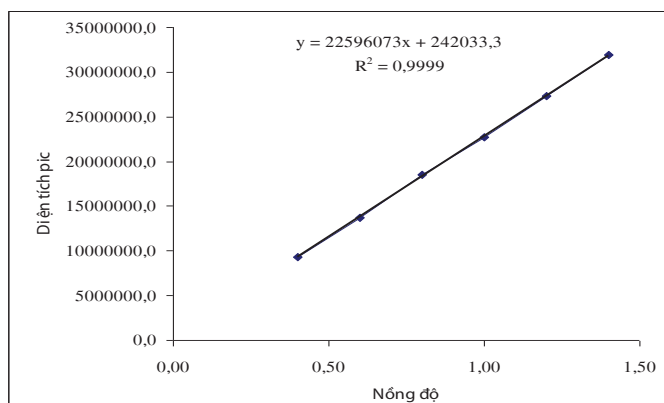
Độ tuyến tính của một phương pháp phân tích là sự phụ thuộc tuyến tính giữa đại lượng đo được (Y) với nồng độ chất phân tích (X) trong một khoảng xác định. Nó được biểu thị bằng

phương trình hồi quy $\hat{Y} = aX + b$ và hệ số tương quan tuyến tính R^2 .

Tiến hành: chuẩn bị dãy mẫu chuẩn carboplatin với các nồng độ từ 0,4 đến 1,4 μ g trong 1 ml chế phẩm (3 lần cho mỗi nồng độ dung dịch).

Bảng 2: tương quan giữa nồng độ và diện tích pic trung bình của dãy mẫu chuẩn carboplatin

Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic	Diện tích pic (TB)	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic	Diện tích pic (TB)
0,4	9294692	9283007,7	1	22689115	22757047
	9285857			22682887	
	9268474			22899139	
0,6	13582221	13709144	1,2	27683398	27332370
	13763266			27143079	
	13781946			27170634	
0,8	18487660	18497719	1,4	31887119	31891710
	18556432			31885352	
	18449066			31902659	



Biểu đồ 2: tương quan giữa nồng độ và diện tích pic trung bình của dãy mẫu chuẩn carboplatin

Nhận xét: $R^2 = 0,9999$. Vậy phương pháp đạt sự tuyến tính rất tốt.

Độ chính xác

Tiến hành: chuẩn bị 6 mẫu thử riêng biệt khác nhau. Chạy sắc ký cho mỗi mẫu thử để xác định độ lệch chuẩn tương đối.

Yêu cầu: phương pháp có độ lặp lại khi tính giá trị thống kê diện tích pic thu được trên 6 mẫu có $RSD \leq 2\%$.

Bảng 3: kết quả diện tích pic của 6 mẫu carboplatin với nồng độ 1 mg/ml

STT	Diện tích pic của 6 mẫu carboplatin với nồng độ 1 mg/ml	Thống kê
1	20836471	$S_{10} = 20988471$ $RSD = 0,96\% < 2\%$
2	21190129	
3	20750023	
4	21164360	
5	20832452	
6	21157389	

Nhận xét: RSD của 6 lần tiến hành sắc ký trên 6 mẫu nhỏ hơn 2%. Vậy phương pháp đạt độ chính xác.

Độ đúng

Tiến hành: thêm vào mẫu thử một lượng chất chuẩn (khoảng 10%, 20%, 30%) so với lượng hoạt chất có sẵn (1 mg/ml), sao cho mỗi hoạt chất trong dung dịch không nằm ngoài khoảng tuyến tính đã khảo sát. Sau đó tiến hành định lượng theo phương pháp phân tích cân thẩm định (mỗi nồng độ ít nhất 3 lần lặp lại).

Yêu cầu: phương pháp đạt độ đúng khi tỷ lệ phục hồi thực nghiệm nằm trong giới hạn cho phép của tỷ lệ phục hồi lý thuyết (98-102%).

Bảng 4: kết quả tỷ lệ phục hồi khi thêm chuẩn

Tỷ lệ chất chuẩn thêm vào (%)	Lượng chất chuẩn thêm vào (mg)	Lượng tìm thấy (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Kết quả thống kê
10	5,9	5,96	101,01	- Tỷ lệ phục hồi trung bình: 100,67% - $RSD: 0,21\%$
	5,9	5,94	100,67	
	5,9	5,95	100,84	
20	11,2	11,32	101,07	
	11,2	11,27	100,63	
	11,2	11,26	100,54	
30	15,0	15,10	100,67	
	15,0	15,04	100,27	
	15,0	15,05	100,34	

Nhận xét: tỷ lệ phục hồi thực nghiệm (100,67%) nằm trong giới hạn cho phép của tỷ lệ phục hồi lý thuyết (98-102%). Vậy phương pháp đạt được độ đúng.

Giới hạn phát hiện

Giới hạn phát hiện tính theo công thức:

$$D = 3,3 \times \frac{S}{B}$$

trong đó: B là độ dốc; S là độ lệch chuẩn của phương trình hồi quy.

Vậy nồng độ giới hạn phát hiện tính chính xác hơn:

$$D = 3,3 * S/B = 3,3 * 13626,92/22596073 = 2,012 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Giới hạn định lượng

Cách xác định: tiến hành xác định nồng độ tương ứng của chất cần thử có tín hiệu đo được gấp 10 lần tín hiệu đường nền.

Theo Dược điển Anh (2001), Dược điển Nhật Bản (2001) trong phương pháp sắc ký, độ nhiễu của đường nền có thể thay cho tín hiệu mẫu trắng và giới hạn định lượng phải cho $RSD < 10\%$.

$$Q = 10H_{\max} \times F \quad \text{hoặc} \quad Q = 10 \times \frac{S}{B}$$

trong đó: Q là giới hạn định lượng.

$$Q = 10 \times S/B = 10 \times 13626,92/22596073 = 6,099 \mu\text{g/ml}.$$

Kết luận

Phương pháp định lượng carboplatin trong thuốc tiêm đông khô carboplatin 50 mg và 150 mg bằng HPLC đã xác định được các điều kiện sắc ký thích hợp. Phương pháp này đã được thẩm định một cách đầy đủ về: độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác.

Hy vọng, phương pháp này sẽ cung cấp một công cụ hữu ích giúp cho các cơ sở sản xuất, điều

trị, các cơ quan kiểm tra chất lượng đánh giá chính xác hiệu quả những sản phẩm này.

Tài liệu tham khảo

1. Dược điển Việt Nam IV, Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
2. Jonathan M. Stoddard, Lien Nguyen, Hector Mata-Chavez and Kelly Nguyen (2007), "TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions", *Chem Commun*, pp 1240-1241.
3. "Thẩm định phương pháp phân tích trong nghiên cứu và kiểm nghiệm thuốc" (2005), *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Bộ Y tế, **số 3/tập 3**, tr. 25-29.
4. The British Pharmacopoeia (2007).
5. Nguyễn Đức Tuấn (2005), *HPLC*, Bộ môn Phân tích - Kiểm nghiệm, Khoa Dược - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, tr. 10-18.
6. USP 26.

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh trên hệ thống bioreactor 100 l

Vũ Tuấn Anh, Chữ Văn Mền

Học viện Quân y

Để nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh, các tác giả đã tiến hành nâng cấp quy mô nuôi cấy sinh khối sâm Ngọc Linh lên 100 l. Các thành phần môi trường được tối ưu hóa gồm có: môi trường MS bổ sung NAA = 1,5 mg/l; Kinetin = 0,1 mg/l; đường = 30,0 g/l, pH = 5,8; nhiệt độ nuôi cấy là 24-26°C, không có ánh sáng, tốc độ cánh khuấy là 45 vòng/phút, nồng độ oxy là 40%, thời gian nuôi cấy tối ưu là 24-25 ngày. Kết quả cho thấy: khối lượng tế bào đạt $459,21 \pm 48,54$ g/l và khối lượng saponin toàn phần đạt $24,87 \pm 3,02$ mg/g.

Từ khóa: MS, saponin, sâm Ngọc Linh, sinh khối.

Chỉ số phân loại 3.4

INVESTIGATING THE IMPACT OF SOME ELEMENTS ON THE PANAX VIETNAMENSIS'S BIOMASS QUALITY BASED ON 100-LITER BIOREACTOR

Summary

In this study, the authors have upgraded the *Panax vietnamensis* (Vietnamese ginseng) biomass production scale upto 100-liter bioreactor. The medium compositions which have been optimized include MS liquid medium supplemented with 1.5 mg/ml NAA, kinetin 0.1 mg/l, saccharose 30.0 g/l, pH of 5.8, temperature about 24-26°C, rotational speed at 45 rpm, oxygen content 40%, culture time about 24-25 days. The results have shown that culture yield has reached 459.21 ± 48.54 g/l, and total saponin content has been 24.87 ± 3.02 mg/g.

Keyword: biomass, MS, *Panax vietnamensis*, saponin.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) thuộc họ Nhân sâm (*Araliaceae*), là dược liệu đặc hữu ở vùng núi Ngọc Linh. Hiện nay, loài sâm này đã được đưa vào Sách đỏ Việt Nam. Sâm Ngọc Linh tự nhiên chỉ mọc ở độ cao trên 1500 m, chủ yếu tập trung ở vùng núi Ngọc Linh thuộc hai huyện Đắc Tô (Kon Tum) và Trà My (Quảng Nam). Sâm Ngọc Linh có nhiều tác dụng sinh học như: bổ dưỡng, tăng lực, chống oxy hóa và lão hóa, bảo vệ gan... Cũng chính vì là cây thuốc có giá trị, nên sâm Ngọc Linh đã bị khai thác kiệt quệ [1, 2].

Hiện nay, công nghệ sinh khối tế bào thực vật đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực (dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm chức năng). Học viện Quân y đã cùng với Đại học Ajou (Hàn Quốc) triển khai nhiệm vụ hợp tác với đề tài: *Hợp tác nghiên cứu xây dựng quy trình tạo khối sâm Ngọc Linh làm nguyên liệu sản xuất chế phẩm phục vụ sức khỏe cộng đồng* (2007) [3]. Nhiệm vụ đã được hội đồng nghiệm thu đánh giá cao và được đề nghị tiếp tục hoàn thiện để tạo ra được quy trình công nghệ hoàn chỉnh sản xuất sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh. Trên cơ sở kết quả thu được của nhiệm vụ nghiên cứu, Học viện Quân y đã được Cục Sở hữu trí tuệ (Bộ Khoa học và Công nghệ) cấp bằng độc quyền sáng chế về *Phương pháp sản xuất sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh* (2009) [4]. Năm 2010, các nhà khoa học của Học viện Quân y tiếp tục nghiên cứu đề tài cấp bộ về *bào chế chế phẩm nước tăng lực Vinatonic*, sản phẩm đã được Bộ Y tế cấp số lưu hành trên toàn quốc [5]. Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu của các đề tài, Bộ Khoa học và Công nghệ đã đồng ý cho Học viện Quân y thực hiện dự án: *"Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất sâm Ngọc Linh sinh khối và chế phẩm tăng lực Vinatonic"*

[6]. Để thực hiện dự án, việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng và nâng cấp quy mô sản xuất sâm Ngọc Linh sinh khối là rất quan trọng. Đây là giai đoạn tạo sản phẩm chủ yếu của quy trình sinh khối. Số lượng và chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh phụ thuộc nhiều nhất vào giai đoạn này. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng sâm Ngọc Linh sinh khối nuôi cấy trên bioreactor 100 l mà các nghiên cứu trước chưa đề cập tới.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất nghiên cứu

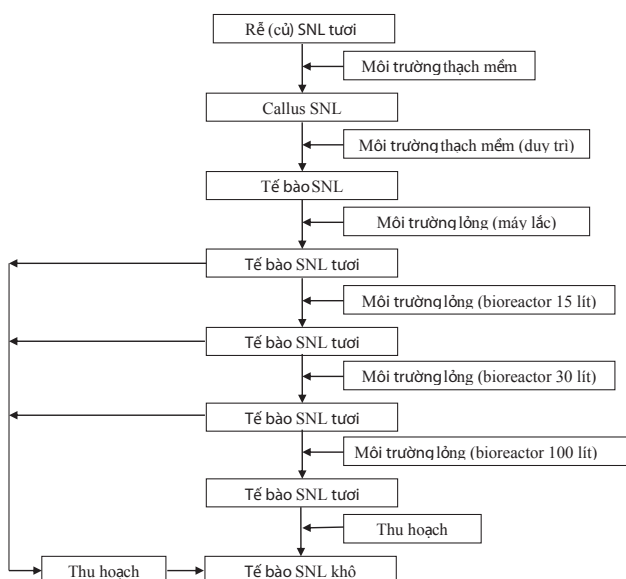
Các hoá chất dùng để pha chế môi trường nuôi cấy của hãng Sigma đạt tiêu chuẩn cho nuôi cấy tế bào thực vật. Chất chuẩn ginsenosid Rg1, Rb1, Rd (Wako - Nhật). Dung môi chạy sắc ký: acetonitril, methanol (dùng cho HPLC, Merck, Đức); nước cất (dùng cho HPLC, Prolabo, Tây Ban Nha); ethanol (tinh khiết phân tích) và một số hóa chất dung môi khác đạt tiêu chuẩn tinh khiết.

Thiết bị, dụng cụ, hóa chất: tủ cấy an toàn cấp 2 NU-440-400E, Máy lắc Orbital shaker, Tủ ẩm có lắc dung tích lớn ISF4-W, Bioreactor 15, 30 và 100 l Biostat (Đức).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh (do Trung tâm Nghiên cứu y dược học quân sự cung cấp).

Phương pháp nghiên cứu: quy trình sản xuất tế bào sâm Ngọc Linh sinh khối được thể hiện trên hình 1.



Hình 1: quy trình sản xuất tế bào sâm Ngọc Linh sinh khối (SNL: sâm Ngọc Linh)

Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy đến chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh: để khảo sát ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy lên sự phát triển của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l, chúng tôi khảo sát với các tốc độ khác nhau trên cùng một thời điểm với cùng một điều kiện ở các mẻ khác nhau với cùng một lượng tế bào ban đầu. Cụ thể, nhóm nghiên cứu lựa chọn các tốc độ 15, 25, 45, 60, 80, 100 và 120 vòng/phút.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ oxy đến chất lượng sâm Ngọc Linh sinh khối: so sánh khối lượng sinh khối khô, sinh khối tươi và hàm lượng hoạt chất trong sinh khối sau khi thu hoạch ở các nồng độ oxy khác nhau và lựa chọn nồng độ phù hợp nhất cho khối lượng sinh khối khô và hàm lượng hoạt chất cao nhất.

Thu hoạch sâm Ngọc Linh sinh khối: *biện pháp 1*: môi trường nuôi cấy tế bào cuối cùng khi thu hoạch có chứa 1-NAA. Khi thu hoạch, hỗn hợp gồm tế bào và môi trường, được lọc qua thiết bị lọc, thu lấy sinh khối. Sinh khối được rửa nhiều lần với nước cất (tỷ lệ nước cất: sinh khối là 5:1), rồi sấy khô tới khối lượng không đổi. Xác định hàm lượng hoạt chất và 1-NAA trong các mẫu, từ đó xác định số lần rửa thích hợp. *Biện pháp 2*: sinh khối tế bào trước khi thu hoạch được cấy chuyển vào môi trường lỏng không bổ sung các chất kích thích sinh trưởng, nuôi cấy trong 10 ngày, sau đó lọc thu hoạch sinh khối, có đánh giá hàm lượng hoạt chất và tồn dư 1-NAA và Kinetin.

Phương pháp kiểm nghiệm NAA và Kinetin: tham khảo tài liệu [6].

Kết quả và bàn luận

Đánh giá ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy đến chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l

Tế bào sâm Ngọc Linh là loại tế bào ưa khí, vì vậy trong nuôi cấy sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh cần thiết phải sử dụng hệ thống lên men có gắn thiết bị khuấy. Vai trò của thiết bị khuấy là để tăng diện tích và thời gian tiếp xúc với không khí được đưa vào từ hệ thống khí nén của các tế bào sâm Ngọc Linh, làm tăng độ hòa tan của oxy vào môi trường nuôi cấy, do đó làm tăng hiệu suất của quá trình trao đổi chất của tế bào, quá trình thâm nhập của các chất dinh dưỡng và các chất kích thích sinh trưởng cũng như các chất kích thích tăng hàm lượng hoạt chất cho tế bào sâm Ngọc Linh diễn ra nhanh và hiệu quả hơn. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy đến sự phát triển của tế bào

sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy tới chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l

Tốc độ cánh khuấy		Khối lượng tế bào khô (g/l)	Khối lượng saponin (mg/g)
15	(1)	7,22±0,81	20,19±2,23
25	(2)	11,46±1,32	20,31±2,28
45	(3)	31,31±3,83	24,87±3,02
60	(4)	20,56±2,48	17,20±1,74
80	(5)	18,32±2,22	18,11±1,85
100	(6)	15,42±1,86	20,22±2,25
120	(7)	9,63±1,19	21,44±2,46

Từ kết quả bảng 1 cho thấy, ở tốc độ cánh khuấy 45 vòng/phút, khối lượng tế bào sâm Ngọc Linh đạt cao nhất là 31,31 g/l, đồng thời theo kết quả xác định hàm lượng saponin toàn phần, ở tốc độ này cũng đạt cao hơn so với các tốc độ còn lại. Điều này có thể được giải thích rằng, nếu tốc độ cánh khuấy thấp thì sẽ không hòa tan được nhiều oxy vào môi trường nuôi cấy để tăng tính hấp thụ cho tế bào, làm quá trình trao đổi chất diễn ra chậm và không hiệu quả. Nếu tốc độ cánh khuấy quá cao sẽ làm mất đi một lượng oxy qua đường khí thải và làm tế bào sâm Ngọc Linh bị chết do lực va đập mạnh với cánh khuấy của hệ thống lên men. Vì vậy, ở nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn tốc độ cánh khuấy tối ưu nhất là 45 vòng/phút.

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ oxy đến sự phát triển của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ oxy cung cấp tới khối lượng sâm Ngọc Linh sinh khối tươi và khô trong bioreactor 100 l được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ oxy cung cấp tới khối lượng sâm Ngọc Linh sinh khối

Thời gian (ngày)	Khối lượng sâm Ngọc Linh SK tươi (g/l)				Khối lượng sâm Ngọc Linh SK khô (g/l)			
	O ₂ 20,8%	O ₂ 30%	O ₂ 40%	O ₂ 50%	O ₂ 20,8%	O ₂ 30%	O ₂ 40%	O ₂ 50%
0	60,0	60,0	60,0	60,0	3,2	3,2	3,2	3,2
5	64,6	58,2	57,7	65,3	3,4	3,0	3,2	3,3
10	78,1	70,6	74,4	83,8	3,9	3,5	3,7	4,2
15	108,1	117,5	141,9	104,4	4,7	5,2	6,5	4,5
20	226,3	230,0	265,6	194,4	9,4	9,6	11,5	7,7
25	261,9	282,5	288,1	228,1	11,3	12,4	12,7	9,5
30	271,9	292,5	298,1	238,1	11,0	11,5	12,5	9,2

(SK: sinh khối)

Sự sinh trưởng của tế bào và tổng khối lượng tế bào khô và tươi thu được tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Khối lượng tế bào thu được nhiều nhất tại thời điểm sau 25 ngày nuôi cấy. Kết quả này tương tự với kết quả đã công bố của Zhong và cộng sự trên loài *Panax notoginseng* [7]. Khối lượng sâm sinh khối tươi thu được nhiều nhất là 298,1 g/l với hàm lượng oxy cung cấp là 40%, tăng 9% so với đối chứng (oxy 20,8%).

Đánh giá ảnh hưởng của chất kích thích tăng hàm lượng hoạt chất đến chất lượng sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l

Kết quả thực nghiệm cho thấy, trong nuôi cấy sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh có thể sử dụng acid jasmonic, methyl jasmonat và dịch chiết nấm men làm chất kích thích tăng tổng hợp hoạt chất (elicitor) nhằm nâng cao hàm lượng saponin trong sản phẩm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng acid jasmonic để tiếp tục cho các nghiên cứu sau.

Lựa chọn nồng độ của elicitor: tiến hành nuôi cấy tế bào sâm Ngọc Linh, sau 14 ngày nuôi cấy cho tế bào tiếp xúc với acid jasmonic ở các nồng độ khác nhau (50 µM, 100 µM; 150 µM; 200 µM; 250 µM). Kết quả khảo sát hàm lượng các ginsenosid được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: kết quả lựa chọn nồng độ acid jasmonic

Nồng độ (µM)	Ginsenosid (%)			KLTB khô (g/l)
	Rg1	Rb1	Rd	
0	0,2512±0,012	0,2709±0,011	0,1421±0,005	20,22±2,33
50	0,3032±0,010	0,3308±0,013	0,1544±0,007	19,26±2,36
100	0,3494±0,013	0,3852±0,016	0,1705±0,006	18,63±2,25
150	0,3470±0,015	0,3890±0,014	0,1728±0,006	18,15±2,26
200	0,3311±0,012	0,3283±0,014	0,1614±0,007	17,87±1,89
250	0,3290±0,011	0,2761±0,009	0,1559±0,008	17,06±1,73

(KLTB: khối lượng tế bào)

Từ kết quả bảng 3 cho thấy, khi sử dụng acid jasmonic ở nồng độ 100 và 150 µM thì hàm lượng các ginsenosid tăng cao nhất khi thử nghiệm trong khoảng nồng độ 0-250 µM acid jasmoic.

Lựa chọn thời điểm tiếp xúc với elicitor: nuôi tế bào sâm Ngọc Linh trong môi trường MS, sau 2 ngày cho acid jasmonic, lọc tế bào, xác định khối lượng tế bào và hàm lượng các ginsenosid. Kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4: thời điểm tiếp xúc với elicitor

Ngày thử	Ginsenosid (%)			KLT (g/l)
	Rg1	Rb1	Rd	
1	0,0892±0,004	0,1032±0,004	*	12,74±1,42
4	0,1201±0,004	0,1181±0,005	*	12,64±1,45
6	0,1702±0,006	0,1296±0,006	0,0518±0,002	13,02±1,59
8	0,2015±0,008	0,1795±0,006	0,0540±0,002	15,39±1,86
10	0,2864±0,010	0,3086±0,013	0,1281±0,006	17,94±2,23
12	0,3408±0,014	0,3624±0,013	0,1479±0,005	18,25±1,93
14	0,3495±0,017	0,3838±0,016	0,1714±0,007	18,58±1,92
16	0,3290±0,012	0,3686±0,012	0,1629±0,005	17,66±1,79
20	0,2506±0,010	0,2707±0,009	0,1430±0,005	16,95±1,74

(*Hàm lượng thấp không xác định được; KLT: khối lượng tươi)

Kết quả bảng 4 cho thấy, tại thời điểm 14 ngày sau nuôi cấy cho hàm lượng hoạt chất và năng suất cao nhất là 18,58±1,92 (g/l). Hàm lượng của các ginsenoside Rg1, Rb1 và Rd tương ứng là 0,3495±0,017, 0,3838±0,016 và 0,1714±0,007%.

Lựa chọn thời gian tiếp xúc của elicitor với tế bào: nuôi tế bào sâm Ngọc Linh trong môi trường MS. Sau 14 ngày nuôi cấy cho tế bào tiếp xúc với acid jasmonic nồng độ 100 µM với thời gian 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ, 72 giờ. Lọc tế bào, định lượng ginsenosid trong tế bào, kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5: kết quả lựa chọn thời gian tiếp xúc của elicitor với tế bào

Thời gian tiếp xúc (giờ)	Ginsenosid (%)			KLT (g/l)
	Rg1	Rb1	Rd	
12	0,288±0,010	0,302±0,011	0,146±0,005	20,01±0,66
24	0,306±0,011	0,308±0,013	0,148±0,006	19,66±0,68
36	0,325±0,013	0,341±0,011	0,160±0,008	19,21±0,76
48	0,351±0,017	0,381±0,013	0,174±0,006	19,66±0,68
60	0,316±0,011	0,331±0,014	0,152±0,006	17,30±0,69
72	0,275±0,009	0,290±0,010	0,136±0,005	15,31±0,74

(KLT: khối lượng tươi)

Qua khảo sát thời gian tiếp xúc của acid jasmonic với tế bào sâm Ngọc Linh cho thấy: ở thời gian tiếp xúc 48 giờ (2 ngày), hàm lượng hoạt chất cao nhất là 19,66±0,68 (g/l).

Hoàn thiện quy trình thu hoạch sâm Ngọc Linh sinh khối

Quy trình loại bỏ 1-NAA và Kinetin tồn dư: khảo sát biện pháp 1, làm lặp lại 6 lần (n = 6), cho kết quả ở bảng 6.

Bảng 6: hàm lượng 1-NAA, Kinetin tồn dư và hoạt chất trong sâm Ngọc Linh sinh khối

Số lần rửa	0	1	2	3	4
Hàm lượng					
1-NAA (ppm)	10,6±0,7	8,1±0,5	6,1±0,4	4,9±0,3	4,7±0,3
Kinetin (ppm)	0,06±0,004	0,045±0,003	0,038±0,003	0,03±0,002	0,029±0,002
Tổng Rg1, Rb1 và Rd (%)	1,10±0,03	1,08±0,04	1,01±0,03	0,98±0,03	0,92±0,03

Từ kết quả bảng 6 cho thấy, khi tăng số lần rửa thì lượng 1-NAA tồn dư giảm dần, tuy nhiên hoạt chất cũng bị giảm theo. Rửa 3 lần thì lượng 1-NAA tồn dư là 4,9 ppm; lượng Kinetin tồn dư là 0,03 ppm. Nếu tiếp tục rửa nữa thì 1-NAA và Kinetin tồn dư giảm không đáng kể, trong khi lượng hoạt chất giảm nhiều hơn. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn quy trình rửa với nước cất 3 lần.

Tiếp tục khảo sát biện pháp 2 để loại tồn dư (môi trường nuôi cấy cuối cùng không có 1-NAA và Kinetin) và khi thu hoạch không cần rửa với nước 3 lần. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7: hàm lượng 1-NAA, Kinetin tồn dư và hoạt chất trong sâm Ngọc Linh sinh khối

Thứ tự	1	2	3	4	5	6	$\bar{X} \pm SD$
NAA (ppm)	2,8	2,5	2,7	2,5	2,4	2,4	2,6±0,16
Kinetin (ppm)	0,018	0,019	0,016	0,017	0,019	0,017	0,018±0,001
Tổng Rg1, Rb1 và Rd (%)	0,99	0,97	0,98	0,99	0,95	0,94	0,97±0,02

Kết quả ở bảng 7 cho thấy, 1-NAA và Kinetin tồn dư lần lượt là 2,6 ppm và 0,018 ppm, tổng hàm lượng hoạt chất (Rg1, Rb1, Rd) là 0,97 g tính cho 100 g bột sinh khối khô tuyệt đối. Với biện pháp này, hàm lượng hoạt chất giảm không đáng kể, trong khi lượng tồn dư 1-NAA và Kinetin giảm đáng kể. Do đó, chúng tôi lựa chọn biện pháp này để xây dựng quy trình thu hoạch sâm Ngọc Linh sinh khối.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng của sâm Ngọc Linh sinh khối. Kết quả cho thấy, tốc độ cánh khuấy có vai trò quan trọng trong việc hòa tan oxy đảm bảo cho sự phát triển và sinh tổng hợp hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh trong môi trường lỏng. Qua khảo sát, với tốc độ cánh khuấy

45 vòng/phút cho kết quả tốt nhất. Với nồng độ oxy hòa tan là 40%, thời gian nuôi cấy là 24-25 ngày, hàm lượng saponin toàn phần và khối lượng sinh khối khô thu được là cao nhất, lần lượt là $24,87 \pm 3,02$ mg/g và $31,31 \pm 3,83$ g/l. Bên cạnh đó, để thu hoạch sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh thì biện pháp tốt nhất là cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng không bổ sung các chất kích thích sinh trưởng sẽ loại bỏ được tồn dư của chúng trong nguyên liệu sinh khối cũng như trong các chế phẩm được làm từ sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh.

Tài liệu tham khảo

[1] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập I, II, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.

[2] Đỗ Tất Lợi (2005), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr 808-810.

[3] Học viện Quân y (2007), "*Hợp tác nghiên cứu xây dựng quy trình tạo khối sâm Ngọc Linh làm nguyên liệu sản xuất chế phẩm phục vụ sức khỏe cộng đồng*".

[4] Lê Bách Quang và cs (2009), *Phương pháp sản xuất sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh*, Bằng độc quyền sáng chế.

[5] Nguyễn Văn Long và cs (2010), "*Nghiên cứu bào chế nước tăng lực Vinatonic phục vụ sức khỏe cộng đồng*", đề tài cấp Bộ Quốc phòng.

[6] Vũ Tuấn Anh và cs (2013), "*Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất Sâm Ngọc Linh sinh khối và chế phẩm tăng lực Vinatonic*", Dự án sản xuất thử nghiệm cấp nhà nước.

[7] Zhang Y.H, Zhong J.J, Yu J.T, "Effect of osmotic pressure on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharides in suspension cultures of *Panax notoginseng*", *Biotechnol Lett*, **17**, pp 1347-50.

Tác dụng bảo vệ gan của cao rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya Trimeria*) trên mô hình chuột bị gây tổn thương gan bằng paracetamol

Đỗ Thị Thảo¹, Nguyễn Thị Cúc¹

Trần Thu Hường², Phạm Ngọc Khanh², Ninh Thế Sơn², Nguyễn Mạnh Cường²

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

² Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Nghiên cứu này đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao methanol và cao nước cây Xáo tam phân (*Paramignya Trimeria*) trên mô hình tổn thương gan ở chuột, gây ra bởi paracetamol. Kết quả cho thấy, ở liều 10 g/kgP, cao nước Xáo tam phân làm giảm nồng độ enzym AST, ALT huyết thanh và hạn chế tổn thương gan gây ra bởi paracetamol liều 400 mg/kgP trên chuột; còn cao methanol Xáo tam phân, ở liều 10 g/kgP có tác dụng bảo vệ gan tương đương với sylimarin ở mức liều 50 mg/kgP.

Từ khóa: bảo vệ gan, paracetamol, *Paramignya Trimeria*, Xáo tam phân.

Chỉ số phân loại 3.4

HEPATOPROTECTIVE ACTIVITIES OF PARAMIGNYA TRIMERIA ROOT EXTRACT ON THE MOUSE MODEL WITH THE LIVER INJURY CAUSED BY PARACETAMOL

Summary

The study has evaluated the hepatoprotective activities of the extract from the *Paramignya trimeria* root on the liver damage induced by paracetamol in mouse experiment. The results indicate that at the daily dose of 10 g/kgP in the course of 7 consecutive days, the liquid extract has shown promising effect through decreasing serum AST and ALT concentrations, reducing the liver histopathological injury induced by paracetamol. The methanol extract has given strong protective effect on hepatotoxicity tests at the dose of 10 g/kgP, equivalent to those of sylimarin at the dose of 50 mg/kgP.

Keywords: hepatoprotective, paracetamol, *Paramignya Trimeria*.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Gan là một cơ quan quan trọng, có vai trò chuyển hóa các chất của cơ thể. Một trong những chức năng chủ yếu của gan là tham gia vào quá trình giải độc các chất nội sinh và ngoại sinh. Trong các trường hợp bệnh lý hay có sự quá tải về lượng của các chất độc ở gan sẽ khiến các tế bào trong gan bị huỷ hoại dần, dẫn tới các tổn thương trên gan, thậm chí là hình thành các tổn thương không hồi phục, xơ gan và làm mất chức năng giải độc của gan [1]. Bệnh gan là một trong những bệnh thường gặp trong cộng đồng. Có nhiều loại bệnh gan, trong đó thường gặp là những tổn thương gan gây ra bệnh viêm gan dẫn đến xơ gan và ung thư gan, cuối cùng là gây tử vong với nguyên nhân chủ yếu là do virus và nhiễm độc. Phần lớn các chất gây độc cho gan có liên quan tới sự peroxid hóa lipid màng tế bào gan và các stress oxy hóa [2].

Để gây tổn thương gan trên chuột, người ta dùng nhiều loại hóa chất khác nhau như: paracetamol, carbontetraclohid, D-galactosamin, ethanol, erythromycin estolat, aflatoxin B... [3-8]. Mỗi mô hình tổn thương gan đều có cơ chế đặc hiệu [3-8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn paracetamol, tác nhân tổn thương gan do sinh ra gốc tự do gây peroxy hóa màng tế bào gan. Ngoài cơ chế sinh ra gốc tự do tương tự như tác nhân truyền thống gây độc gan cấp tính là CCl₄, paracetamol liều cao còn làm suy kiệt hệ

thống chống oxy hóa của cơ thể (hệ thống các chất thiol). Paracetamol sau khi vào cơ thể, một phần sẽ bị chuyển hóa bởi các cytochrom P450 tạo thành N-acetyl para-benzoquinonimin (NAPQI), một gốc tự do gây peroxy hóa lipid và sinh ra MDA, dẫn đến tổn thương các tế bào gan, làm tăng AST, ALT và làm biến đổi cấu trúc gan [9].

Cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillam) thuộc họ cam chanh (Rutaceae), là cây thuốc được sử dụng chữa trị bệnh xơ gan ở xã Ninh Vân, tỉnh Khánh Hòa. Về thành phần hóa học, bước đầu một số hợp chất coumarin đã được phân lập từ cao chiết methanol của rễ cây Xáo tam phân [10]. Để góp phần làm sáng tỏ tác dụng bảo vệ gan của loài cây này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của cao methanol và cao nước rễ cây Xáo tam phân trên mô hình chuột bị gây tổn thương gan thực nghiệm bằng paracetamol.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillam) được thu hái vào tháng 2.2013 tại xã Ninh Vân, tỉnh Khánh Hòa (số tiêu bản C-499). Tên cây do nhà thực vật học Ngô Văn Trại - Viện Dược liệu giám định. Mẫu rễ cây lấy về được rửa sạch, loại bỏ phần hư hỏng, sấy khô trong râm ở nhiệt độ 40°C, xay nhỏ thành bột. Lấy 300 g bột rễ đem chiết nguội với MeOH (300 ml x 2 lần), sau đó quay cô ở áp suất giảm thu được cao chiết MeOH. Tiến hành đun hồi lưu 300 g bột rễ với nước cất trong 1h (300 ml x 2 lần), sau đó quay cô ở áp suất giảm thu được cao chiết nước.

Động vật thực nghiệm

Chuột thuần chủng dòng BALB/c khỏe mạnh, 6-8 tuần tuổi, không phân biệt giống, khối lượng 26±2 g, được nuôi tại khu nuôi động vật của Viện Công nghệ sinh học. Chuột được nuôi trong điều kiện cung cấp đầy đủ ăn thức ăn tiêu chuẩn và nước uống tự do tại khu nuôi động vật của Viện Công nghệ sinh học trong suốt thời gian thí nghiệm.

Phương tiện và hóa chất nghiên cứu

- Hệ thống định lượng sinh hoá bán tự động AU680 của Beckman Coulter được sử dụng để định lượng AST, ALT, cholesterol và protein toàn phần trong mẫu huyết thanh.

- Các thuốc dùng trong nghiên cứu: silymarin (Legalon) dạng viên nén, hàm lượng 70 mg của Công ty Madaus (Hàn Quốc) và paracetamol (A7085 - Sigma Aldrich) dạng bột tinh khiết.

- Hóa chất, dụng cụ và kính hiển vi quang học.

Phương pháp nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của cao chiết khi gây độc bằng paracetamol

Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của cao chiết Xáo tam phân trên mô hình gây độc cho gan chuột bằng paracetamol [11, 12]. Bố trí thí nghiệm như sau: 25 chuột được chia làm 5 lô (5 con/lô). Lô 1 (chứng sinh lý): uống nước cất 0,2 ml/con/ngày; lô 2 (chứng bệnh lý): uống nước cất và uống paracetamol; lô 3: uống cao methanol Xáo tam phân, liều 10 g/kg thể trọng (kgP)/ngày và uống paracetamol; lô 4: uống cao nước Xáo tam phân, liều 10 g/kgP/ngày và uống paracetamol; lô 5 (chứng tham khảo): uống silymarin liều 50 mg/kgP/ngày [13] và uống paracetamol.

Chuột ở tất cả các lô được uống cao chiết và thuốc thử 1 lần vào buổi sáng, liên tục 7 ngày trước và 2 ngày sau khi gây độc cho gan. Ngày thứ 7 sau uống mẫu 1 giờ, nhịn đói 14-16 giờ trước đó, gây độc gan bằng cách cho uống paracetamol pha trong nước cất (chỉ cho các lô 2, 3, 4, 5) với liều 400 mg/kgP/1 lần duy nhất. Sau 48 giờ uống paracetamol, lấy máu thu huyết thanh định lượng aminotransferase (AST, ALT), cholesterol và protein toàn phần, đồng thời giết chuột, quan sát trực quan mô bệnh học của gan. Paracetamol liều 400 mg/kgP được lựa chọn để gây độc cho gan vì nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng đây là mức liều có thể gây ra những tổn thương nhất định đối với gan mà không làm chết động vật thí nghiệm. Trong khi đó nếu thử nghiệm ở mức liều cao hơn có thể gây chết động vật, còn nếu thử nghiệm ở mức liều thấp hơn thì không hình thành tổn thương cho gan [11, 12].

Phương pháp xác định chức năng gan: xác định chức năng gan thông qua định lượng aminotransferase (AST, ALT), cholesterol toàn phần và protein toàn phần trong huyết thanh chuột như sau: lấy máu chuột, ly tâm 10000 vòng trong 10 phút, thu huyết thanh, đọc kết quả trên hệ thống AU680 của hãng Beckman Coulter.

Phương pháp kiểm tra trực quan gan: sau quá trình thí nghiệm, chuột được giết bằng cách kéo giãn đốt sống cổ, mổ nhanh để kiểm tra trực quan gan.

Phương pháp xử lý số liệu: các số liệu được xử lý trên Excell, thuật toán thống kê student t' test, F'test và phương pháp phân tích phương sai một nhân tố ngẫu nhiên (one way ANOVA) và sử dụng hệ số LSD (least-significant difference) để kiểm tra sự sai khác có ý nghĩa so với đối chứng sinh lý, với

đối chứng bệnh lý (PAR), với đối chứng tham khảo (silymarin). Nếu $p < 0,05$ được coi là sai khác có ý nghĩa, nếu $p > 0,05$ thì sự sai khác là không có ý nghĩa thống kê.

Kết quả và bàn luận

Bước đầu đánh giá tác dụng bảo vệ gan của rễ cây Xáo tam phân, chúng tôi tiến hành nghiên cứu cao methanol và cao nước trên mô hình gan bị tổn thương bằng paracetamol với một liều duy nhất 400 mg/kgP trên chuột thuần chủng dòng BALB/c. Trên mô hình này, các mẫu thử được đánh giá khả năng bảo vệ gan qua 5 chỉ tiêu sau: 1 - Nồng độ aminotransferase (AST, ALT) trong huyết thanh; 2 - Nồng độ cholesterol toàn phần; 3 - Nồng độ protein toàn phần; 4 - Khối lượng gan; 5 - Kết quả kiểm tra trực quan tổn thương gan.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của cao methanol và cao nước rễ Xáo tam phân lên nồng độ aminotransferase (AST, ALT) huyết thanh

ALT và AST là hai loại enzym aminotransferase được tìm thấy chủ yếu ở các tế bào của gan và thận. Khi gan khỏe mạnh, hàm lượng của hai chỉ số ALT và AST trong máu thấp. Ngược lại, khi gan bị tổn thương, mức độ ALT và AST sẽ tăng cao do được phóng thích vào trong máu. Sự tăng cao bất thường của hai chỉ số AST và ALT cho phép đánh giá và phát hiện mức độ tổn thương của gan. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của cao methanol và cao nước Xáo tam phân lên nồng độ aminotransferase huyết thanh được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của cao methanol và cao nước lên nồng độ aminotransferase huyết thanh chuột BALB/c bị nhiễm độc paracetamol (n=5)

Lô	Thuốc và liều lượng	AST (UI/l)	ALT (UI/l)
1	NaCl 0,9%	87,80±1,48	28,70±2,59
2	NaCl 0,9% +PRA 400 g/kgP	715,75±253,94 $p < 0,05$ so với (1)	558,25±296,54 $p < 0,05$ so với (1)
3	Cao methanol 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	116,50±34,65 $p < 0,05$ so với (2) $p > 0,05$ so với (5)	81,25±8,59 $p < 0,05$ so với (2) $p > 0,05$ so với (5)
4	Cao nước 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	266,00±170,92 $p < 0,05$ so với (2) $p < 0,05$ so với (5)	113,25±27,41 $p < 0,05$ so với (2) $p < 0,05$ so với (5)
5	Silymarin 50 mg/kgP + PRA 400 mg/kgP	101,33±23,03 $p < 0,05$ so với (1) $p < 0,05$ so với (2)	46,67±11,47 $p < 0,05$ so với (1) $p < 0,05$ so với (2)

Bảng 1 cho thấy, khi chuột được uống cao methanol, cao nước Xáo tam phân và silymarin (lô 3, 4, 5) thì các chỉ số AST và ALT đều thấp hơn so với đối chứng là lô không được sử dụng hoạt chất bảo vệ (lô 2). Như vậy, cao methanol, cao nước và silymarin đều cho thấy tác dụng bảo vệ gan khi các phân tích cho thấy sự sai khác về chỉ số enzym gan cơ bản là có ý nghĩa thống kê so với lô 2 (đối chứng), $p < 0,05$.

Kết quả ở bảng 1 cũng cho thấy, chuột uống cao methanol (lô 3) liều 10 g/kgP đã có các chỉ số enzym AST và ALT tương đương với các chuột được uống silymarin 50 mg/kgP. Phân tích cho thấy, các chỉ số này không có sự sai khác thống kê khi $p > 0,05$, dẫn tới lập luận rằng cao methanol ở nồng độ 10 g/kgP/ngày có tác dụng bảo vệ gan khá tốt, tương đương với silymarin liều 50 mg/kgP/ngày.

Các chuột uống cao nước liều 10 g/kgP có các chỉ số enzym chức năng gan còn cao và khi so sánh chúng với các chuột uống silymarin 50 mg/kgP thì có sự sai khác thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này cho thấy, cao nước ở nồng độ 10 g/kgP/ngày có khả năng bảo vệ gan kém hơn so với silymarin liều 50 mg/kgP/ngày.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của cao methanol và cao nước Xáo tam phân lên nồng độ cholesterol toàn phần

Ảnh hưởng của cao methanol và cao nước Xáo tam phân lên nồng độ cholesterol toàn phần được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: ảnh hưởng của cao methanol và cao nước lên nồng độ cholesterol toàn phần huyết thanh chuột BALB/c bị nhiễm độc paracetamol (n=5)

Lô	Thuốc và liều lượng	Cholesterol TP (mmol/l)	Giá trị p
1	NaCl 0,9%	2,38±0,08	
2	NaCl 0,9% +PRA 400 mg/kgP	3,43±0,54	$p < 0,05$ so với (1)
3	Cao methanol liều 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	2,78±0,49	$p > 0,05$ so với (1) $p < 0,05$ so với (2) $p > 0,05$ so với (5)
4	Cao nước liều 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	3,23±0,30	$p < 0,05$ so với (1) $p > 0,05$ so với (2)
5	Silymarin 50 mg/kgP +PRA 400 mg/kgP	2,80±0,44	$p > 0,05$ so với (1) $p < 0,05$ so với (2)

Bảng 2 cho thấy, khi chuột được uống cao methanol liều 10 g/kgP và silymarin 50 mg/kgP thì chỉ số cholesterol toàn phần đã được cải thiện gần bằng so với lô chứng 1 ($p>0,05$) và có sự sai khác thống kê so với lô chứng âm 2 ($p<0,05$). Trong khi đó, ở lô được uống cao nước liều 10 g/kgP thì không có sự sai khác thống kê so với lô chứng âm 2 ($p>0,05$). Như vậy, ở chỉ số cholesterol toàn phần, chuột được uống cao methanol của rễ cây Xáo tam phân liều 10 g/kgP đã cho thấy hoạt tính bảo vệ gan khi so sánh với tác dụng của silymarin 50 mg/kgP, trong khi cao chiết từ nước không thể hiện rõ khả năng này.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của cao methanol và cao nước rễ Xáo tam phân lên hàm lượng protein toàn phần trong mẫu huyết thanh

Ảnh hưởng của cao methanol và cao nước rễ Xáo tam phân lên hàm lượng protein toàn phần được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: ảnh hưởng của cao methanol và cao nước lên hàm lượng protein toàn phần

Lô	Thuốc và liều lượng	Protein TP (mmol/l)	Giá trị p
1	NaCl 0,9%	49,80±0,84	
2	NaCl 0,9% +PRA 400 mg/kgP	61,67±2,08	$p<0,05$ so với (1)
3	Cao methanol liều 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	61,55±1,41	$p>0,05$ so với (2) $p<0,05$ so với (5)
4	Cao nước liều 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	57,75±1,69	$p>0,05$ so với (2) $p<0,05$ so với (5)
5	Silymarin 25 mg/kgP +PRA 400 mg/kgP	55,00±2,20	$p<0,05$ so với (1) $p<0,05$ so với (2)

Bảng 3 cho thấy, lô chuột uống cao methanol và cao nước nhưng không có sự sai khác thống kê so với lô chứng âm 2 ($p>0,05$) và so với đối chứng dương silymarin thì chỉ số protein toàn phần là có sự sai khác thống kê ($p<0,05$). Như vậy, cao methanol và cao nước Xáo tam phân ở liều 10 g/kgP không có tác dụng giảm protein toàn phần.

Khối lượng gan

Sau quá trình thí nghiệm, toàn bộ chuột được mổ để thu nhận gan và được xác định khối lượng theo phương pháp của Girish và đồng tác giả [11]. Kết quả thu được được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4: khối lượng gan chuột ở các lô thí nghiệm

Lô	Thuốc và liều lượng	Quan sát hình thái trực quan gan
1	NaCl 0,9%	Gan bình thường, nhu mô gan đồng nhất
2	NaCl 0,9% +PRA 400 mg/kgP	3/5 con gan bị hoại tử toàn bộ và xung huyết toàn bộ gan, gan to phù, nhu mô sần sùi không mịn
3	Cao methanol 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	Gan bình thường, nhu mô gan đồng nhất
4	Cao nước 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	1/5 con gan bị tổn thương, nhu mô gan không đều
5	Silymarin 50 mg/kgP +PRA 400 mg/kgP	Gan bình thường, nhu mô gan đồng nhất

Kết quả kiểm tra khối lượng gan cho thấy, gan ở lô đối chứng bệnh lý (không được sử dụng cao chiết Xáo tam phân) có khối lượng lớn nhất. Trong khi đó, ở các lô được sử dụng cao chiết Xáo tam phân, khối lượng gan nhỏ hơn so với đối chứng và sự sai khác này là có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ khi so sánh với lô đối chứng (lô sử dụng cao methanol so với lô đối chứng dương silymarin; lô sử dụng cao nước so với lô chứng âm 2).

Kết quả kiểm tra trực quan tổn thương gan

Kết quả giải phẫu bệnh học cho thấy, lô thí nghiệm có chuột uống cao methanol và cao nước liều 10 g/kgP cũng như lô uống silymarin 50 mg/kgP, về hình thái trực quan và đại thể gan thì biểu hiện tổn thương gan có giảm so với lô chứng bệnh lý (lô 2). Cụ thể là lô chuột uống cao methanol liều 10 g/kgP và lô uống silymarin 50 mg/kgP không thấy biểu hiện tổn thương gan (bảng 5).

Bảng 5: quan sát hình thái trực quan gan chuột ở các lô thí nghiệm

Lô	Thuốc và liều lượng	Khối lượng gan (g/10g cơ thể)	Giá trị p
1	NaCl 0,9%	0,381±0,009	
2	NaCl 0,9% +PRA 400 mg/kgP	0,567±0,033	$p<0,05$ so với (1)
3	Cao methanol 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	0,404±0,011	$p<0,05$ so với (5) $p>0,05$ so với (2)
4	Cao nước 10 g/kgP +PRA 400 mg/kgP	0,461±0,042	$p<0,05$ so với (2) $p>0,05$ so với (5)
5	Silymarin 50 mg/kgP +PRA 400 mg/kgP	0,490±0,067	$p<0,05$ so với (1)

Kết quả nghiên cứu cho thấy, lô chuột uống paracetamol liều 400 mg/kgP/ngày có hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh tăng cao và thể hiện tổn thương gan rõ rệt (về hình thái) so với lô chứng sinh học. Các lô chuột uống cao methanol và cao nước Xáo tam phân ở liều 10 g/kgP trong vòng 7 ngày đã làm giảm hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh, giảm hàm lượng cholesterol toàn phần, giảm khối lượng gan và hạn chế tổn thương gan so với lô đối chứng âm 2. Trong đó, lô chuột uống cao methanol 10 g/kgP có tác dụng ngăn cản rõ rệt độc tính của paracetamol đối với gan, tương đương với đối chứng dương sylimarín 50 mg/kgP. Như vậy, cao methanol của rễ cây Xáo tam phân có khả năng bảo vệ gan tốt trên mô hình gan chuột bị tổn thương bằng paracetamol. Về mặt hóa học, từ cao methanol của rễ cây Xáo tam phân đã phân lập và xác định cấu trúc của 4 hợp chất coumarin [10]. Vấn đề đặt ra là, cần nghiên cứu phát hiện phân đoạn, nhóm hợp chất hoặc hợp chất có tác dụng bảo vệ gan trong cao chiết MeOH của rễ cây Xáo tam phân trên mô hình tổn thương gan bằng paracetamol.

Kết luận

Cao nước Xáo tam phân ở liều 10 g/kgP chuột có tác dụng bảo vệ gan thấp thông qua tác dụng làm giảm hoạt độ AST, ALT và hạn chế được một phần tổn thương gan gây bởi paracetamol liều 400 mg/kgP chuột.

Cao methanol Xáo tam phân ở liều 10 g/kgP chuột có tác dụng bảo vệ gan tốt gần tương đương so với chất đối chứng dương sylimarín 50 mg/kgP khi thử nghiệm trên chuột.

Tài liệu tham khảo

- [1] M.U Dianzani, G. Muzia, M.E Biocca, R.A Canuto (1991), "Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats", *Int. J. Tissue React*, **13**, 79-85.
- [2] S. Shahani (1999), "Evaluation of hepatoprotective efficacy of APCL - A polyherbal formulation in vivo in rats", *Indian Drugs*, **36**, 628-631.
- [3] Yanmang Cui, Xingbin Yang, Xinshan Lu, Jinwen Chen, Yan Zhao (2014), "Protective effects of polyphenols-enriched extract from Huangshan Maofeng green tea against CCl₄-induced liver injury in mice", *Chemico-Biol. Interact*, **220**, 75-83.
- [4] Mohanraj Subramanian, Sangameswaran Balakrishnan, Santhosh Kumar Chinnaiyan, Vinoth Kumar Sekar, Atul N. Chandu (2013), "Hepatoprotective effect of leaves of *Morinda tinctoria* Roxb. against paracetamol induced liver damage in rats", *Drug Invention Today*, **5(3)**, 223-228.
- [5] Yanling Shi, Jie Sun, Hui He, Hui Guo, Sheng Zhang (2008), "Hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides against D-galactosamine-induced liver injury in mice", *J. Ethnopharmacol*, **117(3)**, 415-419.
- [6] Akiko Tamura, Mio Sasaki, Haruka Yamashita, Isao Matsui-Yuasa, Taro Saku, Tadamasu Hikima, Masaki Tabuchi, Hiroshi Munakata, Akiko Kojima-Yuasa (2013), "Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats", *J. Funct. Foods*, **5(4)**, 1714-1723.
- [7] LPari, PMurugan (2004), "Protective role of tetrahydrocurcumin against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity", *Pharmacol Res*, **49(5)**, 481-486.
- [8] K.C Choi, W.T Chung, J.K Kwon, J.Y Yu, Y.S Jang, S.M Park, S.Y Lee, J.C Lee (2010), "Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B₁-induced hepatic damage in mice", *Food Chem Toxicol*, **48(10)**, 2747-2753.
- [9] Sabina E, Jaisy Samuel, Segu Rajappa Ramya, Smita Patel, Niharika Mandal, Preety Pranatharthiiharan, Mishra P.P, MahaboobKhan Rasool (2009), "Hepatoprotective and antioxidant potential of *Spirulina fusiformis* on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice", *Int J Integr Biol*, **6(1)**, 1-5.
- [10] Nguyễn Mạnh Cường, Hồ Việt Đức, Nguyễn Văn Tài, Phạm Ngọc Khanh, Vũ Thị Hà, Trần Thu Hương, Nguyễn Duy Nhất (2013), "Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học cây Xáo tam phân, họ Rutaceae", *Tạp chí Hóa học*, **51(3)**, 294-298.
- [11] Girish C, Koner B.C, Jayanthi S, Rao K.R, Rajesh B, Pradhan S.C (2009), "Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice", *Indian J. Med. Res*, **129**, 569-578.
- [12] Pei-Ju Chen, Victor Fei Pang, Yung-Ming Jeng, Ting-Ju Chen, Fang-Ching Hu, Wei-Ting Chi, Hsiao-Yin Chou, Hsien-Chiao Chiu, Yu-Chun Lee and Lee-Yan Sheen (2012), "Establishment of a Standardized Animal Model of Chronic Hepatotoxicity Using Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in the Evaluation of Hepatoprotective Effects of Health Food", *J. Food Drug Anal*, **20(1)**, 41-47.
- [13] Tauqeer Hussain Mallhi, M. Imran Qadir, Yusra Habib Khan and Muhammad Ali (2014), "Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* against paracetamol induced hepatotoxicity in mice", *Bangladesh J. Pharmacol*, **9**, 60-66.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết 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 viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, 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.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khoá bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

Dẫn nhập/đặt vấn đề

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.

Đối tượng và phương pháp

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...

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.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

Bàn luận

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.

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.

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 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

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...

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).

Tập (số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này in đậm).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Chú ý: nếu có ≥ 2 tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa 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.

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 Y - dược học

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

- 1 Bone marrow-derived stem cell therapy in heart failure patients after acute myocardial infarction**
Nguyen Lan Viet, Do Doan Loi...
- 8 The treatment result of endovascular intervention application for hepatic injury in Viet - Duc Hospital**
Nguyen Mau Dinh, Nguyen Duy Hue...
- 15 Result of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration**
Pham Thi Mai, Do Quyet...
- 19 Initial results of lung volume reduction by bronchial valve for treating serious emphysema**
Dong Khac Hung, Ta Ba Thang...
- 24 Are the hemodynamic parameters measured by USCOM reliable?**
Nguyen Thi Ngoc, Nguyen Thuy Ngan...
- 28 Pre-implantation genetic diagnosis and application prospect in Vietnam**
Nguyen Dinh Tao
- 33 Using experimental planning method to prepare sustained-release felodipine tablets with hydrophilic matrix**
Hoang Van Duc, Nguyen Thi Thanh Duyen...
- 39 Researching and developing Etanercept using recombinant protein technology for treatment of Rheumatoid Arthritis**
Nguyen Thi Thuy Trang, Doan Chinh Chung...
- 44 Preparation of Paclitaxel intravenous drug at concentrated solution and lyophilized powder dosage forms**
Nguyen Thanh Ha, Le Minh Tri...
- 51 Carboplatin measuring method in freeze-dried carboplatin injection drug by HPLC**
Phan Thi My Hoang, Banh Thi Ngoc Quynh...
- 55 Investigating the impact of some elements on the Panax vietnamensis's biomass quality based on 100-liter bioreactor**
Vu Tuan Anh, Chu Van Men
- 60 Hepatoprotective activities of Paramignya Trimeria root extract on the mouse model with the liver injury caused by paracetamol**
Do Thi Thao, Nguyen Thi Cuc...