



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 57 - Số 8 - Tháng 8 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 TBG tủy xương tự thân trong điều trị khớp giả, hoại tử vô khuẩn chỏm xương đùi và kéo dài chi

Nguyễn Thị Thu Hà^{1*}, Lý Tuấn Khải¹, Nguyễn Thanh Bình¹, Lê Văn Đoàn¹
Đỗ Tiến Dũng¹, Lê Hồng Hải¹, Nguyễn Mạnh Khánh²

¹Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

²Bệnh viện Việt Đức

Ngày nhận bài 20.3.2015, ngày chuyển phản biện 2.4.2015, ngày nhận phản biện 3.5.2015, ngày chấp nhận đăng 8.5.2015

Việc sử dụng tế bào gốc (TBG) tủy xương trong điều trị một số tổn thương xương khớp hiện đang được các tác giả trong và ngoài nước quan tâm nghiên cứu. Ở Việt Nam, công trình nghiên cứu sử dụng TBG tủy xương tự thân trong điều trị khớp giả (KG), hoại tử vô khuẩn chỏm xương đùi (CXĐ) và kéo dài chi là một trong những công trình nghiên cứu đầu tiên trong lĩnh vực này, tạo cơ sở cho nhiều nghiên cứu tiếp theo. Nghiên cứu nhằm thực hiện các mục tiêu: 1) Đánh giá kết quả điều trị KG thân xương dài, hoại tử vô khuẩn CXĐ, kéo dài chi bằng ghép TBG tủy xương tự thân; 2) Xác định mối liên quan giữa số lượng TBG được ghép với hiệu quả điều trị. Trong tổng số 228 bệnh nhân (BN) được nghiên cứu, có 142 BN KG thân xương dài, 50 BN hoại tử vô khuẩn CXĐ giai đoạn I, II (theo ARCO) và 36 BN tằm vóc thấp được kéo dài chi. Với phương pháp tiêm trực tiếp 20-30 ml khối TBG tự thân chiết tách từ 250-350 ml dịch tủy xương vào vị trí tổn thương, kết quả cho thấy, 84,5% BN KG đã liền xương với thời gian trung bình là $19,8 \pm 9,5$ tuần và đã được ghép nhiều TBG trung mô hơn so với những BN không liền xương; 82% BN hoại tử vô khuẩn CXĐ đạt kết quả điều trị từ khá, tốt đến rất tốt (theo thang điểm Harris) đã được ghép số lượng TBG trung mô nhiều hơn so với nhóm đạt kết quả điều trị trung bình và kém; những BN kéo dài chi được ghép TBG có thời gian liền xương trung bình cho 1 cm kéo dài là $29,5 \pm 4,5$ ngày, giảm đáng kể so với không sử dụng TBG. Sau quá trình theo dõi kết quả điều trị 5 năm sau ghép, có thể kết luận: TBG tủy xương tự thân sử dụng trong điều trị KG, hoại tử vô khuẩn CXĐ và kéo dài chi có hiệu quả tốt và an toàn, có mối liên quan thuận giữa số lượng TBG được ghép và kết quả điều trị.

Từ khóa: hoại tử vô khuẩn CXĐ, kéo dài chi, KG, TBG tủy xương.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

Tủy xương là một tổ chức chứa nhiều loại TBG khác nhau như TBG tạo máu, TBG trung mô, tế bào tiền thân nội mạc... Những TBG này có rất nhiều tiềm năng và đã được ứng dụng trong nhiều phương pháp điều trị dựa trên cơ sở tế bào, đặc biệt là những phương pháp điều trị sửa chữa, tái tạo tổ chức. Một trong những ứng dụng thuộc loại này đã được một số tác giả trên thế giới nghiên cứu trong những năm gần đây và đã thu được những kết quả đầy hứa hẹn, đó là sử dụng TBG tủy xương trong điều trị những tổn thương xương, khớp khó hồi phục [1-3]...

Ở Việt Nam, lần đầu tiên từ năm 2007, nhóm nghiên cứu của chúng tôi gồm các bác sỹ chuyên ngành huyết học và chấn thương chỉnh hình đã tiến hành đề tài nghiên cứu: “Sử dụng TBG tủy xương tự thân trong điều trị KG, hoại tử vô khuẩn CXĐ và kéo dài chi” với

2 mục tiêu: 1) Đánh giá kết quả điều trị các tổn thương; 2) Xác định mối liên quan giữa số lượng TBG được ghép với hiệu quả điều trị. Những kết quả của đề tài chính là những cơ sở khoa học đầu tiên cho việc triển khai những đề tài sau này như “Nghiên cứu xây dựng quy trình sử dụng TBG tạo máu tự thân để điều trị các tổn thương cơ, khớp, xương khó liền” [1]... Dưới đây là những kết quả nghiên cứu chính về sử dụng TBG tủy xương tự thân trong điều trị KG, hoại tử vô khuẩn CXĐ và kéo dài chi.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

228 BN tuổi từ 18 đến 58 (166 nam và 62 nữ) có các tổn thương xương khớp được điều trị bằng ghép TBG tủy xương tự thân tại Viện Chấn thương chỉnh hình - Bệnh viện

*Tác giả chính: Tel: 0912533555, Email: thuhahh108@vnn.vn

APPLYING AUTOLOGOUS BONE MARROW STEM CELL IN TREATMENT OF LONG BONE NONUNIONS, ASEPTIC FEMORAL HEAD OSTONECROSIS AND LIMB LENGTHENING

Summary

Using bone marrow stem cell (BMSC) in treatment of bone and joint diseases has been researched in this study. The research objectives are to: 1) evaluate the effect of autologous BMSC on treatment of long bone nonunions, aseptic femoral head osteonecrosis and limb lengthening; 2) determine the relationship between the number of grafted stem cells and the clinical outcome. This study has been conducted on 142 patients with long bone nonunions, 50 patients with aseptic femoral head osteonecrosis, and 36 patients with limbs lengthened by Ilizarov's principle. Methods: 20-30 milliliters of autologous BMSC mass separated from 250-350 milliliters of aspirated bone marrow fluid have been injected into the sites of bone lesions. The results have shown that: 84.5% patients with bone nonunions have achieved bone union with the bone healing time of 19.8 ± 9.5 weeks; 82% patients with aseptic femoral head osteonecrosis have had good outcome (based on Harris criteria); the bone healing time for 1 centimeter of length in patients with lengthened limbs and grafted BMSC has been 29.5 ± 4.5 days, significantly shorter than that in patients without grafting BMSC. The patients followed up approximately 5 years after being grafted by BMSC have had good outcomes. In conclusion, autologous bone marrow stem cell grafting is a safe and effective method in treatment of long bone nonunion, aseptic femoral head osteonecrosis and limb lengthening; there is a relationship between the number of grafted stem cells and the clinical outcome.

Keywords: aseptic femoral head osteonecrosis, bone marrow stem cell, limb lengthening, nonunion.

Classification number 3.2

Trung ương Quân đội 108 và Khoa Chấn thương chỉnh hình - Bệnh viện Việt Đức từ tháng 2.2007 đến tháng 8.2012, bao gồm:

+ 142 BN KG thân xương dài (nhóm I)

+ 50 BN hoại tử vô khuẩn CXĐ giai đoạn I, II (theo ARCO [4]) (nhóm II)

+ 36 BN điều trị kéo dài chi theo nguyên lý Ilizarov hết giai đoạn căng dẫn (nhóm III).

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: tiền cứu, can thiệp lâm sàng cắt ngang có theo dõi dọc.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

- Xét nghiệm tế bào máu và tủy xương: sử dụng máy đếm tế bào tự động CD1800 (Abbott - Hoa Kỳ) và phương pháp tế bào học kính hiển.

- Tách khối TBG từ dịch hút tủy xương: mỗi BN được chọc hút thu gom 250-350 ml dịch tủy xương từ hai mào chậu sau. Khối TBG được tách bằng phương pháp ly tâm gradient tỷ trọng sử dụng dung dịch Ficoll ($\rho = 1,077$) hoặc máy tách tế bào tự động COMTEC (Fresenius - Đức), huyền dịch bằng nước muối sinh lý để có thể tích cuối cùng là 30 ml [1].

- Xác định thành phần TBG tạo máu CD34⁺: sử dụng phương pháp tế bào dòng chảy theo hướng dẫn của ISHAGE [5].

- Xác định TBG trung mô bằng kỹ thuật nuôi cấy cụm nguyên bào sợi CFU-F (Colony forming unit - Fibroblast) với môi trường nuôi cấy của Stem cell technologies (Canada) [6].

- Kỹ thuật tiêm TBG tủy xương vào ổ KG và ổ căng dẫn: khối TBG tủy xương được ghép qua da vào ổ KG tại phòng mổ vô trùng, có trợ giúp của X-quang tăng sáng và C-arm [7].

- Đánh giá kết quả sau ghép từ 6 tháng trở lên dựa trên khám lâm sàng và hình ảnh trên phim X-quang.

- Kỹ thuật tiêm TBG vào CXĐ hoại tử: khối TBG tủy xương được ghép vào vị trí ổ hoại tử CXĐ qua đường khoan giảm áp tại phòng mổ vô trùng, có trợ giúp của X-quang tăng sáng và C-arm [2, 8].

- Đánh giá kết quả theo thang điểm Harris tại các thời điểm sau ghép 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 1 năm, những năm tiếp theo mỗi năm 1 lần [9].

Xử lý số liệu: bằng các thuật toán thống kê với phần

mềm SPSS 18.0.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả xác định các thành phần của khối TBG

Các chỉ số đánh giá thành phần TBG tạo máu và TBG trung mô trong khối TBG của 3 nhóm bệnh nhân nghiên cứu được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: thành phần TBG tạo máu và TBG trung mô trong khối TBG

Chỉ số	Nhóm I ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm II ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm III ($\bar{X} \pm SD$)
n	142	50	36
Tỷ lệ CD34 ⁺ (%)	1,25±0,60	1,04±0,61	1,29±0,64
Tổng số CD34 ⁺ (x10 ⁶)	16,4±8,6	13,7±11,5	14,9±9,3
Số lượng tế bào tạo cụm CFU-F/ml (x10 ³)	2,21±1,50	1,23±0,70*	1,83±1,24
Tổng số CFU-F (x10 ³)	70,6±51,9	48,6±31,0*	60,1±36,8

*p^{I-II} < 0,05

Nhận xét: các chỉ số đánh giá thành phần TBG tạo máu (tỷ lệ và tổng số tế bào CD34⁺) trong khối TBG là tương đương giữa 3 nhóm BN, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Các chỉ số đánh giá thành phần TBG trung mô trong khối TBG (nồng độ tế bào tạo cụm CFU-F có trong 1 ml và tổng số tế bào tạo cụm CFU-F) của nhóm I (nhóm BN KG) cao hơn so với nhóm II (nhóm BN hoại tử CXĐ) có ý nghĩa thống kê với p < 0,05.

Kết quả liền xương của nhóm KG thân xương dài (nhóm I)

Kết quả đánh giá liền xương ở 142 BN có 142 ổ KG với thời gian theo dõi trung bình 21 tháng (9-39 tháng) được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: tỷ lệ liền xương và thời gian liền xương trên phim X-quang

Vị trí KG	n	Liền xương		Thời gian liền xương ($\bar{X} \pm SD$) (tuần)	Không liền	
		n	%		n	%
Cẳng chân	95	81	85,3	21,4±10,2	14	14,7
Đùi	19	16	84,2	16,8±4,5	03	15,8
Cánh tay	10	08	80,0	15,5±3,8	02	20,0
Cẳng tay	18	15	83,3	22,7±13,6	03	16,7
Tổng số	142	120	84,5	19,8±9,5	22	15,5

Nhận xét: tỷ lệ đạt liền xương của tất cả các BN là 84,5% (120/142 BN). Thời gian liền xương trên phim X-quang của tất cả các BN là 19,8±9,5 tuần; có 22/142

BN không liền xương, chiếm tỷ lệ 15,5%.

Mối liên quan giữa số lượng TBG được ghép với kết quả điều trị liền xương được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: liên quan giữa số lượng TBG được ghép với kết quả điều trị liền xương

Chỉ số	Liền xương ($\bar{X} \pm SD$)	Không liền ($\bar{X} \pm SD$)	p
n	120	22	
Tỷ lệ CD34 ⁺ (%)	0,57±0,35	0,56±0,39	>0,05
Tổng số CD34 ⁺ (x10 ⁶)	17,5±8,50	16,9±11,8	>0,05
Số lượng tế bào tạo cụm CFU-F/ml (x10 ³)	2,40±1,43	1,03±0,98	<0,05
Tổng số CFU-F (x10 ³)	79,6±54,3	31,1±29,9	<0,05

Nhận xét: số lượng tế bào CD34⁺/ml, tổng số tế bào CD34⁺ được ghép của nhóm BN đạt được liền xương tương tự như của nhóm BN không đạt được liền xương nhưng số lượng tế bào tạo cụm CFU-F/ml và tổng số tế bào tạo cụm CFU-F cao hơn có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Kết quả điều trị của nhóm hoại tử vô khuẩn CXĐ (nhóm II)

Kết quả điều trị của nhóm II tính theo thang điểm Harris trước và sau ghép TBG được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4: kết quả điều trị theo điểm chức năng khớp háng Harris trước và sau ghép TBG

Điểm Harris	Trước ghép TBG		Sau ghép TBG (10 đến 40 tháng)	
	n	%	n	%
<60 (Kém)	0	0	01	2,0
60-69 (Trung bình)	10	20,0	08	16,0
70-79 (Khá)	28	56,0	06	12,0
80-89 (Tốt)	07	14,0	06	12,0
91-100 (Rất tốt)	05	10,0	29	58,0
Tổng số	50	100	50	100

Nhận xét: đánh giá theo thang điểm Harris, sau ghép TBG tùy xương tự thân đã có 41 BN (82%) đạt kết quả khá, tốt, rất tốt và 8 BN (16%) có kết quả trung bình, 1 BN (2%) có kết quả kém. Số BN đạt rất tốt tăng đáng kể, từ 5 BN (10%) trước ghép lên 29 BN (58%) sau khi được ghép TBG.

Mối liên quan giữa số lượng TBG được ghép với kết quả điều trị theo thang điểm Harris được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5: liên quan giữa số lượng TBG được ghép với kết quả điều trị theo thang điểm Harris

Chỉ số	Khá, tốt, rất tốt	Trung bình, kém	p
n	41	9	
Tỷ lệ CD34 ⁺ (%)	0,39±0,30	0,36±0,09	>0,05
Tổng số CD34 ⁺ (x10 ⁶)	14,81±7,20	13,63±6,27	>0,05
Số lượng tế bào tạo cụm CFU-F/ml (x10 ³)	1,33±0,93	0,92±0,20	<0,05
Tổng số CFU-F (x10 ³)	47,7±36,8	32,2±19,2	<0,05

Nhận xét: tỷ lệ tế bào CD34⁺, tổng số lượng tế bào CD34⁺ trong khối TBG được ghép của nhóm BN có kết quả điều trị từ khá đến tốt tương tự như nhóm BN có kết quả điều trị kém và trung bình. Tuy nhiên, số lượng tế bào tạo cụm CFU-F/ml và tổng số tế bào tạo cụm CFU-F được ghép của nhóm BN có kết quả điều trị từ khá đến tốt cao hơn nhóm BN có kết quả điều trị trung bình và kém, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Kết quả liền xương của nhóm khuyết hổng xương sau kéo dài chi (nhóm III)

Các chỉ số tế bào của khối TBG tiêm vào ổ cấy dẫn của 2 chi được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6: các chỉ số tế bào của khối TBG tiêm vào ổ cấy dẫn

Chỉ số	Khối TBG thu được	Khối TBG tiêm cho 1 ổ cấy dẫn
n	36	72
Tỷ lệ CD34 ⁺ (%)	1,29±0,64	1,25±0,60
Tổng số CD34 ⁺ (x10 ⁶)	14,9±9,3	8,70±4,20
Số lượng tế bào tạo cụm CFU-F/ml (x10 ³)	1,83±1,24	1,83±1,24
Tổng số CFU-F (x10 ³)	60,1±36,8	30,8±26,2

Nhận xét: khối TBG thu được sau chiết tách của mỗi BN được chia thành 2 phần đều nhau để tiêm vào 2 ổ cấy dẫn của 2 chi nên tổng số tế bào CD34⁺ và CFU-F của khối TBG tiêm cho 1 ổ cấy dẫn chỉ tương đương 1/2 chỉ số của khối TBG thu được của 1 BN.

Bảng 7 thể hiện thời gian liền xương/cm của nhóm kéo dài chi đơn thuần so với nhóm có kết hợp tiêm TBG.

Bảng 7: thời gian liền xương/cm kéo dài xương

Nhóm BN	n	Độ dài ổ cấy dẫn (cm)	Thời gian liền xương/cm kéo dài (ngày)	p
Kéo dài chi	80	5,9±2,9	39,3±6,3	<0,001
Kéo dài chi + tiêm TBG	72	7,2±4,1	29,5±4,5	

Nhận xét: thời gian liền xương của nhóm kéo dài chi theo phương pháp Ilizarov đơn thuần và nhóm có kết hợp tiêm TBG có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Kết quả theo dõi xa

Kết quả theo dõi xa của 3 nhóm BN sau ghép TBG được thể hiện trong bảng 8.

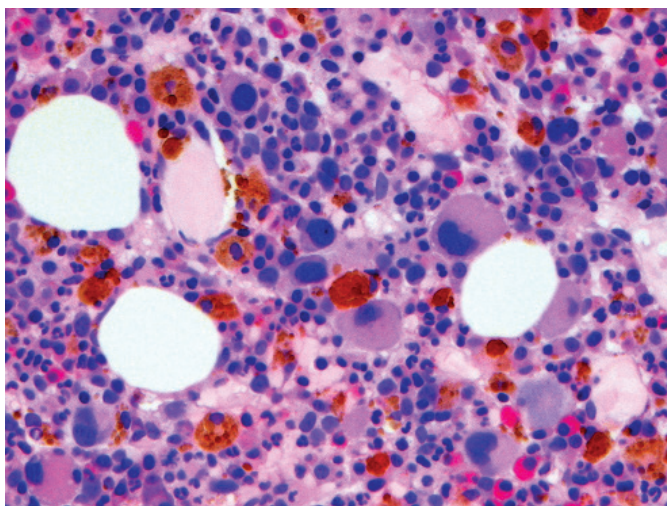
Bảng 8: kết quả theo dõi xa của 3 nhóm BN sau ghép TBG

Nhóm BN	n	Thời gian theo dõi trung bình (năm)	Chức năng vận động	Biến chứng
KG (nhóm I)	96	5,7±1,6	Tốt	Không
Hoại tử CXĐ (nhóm II)	35	4,9±1,1	Tốt	Không
Kéo dài chi (nhóm III)	32	5,1±1,2	Tốt	Không

Nhận xét: những BN ở 3 nhóm bệnh đã được điều trị bằng ghép TBG tủy xương tự thân được theo dõi sau ghép khoảng thời gian trung bình 5 năm đã cho thấy chức năng vận động của khớp, chi tốt, không có biến chứng liên quan đến ghép.

Bàn luận

Nghiên cứu được tiến hành trên 228 BN tuổi trưởng thành (166 nam, 62 nữ). Về mặt tổn thương, có 142 BN bị KG các thân xương dài (đùi, cẳng chân, cánh tay và cẳng tay), 50 BN bị hoại tử vô khuẩn CXĐ giai đoạn I và II theo ARCO và 36 BN kéo dài chi nâng chiều cao. Các BN được điều trị dựa theo phương pháp của Gangji [8] và Hernigou [2, 7] theo một quy trình thống nhất: chọc hút khoảng 250-350 ml dịch tủy xương từ xương mào chậu, tách chiết cô đặc để thu được khối TBG với thể tích 20-30 ml. Đối với BN KG và kéo dài chi, khối TBG được tiêm qua da vào tổn thương dưới hướng dẫn của C-arm và X-quang tăng sáng; đối với BN hoại tử vô khuẩn CXĐ, khối TBG được đưa vào vùng hoại tử chỏm qua đường khoan giảm áp, có hướng dẫn của C-arm và X-quang tăng sáng. Tất cả các BN đã được tiến hành quy trình điều trị an toàn, không có biến chứng phải xử lý,



Tế bào gốc tủy xương

ngoại trừ 1 BN hoại tử vô khuẩn CXĐ khi tiêm TBG bị rò rỉ dịch vào khe khớp nên BN đau, phải xử trí và kết quả điều trị bị ảnh hưởng (kết quả kém).

Ở nhóm BN KG thân xương dài (nhóm I), khối TBG ghép vào ổ KG có tổng số TBG tạo máu là $16,4 \pm 8,6 \times 10^6$ và tổng số TBG trung mô là $70,6 \pm 51,9 \times 10^3$. Thời gian đánh giá kết quả liền xương tối thiểu 6 tháng sau ghép TBG tủy xương. Nếu sau 6 tháng không thấy biểu hiện liền xương được coi là thất bại và phải xem xét ghép TBG tủy xương lần 2 hoặc chuyển phương pháp điều trị khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá kết quả ở 142 BN có 142 ổ KG với tỷ lệ liền xương là 84,5% (120/142 BN), trong đó xương cẳng chân là 85,3% (81/95 BN), xương đùi là 84,2% (16/19 BN), xương cánh tay là 80% (8/10 BN) và xương cẳng tay là 83,3% (15/18 BN); thời gian liền xương là $19,8 \pm 9,5$ tuần. Hernigou ghép TBG tủy xương cho 60 trường hợp KG teo hết thân xương chày đạt tỷ lệ liền xương 88,3% và thời gian liền xương trung bình là 12 tuần (4-16 tuần) [7]. Một số nghiên cứu khác đã công bố tỷ lệ liền xương là 57-94% [3]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, nhóm BN liền xương được nhận khối TBG có nồng độ TBG trung mô (TB tạo cụm CFU-F/ml) và tổng số lượng TBG trung mô cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm BN không liền xương, còn nồng độ và tổng số lượng TBG tạo máu thì tương tự nhau giữa hai nhóm. Như vậy, các thành phần tế bào có trong khối TBG có ảnh hưởng đến hiệu quả liền xương nhưng vai trò của từng loại tế bào là không như nhau. Ảnh hưởng của TBG tạo máu không rõ rệt, còn ảnh hưởng của số lượng TBG trung mô tới quá trình liền xương là khá rõ ràng. Theo Hernigou, số lượng TBG tủy xương ghép cho BN ảnh hưởng tới kết quả liền xương. Trong 60 BN KG thân xương chày được ghép TBG tủy xương, tác giả thấy 7 BN không liền xương có nồng độ và tổng số TBG trung mô được xác định qua nuôi cấy

CFU-F tương ứng là 634 ± 187 tế bào/cm³ và 19324 ± 6843 tế bào, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với 53 BN liền xương [7].

Ở nhóm BN hoại tử vô khuẩn CXĐ (nhóm II), khối TBG được tiêm vào vị trí hoại tử ở chỏm qua đường khoan giảm áp có số lượng tế bào CD34⁺ là $13,7 \pm 11,5 \times 10^6$, số lượng TBG trung mô là $48,6 \pm 31,0 \times 10^3$. Thời gian theo dõi sau ghép TBG trung bình là 23,8 tháng (từ 10-40 tháng). Đánh giá theo thang điểm Harris sau ghép TBG có 6 BN (12%) đạt kết quả khá, 6 BN (12%) đạt kết quả tốt và 29 BN (58%) đạt kết quả rất tốt. Còn lại 8 BN (16%) có kết quả trung bình, 1 BN (2%) có kết quả kém. Nhóm BN có kết quả điều trị từ khá trở lên nhận được khối TBG có tổng số lượng TBG trung mô cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm BN có kết quả điều trị trung bình và kém ($47,7 \pm 36,8 \times 10^3$ so với $32,2 \pm 19,2 \times 10^3$, $p < 0,05$). Còn thành phần TBG tạo máu của khối TBG thì tương tự nhau giữa hai nhóm. Với kết quả thu được có thể thấy, BN được ghép nhiều TBG trung mô hơn có kết quả điều trị tốt hơn. Hernigou và cộng sự đã thông báo kết quả nghiên cứu ở 116 BN với 189 khớp háng được điều trị bằng khoan giảm áp và tiêm TBG, những BN này được theo dõi trung bình là 7 năm (5-11 năm), kết quả cho thấy có 34/189 khớp háng (chiếm 18%) cần phải thay khớp háng nhân tạo. Các tác giả cũng nhận thấy, những BN phải thay khớp háng nhân tạo được ghép số lượng TBG trung mô ít hơn có ý nghĩa thống kê so với các BN còn lại [2].

Ở những BN kéo dài chi (nhóm III), thời gian liền xương trung bình cho 1 cm kéo dài ở nhóm BN có kết hợp ghép TBG với độ dài trung bình của ổ gãy dẫn 7,2 cm là $29,5 \pm 4,5$ ngày, ngắn hơn có ý nghĩa ($p < 0,001$) so với nhóm BN chỉ điều trị kéo dài chi bằng phương pháp căng dẫn theo nguyên lý Ilizarov đơn thuần với độ dài trung bình của ổ gãy dẫn là 5,9 cm. Kitoh và cộng sự (2006) [10] tiêm TBG trung mô lấy từ tủy xương tự thân sau khi nuôi cấy vào ổ gãy dẫn trong kéo dài chi đã đạt được thời gian liền xương trung bình là 28,6 ngày/cm kéo dài ở nhóm kéo dài chi nâng chiều cao với độ dài trung bình của ổ gãy dẫn là 8,3 cm. Như vậy, thời gian liền xương trung bình của nhóm kéo dài chi trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đương với kết quả nghiên cứu của Kitoh và cộng sự. Đỗ Tiến Dũng (2001) [11] tiến hành kéo dài chi nâng chiều cao cho 101 BN với những ổ gãy dẫn có độ dài trung bình 5,8 cm nhưng không tiêm TBG tủy xương, kết quả đạt được thời gian liền xương trung bình cho 1 cm kéo dài là 39 ngày. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã theo dõi đồng thời 40 BN kéo dài chi với 80 ổ gãy dẫn theo nguyên lý Ilizarov đơn thuần không ghép TBG, thời gian liền xương trung bình cho 1 cm kéo dài đạt được là $39,3 \pm 6,3$ ngày. Như vậy, với việc

tiêm bổ sung TBG tủy xương vào ổ gãy dần, thời gian liền xương cho 1 cm kéo dài đã giảm đi đáng kể (khoảng 25%). Kết quả này cho thấy, tiêm khối TBG tủy xương vào ổ gãy dần ngay sau khi hết giai đoạn gãy dần rất có hiệu quả vì thời gian liền xương được rút ngắn sẽ làm giảm thời gian nằm viện, giảm chi phí, BN được tập vận động sớm làm giảm biến chứng và nhanh chóng phục hồi chức năng vận động của hai chi dưới.

163/228 BN (chiếm tỷ lệ 71%) ở 3 nhóm được theo dõi với thời gian trung bình khoảng 5 năm sau ghép TBG, bao gồm 96 BN KG thân xương dài, 35 BN hoại tử vô khuẩn CXĐ (thuộc nhóm BN có kết quả điểm Harris sau ghép khá, tốt và rất tốt) và 32 BN kéo dài chi. Kết quả cho thấy, các BN đều có chức năng vận động chi, khớp tốt, không có biến chứng liên quan đến điều trị bằng TBG tủy xương tự thân. Đặc biệt là không có BN nào xuất hiện khối u tại nơi ghép TBG, điều mà các nhà nghiên cứu vẫn lo lắng. Có thể TBG tủy xương là loại TBG ở người trưởng thành nên khả năng tạo khối u thấp hoặc không có. Hơn nữa, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng TBG tủy xương tự thân nên cũng đảm bảo không có những biến chứng do không hòa hợp tổ chức gây nên. Kết quả theo dõi xa của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả của các tác giả khác [2, 7, 8, 12].

Tóm lại, ở cả 3 nhóm BN sử dụng TBG tủy xương tự thân ghép vào vị trí tổn thương đều cho thấy hiệu quả rõ rệt trong điều trị liền xương và phục hồi tổn thương, trong đó số lượng TBG trung mô được ghép tỷ lệ thuận với kết quả điều trị. Tuy nhiên, đây cũng chỉ là những kết quả bước đầu, cần tiếp tục mở rộng nghiên cứu với số lượng BN lớn hơn và có những phương pháp đánh giá tốt hơn để có thể minh chứng một cách chính xác vai trò của TBG tủy xương trong điều trị.

Kết luận

Qua nghiên cứu ứng dụng phương pháp điều trị ghép TBG tủy xương tự thân cho 228 BN có các tổn thương xương khớp khó hồi phục tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 và Bệnh viện Việt Đức từ tháng 2.2007 đến tháng 8.2012 và theo dõi đến tháng 1.2015 cho thấy:

- Ghép TBG tủy xương có hiệu quả rõ rệt và an toàn trong điều trị liền xương và phục hồi các tổn thương xương khớp:

- + Nhóm BN KG thân xương dài có tỷ lệ liền xương là 84,5% với thời gian liền xương là $19,8 \pm 9,5$ tuần.

- + Nhóm BN hoại tử vô khuẩn CXĐ: 82% BN có kết quả điều trị từ khá đến rất tốt theo thang điểm Harris.

- + Nhóm BN kéo dài chi có thời gian liền xương trung bình cho 1 cm kéo dài là $29,5 \pm 4,5$ ngày.

- + Theo dõi trong khoảng thời gian sau ghép 5 năm và đến tháng 1.2015 cho thấy, chức năng vận động tốt, không có biến chứng, không tạo khối u tại nơi ghép.

- Có mối liên quan thuận giữa số lượng TBG được ghép và kết quả điều trị:

- + Các BN KG liền xương và những BN hoại tử vô khuẩn CXĐ có kết quả điều trị từ khá đến rất tốt đã được ghép số lượng TBG trung mô cao hơn rõ rệt so với những BN KG không liền xương và những BN hoại tử vô khuẩn CXĐ có kết quả điều trị trung bình, kém.

- + Các BN kéo dài chi kết hợp với ghép TBG tủy xương có thời gian liền xương trung bình cho 1 cm kéo dài ngắn hơn đáng kể so với nhóm không sử dụng TBG tủy xương ($29,5 \pm 4,5$ ngày và $39,3 \pm 6,3$ ngày).

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Thị Thu Hà và cs (2011), “Nghiên cứu xây dựng quy trình sử dụng TBG tạo máu tự thân để điều trị các tổn thương cơ, khớp, xương khớp liên”, *đề tài độc lập cấp nhà nước, mã số ĐTĐL.2008 T/15*.
- [2] Hernigou P and Beaujean F (2002), “Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting”, *Clin Orthop Relat Res.*, **405**, pp.14-23.
- [3] Ippokratis P, Theodora G, George K, et al (2010), “Efficacy of minimally invasive techniques for enhancement of fracture healing: evidence today”, *International Orthopaedics (SICOT)*, **34**, pp.3-12, DOI 10.1007/s00264-009-0892-0.
- [4] ARCO (Association Research Circulation Osseous) (1992), “Committee on Terminology and Classification”, *ARCO News*, pp.41-46.
- [5] Sutherland D.R, Anderson L, Keeney M, et al (1996), “The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry”, *J Hematotherapy*, **5**, pp.213-236.
- [6] Emer C (2005), “Culture of Human and Mouse Mesenchymal Cells”, *Methods in Molecular Biology*, **Vol.290**: Basic Cell Culture Protocols, Third Edition, Edited by: C.D Helgason and C.L Miller © Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- [7] Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al (2005), “Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions. Influence of the Number and Concentration of Progenitor Cells”, *J Bone Joint Surg Am.*, **87**, pp.1430-1437.
- [8] Gangji V, Hauzeur J.P, Matos C, et al (2004), “Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head with Implantation of Autologous Bone-Marrow Cells. A Pilot Study”, *J Bone Joint Surg Am.*, **86**, pp.1153-1160.
- [9] Harris W.H (1969), “Traumatic arthritis of the hip after dislocation and acetabular fractures: treatment by mold arthroplasty. An end-result study using a new method of result evaluation”, *J Bone Joint Surg Am*, **51(4)**, pp.737-55.
- [10] Kitoh H, Kitokoji T, and Tsuchiya (2007), “Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones”, *Bone.*, **40**, pp.522-528.
- [11] Đỗ Tiến Dũng (2001), “Điều chỉnh sự chênh lệch độ dài hai chi dưới bằng phẫu thuật kéo dài chi theo nguyên lý của Ilizarov”, *Luận án tiến sĩ y học*, Học viện Quân y.
- [12] Astori G, Soncin S, Cicero V.L, et al (2010), “Bone marrow derived stem cells in regenerative medicine as Advance Therapy Medicinal Products”, *Am J Transpl Res*, **2(3)**, pp.285-295.

Phẫu thuật nội soi khâu sụn viền kết hợp tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo điều trị mất vững phía trước khớp vai

Nguyễn Tiến Bình^{1*}, Vũ Nhất Định²

¹Học viện Quân y

²Bệnh viện Quân y 103

Ngày nhận bài 8.5.2015, ngày chuyển phản biện 14.5.2015, ngày nhận phản biện 8.6.2015, ngày chấp nhận đăng 10.6.2015

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá kết quả phẫu thuật nội soi khâu sụn viền kết hợp tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo điều trị mất vững phía trước khớp vai. Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10.2013 đến tháng 12.2014, với 20 khớp vai (trên 20 bệnh nhân bị sai khớp vai trái diễn ra trước) được phẫu thuật nội soi khâu sụn viền kết hợp tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo. Vít chỉ neo ở vị trí 5-6 h và 4-5 h đối với vai phải hoặc 6-7 h và 7-8 h đối với vai trái. Mảnh xương ghép mào chậu được chốt ở vị trí 3 h hoặc 9 h ở bờ trước ổ chảo. Nhóm bệnh nhân có tuổi trung bình $26 \pm 1,35$ (17-43) tuổi, thời gian theo dõi trung bình là $11 \pm 0,35$ tháng. Kết quả nghiên cứu cho thấy: không gặp biến chứng tổn thương mạch máu, thần kinh; không gặp trường hợp khớp giả mảnh ghép - bờ trước ổ chảo; mảnh ghép xương liền tốt; 20/20 trường hợp đạt kết quả tốt và rất tốt. Qua nghiên cứu có thể kết luận: phẫu thuật nội soi khâu sụn viền kết hợp tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo là phương pháp điều trị tốt đối với mất vững phía trước khớp vai. Phẫu thuật nội soi có thể quan sát rõ và xác định chính xác vị trí tạo chốt xương, là can thiệp ít xâm lấn và có tính thẩm mỹ.

Từ khóa: mất vững phía trước khớp vai, phẫu thuật nội soi khâu sụn viền.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

Sai khớp vai tái diễn (recurrent dislocation of the shoulder) hay còn gọi là mất vững khớp vai (shoulder instability), sai khớp vai mạn tính (chronic shoulder dislocation) thường có nguyên nhân do tai nạn thể thao và thường gặp ở người trẻ tuổi (18-35 tuổi), nam gặp nhiều hơn nữ. Theo nhiều nghiên cứu, có tới 98% các trường hợp bị mất vững phía trước khớp vai. Cơ sinh học và nghiên cứu lâm sàng đã chỉ ra rằng, sai khớp hoặc bán sai khớp vai dẫn đến nhổ giật sụn viền bao khớp ở bờ trước ổ chảo (tổn thương Bankart).

Phẫu thuật làm vững khớp vai là lựa chọn hàng đầu đối với loại tổn thương này. Các kỹ thuật tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo sẽ ngăn chặn được chỏm xương cánh tay không vượt qua được chốt xương, nhờ vậy hạn chế được tình trạng sai khớp tái diễn, nhưng khớp thực sự vẫn mất vững, chỏm xương cánh tay vẫn hoạt động quá mức và hậu quả là để lại tình trạng thoái hóa khớp. Gần đây, phẫu thuật này được thực hiện qua nội soi, sử dụng chốt xương là mỏm quạ. Kỹ thuật nội soi khâu sụn viền đã được ứng dụng khá phổ biến trên thế giới, nhưng chưa được ứng dụng rộng rãi tại Việt Nam do kỹ thuật khó, mặc dù kỹ thuật này được đa số phẫu thuật viên

đón nhận bởi những ưu điểm của phẫu thuật ít xâm lấn mang lại nhưng lại có tỷ lệ sai khớp tái phát cao.

Với mong muốn phát huy các ưu điểm của cả 2 phương pháp trên, chúng tôi tiến hành thực hiện kết hợp khâu sụn viền và tạo chốt xương. Cả 2 kỹ thuật này đều được thực hiện qua nội soi. Nghiên cứu này đánh giá kết quả điều trị mất vững phía trước khớp vai bằng kỹ thuật trên.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: chúng tôi lựa chọn các bệnh nhân bị mất vững phía trước khớp vai ở tuổi trưởng thành, dưới 60 tuổi. Khớp vai không còn trong tình trạng sai khớp, không bị hạn chế vận động thụ động. Da vùng vai không bị tổn thương. Tổn thương giải phẫu bệnh bao gồm: tổn thương Bankart (sụn viền bao khớp bị nhổ khỏi bờ trước ổ chảo), có hoặc không có khuyết xương bờ trước ổ chảo, tổn thương Hill-Sachs, tổn thương SLAP. Không lựa chọn các trường hợp mất vững cả 2 khớp vai, mất vững đa hướng.

Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10.2013 đến tháng 12.2014 tại Bệnh viện Quân y 103. Bệnh nhân được lựa chọn nghiên cứu,

*Tác giả chính: Tel: 0982210954

ARTHROSCOPIC GLENOID LABRUM SUTURE COMBINED WITH BONE BLOCK IN THE ANTERIOR GLENOID RIM OF THE SCAPULAR FOR TREATING ANTERIOR INSTABILITY OF SHOULDER

Summary

The purpose of this study is to evaluate the results of this operation. This study was conducted between 10.2013 and 12.2014; 20 shoulders (20 patients with a recurrent anterior dislocation of the glenohumeral joint) had been operated with the arthroscopic glenoid labrum suture combined with bone block in the anterior glenoid rim of the scapular. The anchors spaced at the 5-6 o'clock and 4-5 o'clock positions (right shoulder) or 6-7 o'clock and 7-8 o'clock positions (left shoulder). The iliac crest bone graft was inserted at the 3 o'clock (right shoulder) or 9 o'clock (left shoulder) in the glenoid rim of the scapular. The mean age of the patients at the time of the operation was 26 ± 1.35 (17-43) years; and the average follow-up time was 11 ± 0.35 months. Postoperative complications were listed according to the clinical records which showed that, there were no wound, vascular, or neural complications, no cases of pseudarthrosis between the graft and the anterior glenoid. The bone transplant was well ossified. 20/20 of the patients classified the results as good or excellent. In conclusion, the arthroscopic glenoid labrum suture combined with bone block in the anterior glenoid rim of the scapular is a successful technique to treat anterior shoulder instability. The arthroscopic technique, in addition to being cosmetic and mini-invasive, also offers the unique advantage of providing adequate visualization of the glenohumeral joint and accurate placement of the bone block and screw.

Keywords: anterior instability of shoulder, arthroscopic glenoid labrum suture.

Classification number 3.2

thống kê thời điểm bị sai khớp lần đầu, nguyên nhân gây sai khớp, số lần sai khớp, lần sai khớp cuối cùng, thực hiện các test lâm sàng (Load-and-shift, Drawer, Sulcus). Thực hiện phẫu thuật nội soi khâu sụn viền bao khớp và tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo bằng mảnh ghép mào chậu tự thân:

- Vô cảm bằng tê đám rối thần kinh cánh tay.
- Bệnh nhân nằm nghiêng về bên đối diện, tay được kéo dạng khoảng 45° .
- Chuẩn bị mảnh ghép tạo chốt xương: rạch da dài 3 cm theo bờ trên mào chậu cùng bên, bóc lộ mào chậu, đục lấy mảnh xương mào chậu có kích thước $1 \times 1 \times 1$ cm. Khoan bắt vít rỗng lòng qua mảnh xương.

Nội soi khớp vai với 1 lối vào phía sau và 2 lối vào phía trước. Đánh giá tổn thương, dọn phần khớp thoái hóa, dùng dụng cụ mài xương bờ trước ổ chảo. Neo từng vít chỉ ở vị trí 4-5 h và 5-6 h đối với vai phải hoặc 6-7 h và 7-8 h đối với vai trái. Sau khi neo mỗi vít chỉ thì tiến hành khâu cố định sụn viền bao khớp.

Thay thế trocar trước dưới bằng trocar tự tạo có đường kính trong 10 mm. Qua dụng cụ định vị nằm trong trocar tự tạo, khoan lỗ bắt vít mảnh xương ghép ở vị trí 3 h ở bờ trước ổ chảo theo hướng từ trước ra sau hoặc 9 h đối với vai trái. Rút bỏ mũi khoan và thay thế bằng guide dẫn vít. Rút bỏ định vị trong lòng trocar tự tạo. Đưa mảnh ghép xương mào chậu đã chuẩn bị theo guide dẫn vít, đi trong lòng trocar tự tạo. Bắt vít cố định mảnh xương ghép vào bờ trước ổ chảo. Tiếp tục xử trí các tổn thương khác. Bơm rửa khớp, đóng các lối vào khớp, cố định chi ép sát thân người.

Đánh giá kết quả sớm: dựa vào tình trạng vết mổ lấy mảnh xương ghép, lối vào nội soi, chụp X-quang tư thế xuyên nách xác định vị trí và tiếp xúc của chốt xương với bờ trước ổ chảo.

Đánh giá kết quả xa: dựa vào tình trạng vết mổ, mức độ đau tại khớp vai, khả năng quay trở lại công việc cũ và môn thể thao cũ, biên độ vận động khớp vai, chụp X-quang xuyên nách, mức độ liền xương của chốt xương với bờ trước dưới ổ chảo.

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu: tất cả các bệnh nhân trong nghiên cứu này đều là nam giới, tuổi trung bình là $26 \pm 1,35$ (17-43) tuổi.

Vai bị sai khớp: 14 vai phải và 6 vai trái.

Cơ chế chấn thương: chơi thể thao (bóng chày, bóng rổ): 12 trường hợp; hoạt động quân sự (ném lựu đạn): 3 trường hợp; các nguyên nhân khác (ngã xe, sinh hoạt hàng ngày): 5 trường hợp.

Số lần sai khớp: ít nhất là 3 lần, nhiều nhất là 16 lần, trung bình là $9 \pm 1,3$ lần.

Thời gian từ lần sai khớp đầu tiên đến khi phẫu thuật: sớm nhất là 9 tháng, muộn nhất là 5 năm, trung bình là $13 \pm 1,15$ tháng.

Tổn thương Bankart đơn thuần: 14 trường hợp.

Tổn thương Bankart kết hợp với SLAP: 2 trường hợp.

Tổn thương Bankart kết hợp với Hill-Sachs: 3 trường hợp.

Tổn thương Bankart kết hợp với Hill-Sachs và SLAP: 1 trường hợp.

Phân độ tổn thương theo Altchek: tất cả 20 trường hợp đều có tổn thương độ 2+ (chỏm xương cánh tay vượt quá bờ ổ chảo gây bán sai khớp, mặc dù tự nắn chỉnh được).

Kết quả gần: vết mổ lấy xương mào chậu và các lõi vào khớp liền kỳ đầu, không có nhiễm khuẩn khớp, không có tụ máu khớp, không có tổn thương thần kinh cơ bì. Ở tư thế chụp xuyên nách trên phim X-quang quy ước: chốt xương đúng vị trí, áp sát xương bờ trước ổ chảo.

Kết quả xa: thời gian theo dõi trung bình sau phẫu thuật: $11 \pm 0,35$ tháng, bệnh nhân được mổ xa nhất là 24 tháng. Không có trường hợp nào bị sai khớp lại.

Biên độ vận động khớp vai: không hạn chế xoay ngoài (biên độ vận động xoay ngoài đạt trung bình $46,4 \pm 8,5^\circ$), không hạn chế dạng khớp vai.

Tình trạng thoái hóa khớp: chưa phát hiện thấy thoái hóa khớp sau phẫu thuật.

Không có trường hợp nào bị gãy xương mảnh ghép hoặc bị tuột vít cố định mảnh xương ghép.

Kết quả phẫu thuật:

- Rất tốt (16 trường hợp): vết mổ liền sẹo tốt, không viêm rỗ; khớp vai không đau; trở lại được công việc cũ và môn thể thao cũ (phong độ cũ đối với thể thao chuyên nghiệp); dạng vai và đưa ra trước trên 150° ; bệnh nhân hài lòng với kết quả điều trị; X-quang: mảnh xương ghép đúng vị trí, liền với xương bờ trước

dưới ổ chảo.

- Tốt (4 trường hợp): vết mổ liền sẹo tốt, không viêm rỗ; khớp vai đau ít, không thường xuyên; trở lại được công việc cũ nhưng hạn chế trong thể thao; dạng vai và đưa ra trước $120-150^\circ$; bệnh nhân hài lòng với kết quả điều trị; X-quang: mảnh xương liền với bờ trước ổ chảo nhưng bị lệch vị trí.

- Không có kết quả nào ở mức độ trung bình và kém (mức độ trung bình: vết mổ liền sẹo tốt, không viêm rỗ, vẫn còn đau nhiều tại khớp vai, phải dùng thuốc giảm đau thường xuyên, trở lại được công việc cũ nhưng không chơi được thể thao, dạng vai và đưa ra trước $90-120^\circ$, tuy nhiên bệnh nhân vẫn hài lòng với kết quả điều trị, kết quả X-quang: mảnh xương ghép không liền với bờ trước dưới ổ chảo; mức độ kém: viêm rỗ vết mổ, đau thường xuyên tại khớp vai, phải dùng thuốc giảm đau thường xuyên, không trở lại được công việc và thể thao, dạng vai và đưa ra trước $<90^\circ$, bệnh nhân không hài lòng với kết quả điều trị, kết quả X-quang: mảnh xương ghép bị tiêu).

Bàn luận

Chỉ định phẫu thuật: mất vững phía trước khớp vai ở người trẻ tuổi phần lớn cần điều trị phẫu thuật.

Nhóm phẫu thuật tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo như phẫu thuật Eden-Hybbinette (chốt xương mào chậu), phẫu thuật Latarjet (chốt xương mỏm quạ) và gần đây là chốt xương qua nội soi (mỏm quạ) nhằm làm cao bờ trước ổ chảo, không cho chỏm xương cánh tay bán sai khớp hoặc sai khớp ra trước. Kỹ thuật này được chỉ định không căn cứ vào tình trạng có khuyết xương hay không khuyết xương ở bờ trước ổ chảo. Tuy nhiên, kỹ thuật này càng phát huy ưu điểm trong các trường hợp có khuyết xương bờ trước ổ chảo. Kỹ thuật này không chế được tình trạng sai khớp nhưng thực chất khớp vai vẫn mất vững. Do sụn viền phía trước bị rách, rời khỏi bờ trước ổ chảo nên chỏm xương cánh tay vẫn di chuyển rộng rãi nhưng không vượt qua được chốt xương ở bờ trước ổ chảo; tuy không tái sai khớp nhưng hậu quả lâu dài của sự dịch chuyển quá lớn của chỏm xương cánh tay sẽ dẫn đến khuyết xương chỏm (tổn thương Hill-Sachs), thoái hóa khớp.

Nhóm phẫu thuật khâu sụn viền bao khớp (phẫu thuật Bankart) đã phục hồi lại sinh lý bình thường của khớp vai, tuy nhiên hay bị mất vững trở lại do sụn viền bao khớp bị rách (không liền vào bờ trước ổ chảo).

Phẫu thuật kết hợp giữa tạo chốt xương và khâu sụn

viên bao khớp là ý tưởng vừa phục hồi lại độ vững sinh lý của khớp vai nhờ kỹ thuật khâu sụn viên bao khớp và hạn chế tái sai khớp nhờ chốt xương ở bờ trước ổ chảo. 2 kỹ thuật này hỗ trợ lẫn nhau, tăng tác dụng của nhau, tạo nên sự hoàn hảo của kỹ thuật. Hơn nữa, các kỹ thuật này lại được thực hiện qua nội soi càng làm tăng giá trị của kỹ thuật.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ định cho các trường hợp bị mất vững phía trước khớp vai ở người trưởng thành dưới 60 tuổi, có tổn thương Bankart có hoặc không có các tổn thương Hill-Sachs, SLAP; có hoặc không có khuyết xương bờ trước ổ chảo; đặc biệt là các trường hợp hoạt động biên độ tay vượt quá đầu.

Goga E (2003) [1] đã tiến hành phẫu thuật chốt xương cho trường hợp cao tuổi nhất là 83 tuổi. John W.S và cộng sự (2005) [2] đã phẫu thuật khâu sụn viên bao khớp cho trường hợp cao tuổi nhất là 64 tuổi, thậm chí Amirmohammad N (2010) [3] đã phẫu thuật cho trường hợp 75 tuổi. Ở các nước phát triển, tuổi thọ cao, người già vẫn tham gia tích cực các hoạt động xã hội và thể thao, điều kiện kinh tế và an sinh xã hội tốt nên chỉ định phẫu thuật khá rộng rãi.

Trong nhiều nghiên cứu, thời điểm phẫu thuật được lựa chọn phải trên 6 tháng sau lần sai khớp đầu tiên. Trong nghiên cứu này, thời điểm phẫu thuật được tính từ lần sai khớp đầu tiên đến khi phẫu thuật trung bình là $13 \pm 1,15$ tháng (9 tháng - 5 năm). Tuổi trung bình là $26 \pm 1,43$ tuổi (17-43 tuổi). Phần lớn các bệnh nhân bị sai khớp lần đầu là do chơi thể thao (bóng chuyền, bóng rổ: 12 trường hợp) hoặc hoạt động quân sự (đưa tay quá đầu ném lựu đạn: 3 trường hợp), còn lại do nguyên nhân khác. Khớp vai phải chiếm chủ yếu: 14 trường hợp, khớp vai trái 6 trường hợp. Có lẽ tay phải là tay thuận nên phần lớn các hoạt động như đập bóng, ném đều sử dụng tay này. Bệnh nhân có số lần sai khớp ít nhất là 3 lần và nhiều nhất là 16 lần. Số lần sai khớp trung bình là $9 \pm 1,3$ lần.

Tổn thương Bankart gặp ở tất cả các trường hợp. Ngoài ra, có 2 trường hợp có tổn thương SLAP, 2 trường hợp có tổn thương Hill-Sachs và 1 trường hợp có cả tổn thương Hill-Sachs và tổn thương SLAP.

Kỹ thuật: kỹ thuật tạo chốt xương được thực hiện từ rất lâu, lúc đầu bằng mảnh ghép xương chày sau đó là mảnh ghép xương mào chậu.

Để tạo thuận lợi cho mảnh ghép xương mào chậu liền với bờ trước ổ chảo, Alvik đã soi rãnh ở bờ trước ổ chảo và ghép xương mào chậu ở vị trí soi rãnh,

nhưng không dùng vít cố định. Rãnh soi dài 12 mm và rộng 5 mm, cách bờ trước ổ chảo 5 mm. Mảnh xương ghép được lấy từ mào xương chậu có kích thước $20 \times 12 \times 5$ mm và nhồi vào rãnh đã được soi ở phía trước của bờ ổ chảo [4].

Auffarth A (2011) giới thiệu kỹ thuật tạo chốt xương bờ trước ổ chảo bằng mảnh ghép xương hình “J”, không sử dụng vít cố định [5]. Mảnh ghép có kích thước $15-18 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$.

Phẫu thuật sử dụng mỏm quạ làm chốt xương ở bờ trước ổ chảo được sử dụng nhiều hơn trong những năm gần đây. Mỏm quạ được đặt nằm theo chiều dài của mảnh ghép ở cổ ổ chảo và được cố định bằng 2 vít. Với kỹ thuật này, mảnh xương ghép mỏm quạ tăng diện tiếp xúc với xương bờ ổ chảo, mảnh xương được cố định bằng 2 vít nên có khả năng chống xoay mảnh xương ghép.

Các kỹ thuật trên được thực hiện qua mổ mở và không kết hợp với xử trí tổn thương ở sụn viên bao khớp. Gần đây, kỹ thuật tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo bằng mỏm quạ đã được thực hiện qua nội soi. Tuy nhiên, kỹ thuật này rất phức tạp và đòi hỏi phải có dụng cụ chuyên dụng theo kỹ thuật.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo bằng mảnh ghép xương mào chậu nhưng phẫu thuật được thực hiện qua nội soi. Mảnh xương ghép cũng được chuẩn bị khác với các kỹ thuật đã được mô tả. Thay vì lấy mảnh ghép dài theo mào chậu và đặt mảnh ghép dài theo bờ trước ổ chảo thì trong kỹ thuật này, chúng tôi lấy mảnh ghép xương mào chậu có đường kính 10 mm và dài 15 mm. Đây thực sự là chốt xương chứ không phải là tạo viên xương cao ở bờ trước ổ chảo. Phần còn lại của bờ trước ổ chảo, chúng tôi thực hiện khâu sụn viên bao khớp. Với kích thước mảnh ghép như vậy sẽ dễ dàng hơn để đưa qua ống trocar tự tạo vào cổ định ở bờ trước ổ chảo qua nội soi.

Ống trocar tự tạo được làm bằng thép không gỉ, có đường kính trong là 10 mm (chứa đủ mảnh xương ghép), đường kính ngoài là 14 mm. Trong lòng ống trocar có lõi đầu nhọn với đường kính ngoài là 10 mm vừa khít với lòng trocar. Lõi này cũng bằng kim loại không gỉ, lõi trocar giúp đưa trocar qua phần mềm vào khớp vai dễ dàng hơn. Tâm của lõi trocar có lỗ theo suốt chiều dài với đường kính 3 mm để có thể đưa mũi khoan 3 mm qua lõi trocar khoan bắt vít cố định chốt xương. Nhờ các dụng cụ này, việc đưa chốt

xương vào trong khớp vai và khoan bắt chốt không quá khó khăn. Tuy nhiên, do hạn chế về kích thước của ống trocar nên chốt xương cũng không thể có kích thước lớn hơn.

Để thuận lợi cho mảnh ghép tiếp xúc tốt với xương bờ trước ổ chảo, chúng tôi tiến hành khoan tạo hố nông chứa mảnh ghép (sâu 2-3 mm), sau khi đưa mảnh ghép vào hố nông chứa mảnh ghép đã chuẩn bị trước thì tiến hành bắt vít cố định, có sử dụng long đen để tạo sức ép giữa mảnh ghép và xương bờ trước ổ chảo.

Để bảo đảm khớp ôm sát chỏm xương cánh tay tạo lực ôm sinh lý, không cho chỏm xương cánh tay chuyển dịch, chúng tôi tiến hành khâu cố định sụn viền bao khớp bằng vít chỉ neo. Kỹ thuật được thực hiện qua nội soi như đã được mô tả trong các trường hợp phẫu thuật nội soi trong các báo cáo. Tuy nhiên, thay vì khâu 3 mỗi chỉ neo thì chúng tôi chỉ khâu 2 mỗi chỉ neo. Thay vì 3 mỗi chỉ neo được cố định trong khoảng 3-6 h đối với vai phải và 6-9 h đối với vai trái thì chúng tôi neo mỗi chỉ thứ nhất ở vị trí 5-6 h đối với vai phải và 6-7 h đối với vai trái, vít neo thứ 2 được neo ở vị trí 4-5 h đối với vai phải và 7-8 h đối với vai trái, chốt xương được ghép ở vị trí 2-3 h đối với vai phải và 9-10 h đối với vai trái. Vị trí chốt xương trong nghiên cứu này chính là vị trí neo của vít thứ 3 trong kỹ thuật khâu sụn viền bao khớp đơn thuần đã được các nghiên cứu mô tả.

Vị trí chốt xương của nghiên cứu này khác với các kỹ thuật chỉ thực hiện tạo chốt xương đơn thuần. Ở các kỹ thuật tạo chốt xương đơn thuần qua nội soi hay mổ mở đều ghép mảnh xương làm cao bờ ổ chảo trong khoảng 3-6 h đối với vai phải và 6-9 h đối với vai trái. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghép xương dạng “điểm” tạo chốt xương thay thế cho vị trí neo thứ 3 trong kỹ thuật khâu sụn viền bao khớp. Như vậy, mảnh xương ghép sẽ nhỏ hơn, tạo chốt xương nhưng không thấp hơn các mảnh xương ghép làm cao bờ trước ổ chảo trong kỹ thuật ghép xương đơn thuần. Với kỹ thuật như vậy, chúng tôi vừa khâu sụn viền bao khớp tạo độ vững sinh lý, vừa tạo chốt xương đảm bảo độ vững chắc.

Sự phối hợp giữa 2 kỹ thuật: khâu sụn viền bao khớp và chốt xương ở bờ trước ổ chảo đã giúp cho các bệnh nhân trong nghiên cứu này tập vận động khớp vai sớm hơn, sau thời gian bất động sau phẫu thuật 7-10 ngày. Sau 2 ngày sau phẫu thuật, bệnh nhân đã có thể dạng vai để chụp X-quang xuyên nách. Nhờ vậy, sẽ góp phần tạo điều kiện thuận lợi cho tập vận động phục

hồi chức năng.

Kết quả phẫu thuật: đánh giá hiệu quả của một phương pháp phẫu thuật điều trị mất vững khớp vai chủ yếu dựa vào tỷ lệ sai khớp lại, mức độ thoái hóa khớp và phục hồi biên độ vận động của khớp vai.

Thời gian theo dõi càng xa thì càng có giá trị, nhiều trường hợp kết quả trong những năm đầu thì tốt nhưng càng về sau thì kết quả càng kém dần, như tái phát sai khớp, thoái hóa khớp.

Nhóm phẫu thuật khâu sụn viền, bao khớp (phẫu thuật nội soi) thường có tỷ lệ tái phát sai khớp cao nhất. Tỷ lệ sai khớp lại càng cao ở nhóm các trường hợp tham gia thể thao. Nhiều nghiên cứu cho thấy tỷ lệ sai khớp lại liên quan đến thể thao từ 35-70%.

Theo Jens E.V, Claus H.J (1989) [6] giai đoạn 1971-1984, có 31 trường hợp được phẫu thuật, tỷ lệ sai khớp lại là 13%. Gartsman và cộng sự [7] đã đánh giá 53 trường hợp bị sai khớp vai tái diễn được phẫu thuật nội soi khâu sụn viền với thời gian theo dõi gần 3 năm cho thấy, có 8% bị sai khớp trở lại. Năm 2011, Gerard W.W.E, Seddek M, Andrew H.C.T [8] đã đánh giá kết quả phẫu thuật Bankart bằng nội soi cho 79 khớp vai ở 74 bệnh nhân với thời gian theo dõi trên 2 năm, kết quả có 7,6% bị sai khớp hoặc bán sai khớp trở lại. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sai khớp tái phát phần lớn là do lỗi người bệnh sớm quay trở lại thể thao. Thời điểm sai khớp lại có thể xảy ra sau phẫu thuật 5-6 tháng [9]. Phẫu thuật tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo ít gặp sai khớp tái phát hơn nhưng lại gặp tỷ lệ cao bị thoái hóa khớp, hoặc thời điểm bị thoái hóa khớp sớm hơn phương pháp khâu sụn viền.

Nghiên cứu của Rahme và cộng sự [10] ở 77 trường hợp với thời gian theo dõi trung bình 29 năm (22-37 năm) cho thấy, có 47% bị thoái hóa khớp. Hovelius và cộng sự [11] báo cáo kết quả xa ở 118 trường hợp được phẫu thuật tạo chốt xương trong giai đoạn 1980-2001 với thời gian theo dõi trung bình 15 năm, có 40% trường hợp bị thoái hóa khớp. Báo cáo của Allain J và cộng sự (1996) [12], 95 trường hợp bị mất vững phía trước khớp vai được phẫu thuật tạo chốt xương đơn thuần được theo dõi trong 10-23 năm có 62% bị thoái hóa khớp với các mức độ khác nhau.

Trong nghiên cứu này, số lượng bệnh nhân chưa nhiều, thời gian theo dõi đánh giá chưa dài nên chúng tôi chưa gặp trường hợp nào bị thoái hóa khớp sau phẫu thuật. Nghiên cứu này mới chỉ tập trung chủ yếu

để hoàn thiện kỹ thuật với ý tưởng ban đầu để có thể ứng dụng vào trong lâm sàng.

Biên độ vận động phục hồi sau mổ cũng là vấn đề quan trọng để đánh giá kết quả phẫu thuật. Các bệnh nhân trong nghiên cứu này bị hạn chế vận động khớp vai những ngày đầu sau phẫu thuật. Biên độ vận động được cải thiện theo thời gian sau phẫu thuật. Ở thời điểm 10-12 tuần sau phẫu thuật, các bệnh nhân đã hồi phục biên độ vận động cả thụ động và chủ động. Tuy nhiên, thời điểm này bệnh nhân vẫn chưa được thực hiện các động tác đưa tay quá đầu (trừ khi tập). Các bệnh nhân chỉ được tham gia trở lại các hoạt động bình thường và chơi thể thao sau 6 tháng phẫu thuật.

Các nghiên cứu phần lớn gặp hạn chế động tác xoay ngoài của khớp vai do hạn chế tập động tác này sau phẫu thuật để hạn chế nguy cơ sai khớp lại sớm sau phẫu thuật.

Tai biến và biến chứng: tổn thương thần kinh đã được nhắc đến trong nhiều nghiên cứu khi tiến hành phẫu thuật tạo chốt xương ở bờ trước ổ chảo. Phần lớn tổn thương này được thông báo là được phát hiện ngay sau khi phẫu thuật. Các dây thần kinh có thể bị tổn thương là thần kinh giữa, thần kinh cơ bì và thần kinh trụ, ngoài ra tổn thương thần kinh trên gai cũng được thông báo.

Hai lỗi vào phía trước luôn có nguy cơ tổn thương thần kinh từ đám rối thần kinh cánh tay đi xuống và tĩnh mạch đầu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, không có trường hợp nào gặp các biến chứng này và không có trường hợp nào bị nhiễm khuẩn, máu tụ trong khớp, mặc dù chúng tôi không đặt dẫn lưu khớp sau mổ.

Kết luận

Đây là kỹ thuật rất khả quan, 16 trường hợp đạt kết quả rất tốt, 4 trường hợp đạt kết quả tốt, không có trường hợp nào bị sai khớp tái diễn, chưa có thoái hóa khớp sau phẫu thuật, không có trường hợp nào bị hạn chế dạng hoặc xoay ngoài.

Kỹ thuật đơn giản hơn kỹ thuật sử dụng mảnh ghép là mỡ quạ, tất cả các can thiệp đều thực hiện qua nội soi, thực hiện được cả khâu sụn viền bao khớp và tạo chốt xương nên vừa đạt được mục đích hạn chế sai khớp tái diễn, vừa trả lại độ vững sinh lý của khớp.

Chưa gặp trường hợp nào có tai biến tổn thương thần kinh và tĩnh mạch đầu.

Tài liệu tham khảo

- [1] Goga E (2003), "Chronic shoulder dislocations", *J Shoulder Elbow Surg*, **12**(5), pp.446-450.
- [2] John W.S, Scott F.M.D, Michael E.T, Shawn W.O'D, Robert H.C, Rochester M.N (2005), "Bankart repair in patients aged fifty years or greater: Results of arthroscopic and open repairs", *J Shoulder Elbow Surg*, **14**(2), pp.111-113.
- [3] Alireza R, Amirmohammad N (2010), "Treatment of chronic anterior shoulder dislocation by open reduction and simultaneous Bankart lesion repair", *Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy & Technology*, **2**, pp.15.
- [4] Alvik I (1951), "Tre tilfelle av habituelle skulderledds luksasjoner operert a.m Hybbinette (In Norwegian)", *Nord Med*, pp.45-96.
- [5] Auffarth A, Kralinger F, Resch H (2011), "Anatomical glenoid reconstruction via a J-bone graft for recurrent posttraumatic anterior shoulder dislocation", *Oper Orthop Traumatol Journal*, **23**(5), pp.453-461.
- [6] Jens E.V, Claus H.J (1989), "Recurrent anterior dislocation of the shoulder. A comparison of the results after the Bankert and the Putti-Platt procedures", *Orthop*, **12**(3), pp.453-455.
- [7] Gartsman G.M et al (1997), "Massive, irreparable tears of the rotator cuff. Results of operative debridement and subacromial decompression", *J Bone Joint Surg Am.*, **79**, pp.715-721.
- [8] Gerard W.W.E, Sedeek M, Andrew H.C.T (2011), "Long term results of arthroscopic bankart repair for traumatic anterior shoulder instability", *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, **6**, pp.28.
- [9] En Rung Chiang, Jung Pan Wang, Shih Tien Wang, Shih Chieh Hung, Hsiao Li Ma, Chien Lin Liu, Tain Hsiung Chen (2010), "Arthroscopic posteroinferior capsular plication and rotator interval closure after Bankart repair in patients with traumatic anterior glenohumeral instability A minimum follow up of 5 year", *Injury, Int. J. Care Injured*, **41**, pp.1075-1078.
- [10] Rahme H, Wikblad L, Nowak J, Larsson S (2003), "Long term clinical and radiologic results after Eden-Hybbinette operation for anterior instability of the shoulder", *J Shoulder Elbow Surg*, **12**, pp.15-9.
- [11] Lennart Hovelius, Björn Sandström, Modolv Saebo (2006), "One hundred eighteen Bristow - Latarjet repairs for recurrent anterior dislocation of the shoulder prospectively followed for fifteen years: Study II - the evolution of dislocation arthropathy", *J Shoulder Elbow Surg*, **15**(3), pp.279-289.
- [12] Alliaín J, Goutallier D, Glorion Ch (1996), "Long term radiological results of Latarjet procedure for anterior instability of the shoulder", *J Shoulder Elbow Surg*.

Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả bước đầu điều trị chít hẹp khí quản bằng nội soi can thiệp

Đỗ Quyết*, Mai Xuân Khẩn, Tống Đức Hiếu, Nguyễn Xuân Khải

Bệnh viện Quân y 103

Ngày nhận bài 13.4.2015, ngày chuyển phản biện 15.4.2015, ngày nhận phản biện 4.5.2015, ngày chấp nhận đăng 8.5.2015

Qua nghiên cứu 30 bệnh nhân (BN) chít hẹp khí quản (CHKQ) sau đặt nội khí quản (NKQ)/mở khí quản (MKQ) và thực hiện nội soi can thiệp cho 10 BN, tại Bệnh viện Quân y 103 trong thời gian 2012-2014, cho thấy: sau khi được điều trị CHKQ bằng nội soi can thiệp, các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng có sự thay đổi rõ rệt theo hướng tích cực. Kỹ thuật ít tai biến và biến chứng.

Từ khóa: bệnh nhân, chít hẹp khí quản, nội soi can thiệp.

Chỉ số phân loại 3.2

INVESTIGATING THE CLINICAL, SUBCLINICAL FEATURES AND THE INITIAL RESULTS ON TREATMENT IN TRACHEAL STENOSIS PATIENTS BY PERFORMING ENDOSCOPIC INTERVENTIONS

Summary

By studying on 30 patients with tracheal stenosis after tracheal intubation/surgical tracheostomy and performing endoscopic interventions for 10 patients at the 103 Military Hospital during 2012-2014, the results showed that: after being treated tracheal stenosis by endoscopic interventions, the clinical and subclinical symptoms changed significantly in a positive direction. The technique almost have no catastrophic complications.

Keywords: endoscopic interventions, patient, tracheal stenosis.

Classification number 3.2

Đặt vấn đề

CHKQ là hậu quả của nhiều nguyên nhân khác nhau và có rất nhiều vấn đề phức tạp được đặt ra trong điều trị đòi hỏi phải giải quyết. Năm 1965, McDonald và Stocks là những người đầu tiên đề xuất việc sử dụng ống NKQ có bóng trong hồi sức cấp cứu làm cho tỷ lệ CHKQ trở nên trầm trọng hơn. Việc điều trị CHKQ vẫn là vấn đề nan giải và cực kỳ khó khăn ở tất cả các quốc gia. Nghiên cứu về CHKQ sau đặt NKQ/MKQ đang là đòi hỏi và thách thức với các bác sỹ lâm sàng chuyên ngành tai mũi họng, hô hấp, hồi sức cấp cứu. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này nhằm mục tiêu: 1. Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng CHKQ sau đặt NKQ/MKQ; 2. Đánh giá kết quả bước đầu điều trị CHKQ sau đặt NKQ/MKQ bằng nội soi phế quản can thiệp.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

30 BN được chẩn đoán CHKQ, điều trị tại Khoa Lao - Bệnh phổi và Khoa Hồi sức cấp cứu, Bệnh viện Quân y 103 từ năm 2012 đến năm 2014, trong đó có 10 BN được điều trị CHKQ bằng nong kết hợp với cắt đốt bằng laser, đặt stent.

Việc chẩn đoán CHKQ dựa vào: BN có tiền sử đặt NKQ/MKQ; có các triệu chứng: ho, khó thở, tiếng rít vùng KQ lan rộng ra xung quanh theo đường dẫn khí; X quang hoặc chụp cắt lớp vi tính lồng ngực có hình ảnh hẹp thanh KQ; soi phế quản có hình ảnh CHKQ.

Tiêu chuẩn chọn BN: BN được chẩn đoán CHKQ sau đặt NKQ, MKQ; không có chống chỉ định nội soi phế quản.

Tiêu chuẩn loại trừ: các BN chít hẹp đường thở trên do u trong lòng KQ; BN CHKQ do lao KQ; BN liệt dây thanh âm;

* Tác giả chính: Tel: 0983301839

hẹp KQ chèn ép từ ngoài vào; hẹp KQ do bóng hô hấp; BN có bệnh kết hợp chưa ổn định; BN không đồng ý tham gia nghiên cứu.

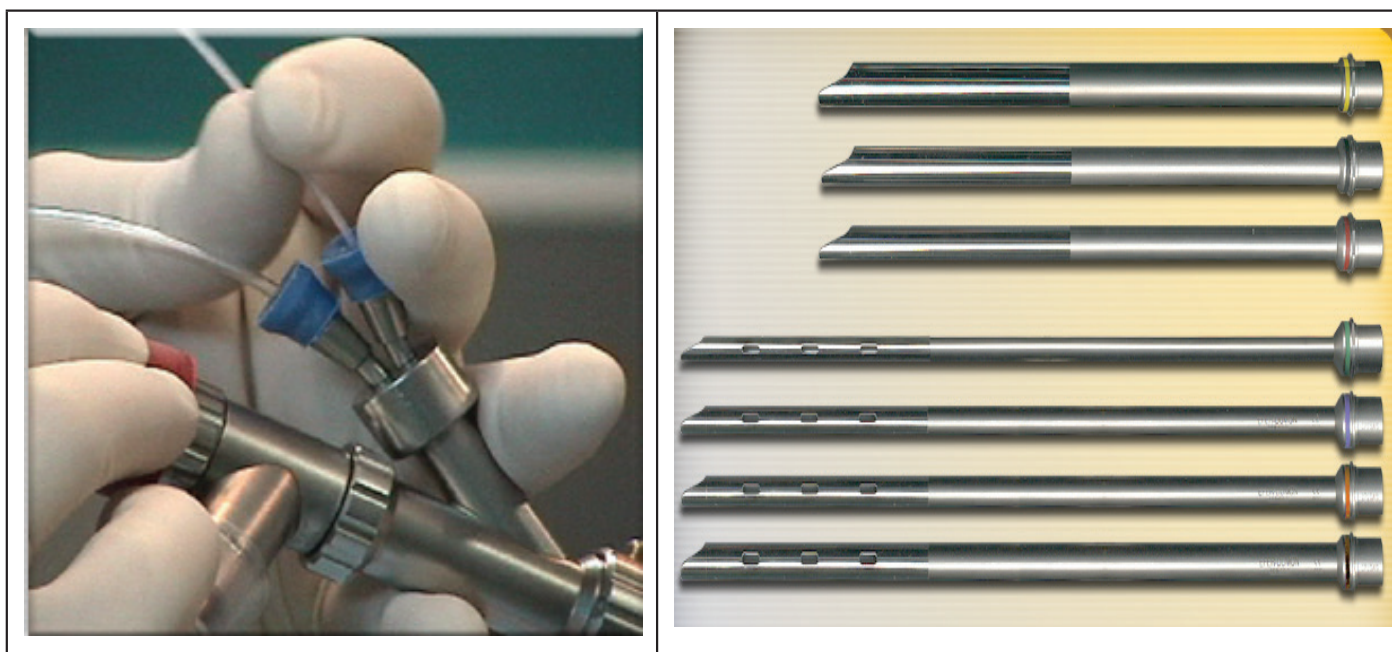
Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Lâm sàng: BN vào viện được thăm khám lâm sàng, làm các xét nghiệm cận lâm sàng và được đăng ký vào mẫu bệnh án nghiên cứu. Các BN được đánh giá các

Nội soi phế quản can thiệp: 10 BN được nội soi can thiệp, điều trị CHKQ bằng nong, cắt đốt, đặt stent KQ.

Quy trình nội soi can thiệp điều trị CHKQ:

- Các trang thiết bị và máy móc: hệ thống soi phế quản ống mềm của Hãng Olympus; hệ thống soi phế quản ống cứng của Dumon; các loại stent kim loại, stent silicon Dumon; ống NKQ, Sjoberg.



Hình 1: hệ thống ống soi phế quản cứng của Dumon (Pháp)

triệu chứng lâm sàng, nhất là triệu chứng khó thở, khàn tiếng, tiếng thở rít (Stridor) và tìm hiểu các yếu tố nguy cơ, nguyên nhân gây nên CHKQ.

Cận lâm sàng: chụp X quang phổi chuẩn và chụp cắt lớp vi tính lồng ngực: tất cả 30 BN được chụp X quang phổi chuẩn thẳng nghiêng, CT lồng ngực và nội soi phế quản ảo để xác định: vị trí, độ dài và mức độ hẹp KQ; đo đường kính thẳng nghiêng của dải sáng KQ; đo chiều dài đoạn hẹp khi soi phế quản; dựng hình 3D; xác định đặc điểm của từng loại hẹp KQ (dạng màng, dạng phức tạp...) trên phim X quang và CT; tìm mối liên quan của vị trí hẹp với đặt NKQ, MKQ; dựng hình ảnh nội soi khí phế quản ảo và phân tích đặc điểm hình ảnh nội soi ảo. Nội soi phế quản ống mềm, xác định: vị trí hẹp thanh môn, hạ thanh môn, KQ, hẹp nhiều vị trí - đường kính chỗ hẹp nhất - chiều dài đoạn hẹp - phân loại mức độ hẹp KQ - đặc điểm chít hẹp (chít hẹp dạng giả khe thanh môn - hẹp KQ dạng màng - CHKQ phức tạp).

- BN được khám lâm sàng, làm các xét nghiệm: chụp X quang lồng ngực, điện tim, xét nghiệm công thức máu, sinh hóa máu, chức năng đông máu, thử phản ứng với thuốc tê. Chụp cắt lớp vi tính lồng ngực, nội soi ảo, đo thông khí phổi.

- Gây mê toàn thân: trong nội soi can thiệp cần kết hợp với Khoa Gây mê - Hồi sức để gây mê toàn thân, trong gây mê phối hợp với các thuốc dẫn cơ để dễ thực hiện quá trình đặt stent.

- Nội soi phế quản ống mềm: nội soi phế quản ống mềm chủ yếu để chẩn đoán, tuy nhiên có thể nong KQ bằng bóng.

- Nội soi khí phế quản ống cứng.

- Các thủ thuật trong CHKQ:

+ Nong bằng bóng: luồn dây dẫn đường (Guide wire) qua kênh hoạt động của ống soi; luồn bóng nong theo dây dẫn; bơm căng bóng nong bằng nước muối

sinh lý, bơm bằng bơm tiêm áp lực, nên chọn bóng bơm có đường kính vượt 2-3 mm so với đường kính mong muốn đạt được. Thời gian giữ bóng ở trạng thái bơm căng để nong KQ từ 15-150 giây.

+ Nong bằng ống soi cứng: trong trường hợp CHKQ dạng màng không đặt stent: sau khi đã xác định CHKQ dạng màng bằng soi phế quản ống mềm, điều trị CHKQ dạng màng có thể được tiến hành bằng ống soi phế quản cứng theo phương pháp của Mehta, AC (1993): dùng ống soi đường kính 10,5 mm nong nhẹ nhàng phần chít hẹp.

+ Điều trị laser: qua ống soi phế quản cứng, dùng đầu đốt laser Neodymium yttrium aluminium garnet (Nd-YAG) có bước sóng 1064, cắt ở các điểm 3 và 9 giờ.

+ Kỹ thuật đặt giá đỡ khí - phế quản: chúng tôi sử dụng stent bằng silicon: đường kính từ 8-18 mm, dài 20-80 mm; dạng hình trụ như Dumon, Orłowski, Montgomery, Hood, Tygon. Kỹ thuật: xác định chính xác vị trí, mức độ hẹp dựa vào chụp cắt lớp vi tính, soi phế quản; lựa chọn stent căn cứ vào chiều dài tổn thương (stent phải bao phủ tổn thương ít nhất hơn 1 cm mỗi chiều), đường kính khí - phế quản hẹp (để cố định tốt stent); dạng stent: stent bằng silicon thường dùng cho tắc nghẽn phế quản gốc hoặc KQ do chèn ép từ ngoài; stent dạng bao phủ thường dùng cho tổn thương ác tính vì có tác dụng ngăn phát triển vào trong lòng phế quản; stent mở tự động thích hợp cho tổn thương gây xoắn vặn, lệch trục phế quản. Gây mê toàn thân, tiến hành đặt stent qua soi phế quản ống cứng, gây mê toàn thân.

Kết quả và bàn luận

Đặc điểm lâm sàng CHKQ

Về tuổi: trong nghiên cứu của chúng tôi, CHKQ gặp ở độ tuổi nhỏ nhất là 14 tuổi và cao nhất là 79 tuổi, tuổi trung bình là 37,4 tuổi. Lứa tuổi bị CHKQ gặp nhiều nhất là từ 14 đến 30 tuổi có 16 BN, chiếm 53% (bảng 1). Còn theo tác giả Abbasidezfouli.A (2007) [1] nghiên cứu trên 26 BN CHKQ cho thấy bệnh gặp ở mọi lứa tuổi từ 4-64, tuổi trung bình là 23,9.

Về giới: kết quả của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ CHKQ ở nam gặp 80%, nữ 20% (bảng 1). Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Thắm (2010) [2], tuổi trung bình nhóm nghiên cứu 34,4 tuổi (16-75 tuổi), tỷ lệ nam gặp 2,5 lần nữ.

Bảng 1: phân bố về tuổi, giới

Giới Tuổi	Nam		Nữ		Tổng	
	N	%	N	%	N	%
14-30	16	100,0	0	0,0	16	53,34
31-45	3	75,0	1	25,0	4	13,33
46-60	2	50,0	2	50,0	4	13,33
60-79	3	50,0	3	50,0	6	20,0
Tổng	24	80,0	6	20,0	30	100,0

Nguyên nhân đặt NKQ hoặc MKQ: phần lớn nguyên nhân dẫn đến đặt NKQ hoặc MKQ là do chấn thương sọ não (60,0%), còn lại là các nguyên nhân khác như: đột quỵ não, bệnh lý hô hấp, bệnh tim mạch, nhược cơ chiếm từ 7,0-16,0% (bảng 2).

Bảng 2: nguyên nhân đặt NKQ hoặc MKQ

Nguyên nhân	N	Tỷ lệ (%)
Chấn thương sọ não	18	60,0
Bệnh hô hấp	3	10,0
Đột quỵ não	5	16,0
Bệnh tim mạch	2	7,0
Nhược cơ	2	7,0
Tổng số	30	100

Theo Abbasidezfouli A (2007) [1]: nguyên nhân dẫn đến đặt NKQ phần lớn là chấn thương sọ não (21 BN, 80,8%), tự tử 2 BN (7,7%), phẫu thuật 2 BN (7,7%), đột quỵ não 1 trường hợp (3,8%).

Nguyên nhân CHKQ: theo kết quả nghiên cứu, loại nguyên nhân gây CHKQ hay gặp nhất là đặt NKQ: 19/30 BN (63,33%) (bảng 3).

Ngày nay, nguyên nhân tổn thương KQ do ống thở là phổ biến nhất ở các nước phát triển. Những yếu tố dẫn đến chít hẹp đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Theo Brichet A, Stauffer J.L [3, 4], các tác giả đều cho rằng sự thiếu kinh nghiệm của người đặt ống NKQ (phải đặt nhiều lần) làm sang chấn đường thở gây tổn thương chít hẹp. Có thể gây ra trật sụn phễu một bên hoặc hai bên, rách hoặc phù nề dây thanh. Các tổn thương này thường gây chít hẹp tại thanh quản. Áp lực trực tiếp do bóng bơm quá căng lớn hơn 25-30 mm H₂O tạo thiếu máu cục bộ niêm mạc, từ đó dẫn đến loét, hoại tử niêm mạc và sụn. Dù có tháo bớt áp lực bóng cách quãng (8 h/lần) vẫn không ngăn được tổn thương niêm mạc, cho nên khi đặt NKQ áp lực bóng không được quá 25 mm H₂O để sự tuần hoàn nuôi dưỡng niêm mạc có thể lưu thông tốt. Tùy từng loại ống NKQ và cách thầy thuốc đặt NKQ mà

các tổn thương có thể gặp ở các vị trí khác nhau tại thanh KQ. Nếu vị trí bóng ở cao như vùng hạ thanh môn thì sẽ gây chít hẹp hạ thanh môn. Nếu ống NKQ dài, vị trí bóng ở sâu hơn gây CHKQ. Nghiên cứu của Brichet A [3] đã đưa ra kết luận: bóng của canule chỉ cách vài cm dưới lỗ MKQ đã tạo ra một áp lực ép lên niêm mạc và dưới niêm mạc gây giảm tuần hoàn của đoạn KQ giữa lỗ mở KQ và bóng, dẫn tới hoại tử đoạn sụn này. Đó chính là cơ chế dẫn đến tổn thương đường thở do áp lực bóng của canule MKQ và ống NKQ.

Theo Puchalski J [5] thì vật liệu, kích cỡ và cách thiết kế của ống NKQ, canule có bóng đã được cho là nguyên nhân gây CHKQ. Ống quá cứng và có độ cong không thích hợp với góc tổn thương (góc nhọn khoảng 27° do mặt phẳng mặt trước họng dưới cắt mặt phẳng của thành sau thanh KQ). Chất liệu ống thở nếu sản xuất bằng silicon thì mềm mại và ít kích thích hơn so với ethylene oxyde. Kích thước của ống NKQ quá lớn, chất liệu cứng, đặt lâu dài là nguyên nhân tạo áp lực của ống NKQ vào vùng mép sau của thanh môn và hạ thanh môn, gây loét sùi và xơ sẹo vùng mép sau. Ngày nay có nhiều cải tiến sản xuất ống NKQ có bóng hoặc canule có bóng đường kính không quá lớn 8,0 mm với nam và 7,0 mm với nữ. Có các cỡ ống khác nhau phù hợp với từng lứa tuổi. Bóng của các loại ống này phải đảm bảo áp lực thấp, thể tích rộng, bóng hai chiều thay phiên và có bộ phận máy kiểm tra áp lực bóng.

Trong nhóm nguyên nhân gây tổn thương do ống thở, chúng ta cũng cần chú ý đến một số yếu tố nữa là nhiễm trùng, sự chấn thương do cọ xát của ống và thanh KQ lúc ho, nuốt làm tăng tỷ lệ chít hẹp. Hội chứng trào ngược dạ dày thực quản gây kích thích hóa học trên thanh KQ của những BN nằm lâu trong phòng cấp cứu cũng là yếu tố thuận lợi gây CHKQ.

Nguyên nhân gây CHKQ do MKQ chúng tôi gặp 11/30 BN (36,67%) (bảng 3). Theo Puchalski J, Mandour M [5, 6], có 185/503 trường hợp (36,78%) CHKQ do nguyên nhân MKQ.

Bảng 3: nguyên nhân gây CHKQ

Nguyên nhân	N	Tỷ lệ (%)
Đặt NKQ	19	63,33
MKQ	11	36,67
Tổng số	30	100

Triệu chứng cơ năng: có 80% BN vào viện vì khó thở, 90% ho khan, 60% thở khò khè, 10% khàn tiếng (bảng 4).

Bảng 4: triệu chứng cơ năng CHKQ

Triệu chứng cơ năng	Số BN (N=30)	Tỷ lệ (%)
Khó thở thường xuyên	24	80,0
Khó thở khi gắng sức	5	16,7
Khàn tiếng	3	10
Thở khò khè	18	60,0
Ho khan	27	90,0
Ho máu ít	3	10,0

Khó thở khàn tiếng gặp 3/30 BN. Lý do vào viện do khó thở và khàn tiếng là những triệu chứng chủ quan gợi ý bệnh lý tại thanh quản. Nguyên nhân chủ yếu là do tổn thương đặt NKQ.

Triệu chứng thực thể hay gặp nhất là tiếng Stridor và ran rít ran ngáy (73,3-76,7%) (bảng 5).

Bảng 5: triệu chứng thực thể CHKQ

Triệu chứng thực thể	Số BN (N=30)	Tỷ lệ (%)
Tiếng Stridor	23	76,7
Ran rít ran ngáy	22	73,3
Rì rào phế nang giảm	4	13,3

Các kết quả này cũng gần với các kết quả đã được Nguyễn Thị Mỹ Thắm (2010) [2] nghiên cứu trên 38 BN CHKQ sau đặt NKQ, thấy: nguyên nhân chính dẫn đến đặt NKQ lâu ngày bao gồm chấn thương sọ não (63%), bệnh hô hấp (13%), đa chấn thương (13%). Đa số đặt NKQ cấp cứu, thở máy kéo dài, thời gian đặt NKQ trung bình $11 \pm 4,5$ ngày, nhỏ nhất 3 ngày, tối đa 20 ngày, đặt NKQ một lần (84%) và đa số sử dụng ống NKQ số 7.5 (40%); 8.0 (55%). Triệu chứng lâm sàng nổi bật 100% khó thở, tiếng rít (71%), trong đó khó thở thì hít vào chiếm 95%, khó thở độ 2 chiếm đa số (53%). Các triệu chứng thường xuất hiện sau rút NKQ thường nhỏ hơn 1 năm, trong đó 1-6 tháng chiếm tỷ lệ 87%.

Đặc điểm cận lâm sàng CHKQ

X quang phổi chuẩn và CT cổ lồng ngực: tổn thương trên phim chụp X quang phổi thẳng chuẩn và phim chụp cắt lớp vi tính lồng ngực cho thấy: tỷ lệ BN CHKQ có tổn thương nhu mô phổi chỉ có 6,7%. Đa số không có tổn thương ở nhu mô phổi (93,3%) (bảng 6, 7). Theo chúng tôi, 6,7% số BN có tổn thương nhu mô là do CHKQ làm giảm thông khí phổi, vì vậy có bội nhiễm gây viêm ở nhu mô phổi.

Bảng 6: hình ảnh tổn thương trên phim X quang phổi chuẩn

Tổn thương	Số BN (N=30)	Tỷ lệ (%)
Tổn thương nhu mô	2	6,7
Không có tổn thương nhu mô	28	93,3
Hẹp KQ	12	40,0

Qua chụp cắt lớp vi tính, chúng tôi thấy: 100% đều có hẹp KQ, trong đó, hẹp KQ gặp chủ yếu ở đoạn 1/3 giữa (60,0%), đoạn 1/3 trên và dưới có tỷ lệ như nhau là 20,0% (bảng 7 và 8).

Bảng 7: hình ảnh tổn thương trên phim cắt lớp vi tính cổ lồng ngực

Tổn thương	Số BN (N=30)	Tỷ lệ (%)
Tổn thương nhu mô	2	6,7
Không có tổn thương nhu mô	28	93,3
Hẹp KQ	30	100

Bảng 8: vị trí hẹp KQ trên cắt lớp vi tính KQ

Vị trí hẹp KQ	N	Tỷ lệ (%)
Hẹp KQ 1/3 trên	6	20,0
Hẹp KQ 1/3 giữa	18	60,0
Hẹp KQ 1/3 dưới	6	20,0
Tổng số	30	100

Trong các BN thuộc nhóm nghiên cứu của chúng tôi, số lượng các trường hợp phát hiện CHKQ qua chụp X quang vùng cổ ngực chỉ thấy 40,0% (bảng 6). Nguyên nhân có thể do BN chụp X quang tư thế nằm, phim mờ, KQ khó quan sát... hoặc do bác sỹ xao nhãng. Theo chúng tôi, có thể vẽ xác định dải sáng KQ, khi đó sẽ tìm ra vùng dải sáng bị thất lại đó chính là chỗ hẹp.

Các tác giả Wain J.C (2003), Dumon J.F (1990) [7, 8] cũng có nhận xét tương tự: X quang ngực chuẩn hiếm khi phát hiện CHKQ, có thể do tia chụp mờ không quan sát được KQ hoặc do thầy thuốc sao nhãng không đọc kỹ bỏ qua tổn thương. Tác giả cũng khẳng định vai trò của chụp CT vùng cổ và lồng ngực là phương pháp cho phép chẩn đoán CHKQ, vị trí, mức độ lan rộng và tổ chức phần mềm xung quanh vùng chít hẹp.

Về nội soi phế quản: nội soi KQ và nội soi ảo: vị trí hẹp chủ yếu ở vùng KQ 50%, hẹp ở vùng thanh môn và hạ thanh môn chiếm tỷ lệ ít (10,0-13,3%). Hẹp nhiều vị trí gặp 26,6% (bảng 9).

Bảng 9: vị trí hẹp KQ qua nội soi KQ

Vị trí hẹp KQ	N	Tỷ lệ (%)
Thanh môn	3	10,0
Hạ thanh môn	4	13,3
KQ	15	50
Hẹp nhiều vị trí	8	26,7
Tổng số	30	100

Cũng qua nội soi KQ và nội soi ảo, chúng tôi thấy: hẹp KQ dạng đồng hồ cát là nhiều nhất 50,0% (15/30 BN), sau đó là hẹp dạng màng (36,6%), hẹp KQ phức tạp chỉ gặp 13,3% (bảng 10).

Bảng 10: đặc điểm chít hẹp qua nội soi và nội soi ảo

Đặc điểm chít hẹp	N	Tỷ lệ (%)
Hẹp dạng màng	11	36,7
Hẹp dạng đồng hồ cát	15	50,0
Hẹp KQ phức tạp	4	13,3
Tổng số	30	100

Còn về mức độ hẹp KQ, qua nội soi KQ và nội soi ảo thấy hẹp KQ vừa gặp tỷ lệ 63,4%, hẹp KQ nặng là 7 BN = 23,3% (bảng 11).

Bảng 11: mức độ hẹp KQ qua nội soi và nội soi ảo phế quản

Mức độ hẹp KQ	N	Tỷ lệ (%)
Hẹp KQ mức độ nhẹ	4	13,3
Hẹp KQ mức độ vừa	19	63,4
Hẹp KQ mức độ nặng	7	23,3
Tổng số	30	100

Một số tác giả Ghorbani A (2012), Ngô Quý Châu [9, 10] đã đánh giá khả năng phát hiện hẹp KQ của 3D-CT và nội soi ảo so với chụp CT thông thường và soi phế quản. Các kết quả cho thấy, các hình ảnh hẹp KQ giống với nội soi phế quản ống mềm, đánh giá chính xác đặc điểm hình thái, sự lan rộng của tổn thương. Các tác giả cho rằng, chụp 3D-CT và nội soi ảo có thể cung cấp các đặc điểm của CHKQ với độ tin cậy cao, là một phương pháp thay thế đáng tin cậy cho những BN không soi phế quản ống mềm được. Các tác giả cũng cho rằng, mặc dù việc sử dụng các cuff áp suất thấp nhưng tỷ lệ CHKQ vẫn không giảm do các yếu tố đặt ống NKQ/MKQ kéo dài, nhiễm trùng...

Về chiều dài của CHKQ: các kết quả nghiên cứu thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12: vị trí và độ dài trung bình của CHKQ qua soi KQ

CHKQ	Vị trí	Độ dài trung bình
Sau đặt NKQ	Sát lỗ cổ ngực	3,5 cm
Sau MKQ	Gần lỗ MKQ	2,0 cm
Dạng phức tạp	Không cố định	3,0 cm

+ CHKQ sau đặt NKQ thường tổn thương dài trung bình 3,5 cm, vị trí thường ở ngay trên lỗ cổ ngực.

+ CHKQ sau MKQ: vị trí gần với lỗ MKQ hơn, thường cách 1,5-2 cm hoặc ở xung quanh lỗ MKQ, chiều dài của chít hẹp trung bình khoảng 2,0 cm (2-4 vòng sụn).

+ CHKQ dạng phức tạp thường có độ dài trung bình khoảng 3,0 cm.

Các kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Thắm, Puchalski J, Mandour M [2, 5, 6]): hẹp ở KQ 1/3 giữa gặp nhiều nhất. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hẹp dạng phức tạp gặp với tỷ lệ khá cao (13,3%), đây cũng là hình thái hẹp khó điều trị nhất và thường phải đặt stent KQ.

Kết quả bước đầu soi phế quản can thiệp điều trị CHKQ

Bảng 13: các biện pháp can thiệp

Biện pháp can thiệp	Số BN (N=10)	Tỷ lệ (%)
Nong KQ	2	20
Nong + Cắt đốt laser	5	50
Nong + Cắt đốt laser + Đặt stent	3	30

Về các biện pháp can thiệp: bảng 13 cho thấy, có 2/10 BN được nong KQ, 5/10 BN được nong và cắt đốt laser, 3/10 BN được nong + Cắt đốt laser + Đặt stent KQ.

Có 10 BN nong, cắt đốt và đặt stent, trong đó 70% là hẹp KQ mức độ vừa, chỉ có 30,0% là hẹp mức độ nặng; 70% là hẹp dạng đồng hồ cát, 30% là dạng hẹp KQ phức tạp. Trong 10 BN này, các triệu chứng lâm sàng và hình ảnh X quang phổi chuẩn có thay đổi: BN không còn khó thở thường xuyên, không có tiếng thở rít. Trên phim chụp X quang phổi chuẩn hết hình ảnh tổn thương nhu mô phổi (bảng 14).

Bảng 14: biến đổi lâm sàng và hình ảnh X quang của BN CHKQ sau điều trị

Triệu chứng	Trước điều trị	Sau điều trị
Khó thở thường xuyên	10	0
Tiếng Stridor	8	0
Ran rít	10	0
X quang: tổn thương nhu mô	2	0

Mặc dù số lượng nghiên cứu chưa nhiều, và Bệnh viện Quân y 103 là cơ sở đầu tiên trong quân đội thực hiện kỹ thuật này, nhưng các kết quả cho thấy, việc điều trị CHKQ sau đặt NKQ/MKQ của chúng tôi đã thành công và đạt hiệu quả tốt.

Theo Bricchet A, Ngô Quý Châu [3, 10] sau khi nghiên cứu điều trị cho 32 BN CHKQ đã đề xuất: điều trị nội soi can thiệp qua ống soi phế quản ống cứng và laser Nd YAG là lựa chọn đầu tiên với các BN CHKQ sau đặt NKQ/MKQ với tỷ lệ thành công 66%.

- Về tai biến, biến chứng: về mặt lý thuyết, các biến chứng của nội soi can thiệp bao gồm: rách KQ, chảy máu, tràn khí trung thất, thậm chí có thể viêm trung thất. Nhưng qua thực tế, chúng tôi chưa gặp các tai biến này mà chỉ gặp những tai biến nhẹ như: sốt nhẹ gặp ở 2 BN, ho ra máu gặp 1 BN, sau vài ngày tự khỏi. Về biến chứng muộn, chỉ có 1 BN bị nhiễm trùng sau nội soi can thiệp 3 tháng; 1 BN hẹp tái phát và 1 BN bị di chuyển stent sau 9 tháng nội soi can thiệp.

Thực tế cho thấy, có nhiều trường hợp điều trị khỏi bằng phương pháp nội soi can thiệp, nhất là với dạng chít hẹp dạng màng. Stent silicon KQ có hiệu quả trong việc duy trì đường kính đường thở, dung nạp tốt, hiếm có biến chứng đe dọa đến tính mạng.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, những trường hợp nong KQ đều đạt được hiệu quả là khôi phục một phần hay toàn bộ đường kính KQ, nhất là với CHKQ dạng màng. Theo Puchalski J [5], cơ chế của phương pháp nong là làm giãn tổ chức thành sau KQ.

Kết luận

Qua nghiên cứu trên 30 BN CHKQ sau MKQ/đặt NKQ, trong đó đã thực hiện can thiệp soi phế quản ống cứng, nong sẹp hẹp, cắt đốt và đặt stent KQ cho 10 BN, tại Bệnh viện Quân y 103 trong thời gian 2012-2014, chúng tôi rút ra kết luận sau:

Lâm sàng, cận lâm sàng CHKQ sau đặt NKQ/MKQ

- Tuổi thấp nhất là 14, tuổi cao nhất là 79, trung bình là 37,4 tuổi. Lứa tuổi bị hẹp KQ nhiều nhất là từ 14-30 (53%). Trong đó nam chiếm 80%, nữ 20%.

- Nguyên nhân chủ yếu đặt NKQ/MKQ là do chấn thương sọ não (60,0%).

- Triệu chứng cơ năng: khó thở thường xuyên 80,0%, ho khan 90,0%, thở khò khè 60,0%, nói khàn 10%.

- Triệu chứng thực thể: tiếng rít vùng KQ và ran rít, ran ngáy gặp 73,3-76,7%.

- Chụp cắt lớp vi tính: hẹp dạng phức tạp 20,0%. Hẹp KQ ở 1/3 giữa 60,0%, 1/3 trên và dưới là 20,0%.

- Nội soi KQ và nội soi ảo: hẹp KQ 50%, hẹp tĩnh mạch và hạ tĩnh mạch gặp 10,0 và 13,3%. Hẹp nhiều vị trí gặp 26,7%. Hẹp KQ dạng đồng hồ cát 50,0%, hẹp dạng màng 36,7%, hẹp KQ phức tạp 13,3%. CHKQ mức độ vừa 63,4%, hẹp mức độ nặng 23,3%. CHKQ sau đặt NKQ dài trung bình 3,5 cm, vị trí ở ngay trên lỗ cổ ngực. CHKQ sau MKQ: hẹp gần lỗ MKQ, cách 1,5-2 cm hoặc ở xung quanh lỗ MKQ, chiều dài của chít hẹp trung bình khoảng 2,0 cm. CHKQ dạng phức tạp dài trung bình khoảng 3,0 cm.

Điều trị can thiệp, nong, cắt đốt và đặt stent đường thở

- Có 10/10 BN được điều trị nong KQ bằng nội soi ống cứng, 5/10 BN được cắt đốt laser, 3/10 BN được đặt stent KQ, trong đó 70% là hẹp KQ mức độ vừa, 30,0% là hẹp mức độ nặng và 70,0% là dạng đồng hồ cát, 30,0% là dạng hẹp KQ phức tạp.

- Các triệu chứng lâm sàng, hình ảnh X quang thay đổi rõ rệt sau điều trị nội soi KQ can thiệp.

- Về tai biến, biến chứng sớm của nội soi KQ can thiệp: sốt nhẹ gặp ở 2 BN, 1 BN ho máu ít, sau vài ngày tự khỏi.

- Biến chứng muộn sau nội soi KQ can thiệp: có 1 BN hẹp tái phát, 1 BN bị di chuyển stent.

Tài liệu tham khảo

[1] Abbasidezfouli A, Shadmehr M.B, Arab M, Javaherzadeh M, Pejhan S, Daneshvar A, Farzanegan R (2007), "Postintubation Multisegmental Tracheal Stenosis: Treatment and Results", *Ann Thorac Surg*, **84**(1), pp.211-214.

[2] Nguyễn Thị Mỹ Thắm, Lâm Huyền Trân, Trần Minh Trường (2010), "Khảo sát đặc điểm tổn thương hẹp thanh KQ sau đặt NKQ lâu ngày", *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*, **14**(1), pp.277-283.

[3] Brichet A, Verkindre C, Dupont J et al (1999), "Multidisciplinary approach to management of postintubation tracheal stenoses", *Eur Respir J*, **13**(4), pp.888-893.

[4] Stauffer J.L, Olson D.E, and Petty T.L (1981), "Complications and consequences of endotracheal intubation and tracheotomy. A prospective study of 150 critically ill adult patients", *Am J Med*, **70**(1), pp.65-76.

[5] Puchalski J and Musani A.I (2013), "Tracheobronchial Stenosis: Causes and Advances in Management", *Clin Chest Med*, **34**, pp.557-567.

[6] Mandour M, Remacle M, Van De Heyning P, et al (2003), "Chronic subglottic and tracheal stenosis: endoscopic management vs. surgical reconstruction", *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **260**(7), pp.374-380.

[7] Wain J.C (2003), "Postintubation tracheal stenosis", *Chest Surg Clin N Am*, **13**(2), pp.231-246.

[8] Dumon J.F (1990), "A dedicated tracheobronchial stent", *Chest*, **97**(2), pp.328-332.

[9] Ghorbani A, Dezfouli A.A, Behgam M, et al (2012), "A Proposed Grading System for Post-Intubation Tracheal Stenosis", *Tanaffos*, **11**, pp.10-14.

[10] Ngô Quý Châu, Hoàng Hồng Thái, Nguyễn Thanh Hồi và cs (2006), "Kỹ thuật điện đông cao tần giải phóng tắc nghẽn KQ tại Khoa Hô hấp Bệnh viện Bạch Mai", *Tạp chí Y học lâm sàng Bệnh viện Bạch Mai*, **11**, pp.124-128.

Kết quả điều trị chấn thương gan bằng phẫu thuật nội soi tại Bệnh viện Việt Đức

Nguyễn Tiến Quyết*, Dương Trọng Hiền, Trần Bình Giang, Hoàng Long

Bệnh viện Việt Đức

Ngày nhận bài 1.4.2015, ngày chuyển phản biện 3.4.2015, ngày nhận phản biện 3.5.2015, ngày chấp nhận đăng 7.5.2015

Điều trị chấn thương (CT) gan luôn là một vấn đề thời sự, với nhiều bước tiến vượt bậc nhờ sự phát triển của chẩn đoán hình ảnh, điều trị chủ yếu là bảo tồn, không mổ, tuy nhiên phương pháp phẫu thuật nội soi (PTNS) cũng được đặt ra và có thể áp dụng trong một số trường hợp. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu đánh giá kết quả điều trị CT gan bằng PTNS trên 32 bệnh nhân (BN) CT gan (23 nam, 9 nữ), tuổi trung bình $30,3 \pm 12,7$, trong đó có 26 trường hợp được xử trí bằng PTNS, 6 trường hợp chuyển mổ mở để xử trí tổn thương. Kết quả cho thấy, không có biến chứng nặng trong và sau mổ. Như vậy, có thể kết luận: dùng PTNS chẩn đoán và điều trị CT gan là an toàn và có kết quả tốt ở những BN huyết động ổn định hay CT gan có kèm tổn thương tạng rỗng.

Từ khóa: CT gan, phẫu thuật nội soi.

Chỉ số phân loại 3.2

RESULTS OF TREATMENT OF LIVER TRAUMA BY LAPAROSCOPIC SURGERY AT VIET DUC HOSPITAL

Summary

Liver injury is always a topical issue; with the great progresses thanks to the development of diagnostic imaging, treatment of liver injuries is mainly under nonoperative management, but laparoscopic surgery is also posed and may be applied in some cases. The research objective is to evaluate the results of treatment of liver injuries by laparoscopic surgery. The results have shown that 32 patients including 23 males and 9 females with liver injuries can be applied laparoscopy for diagnosis and treatment. The mean age of patients is 30.3 ± 12.7 . There are 26 cases managed by laparoscopy, 6 cases converted to laparotomy for the management of injuries with no serious complication during surgery and postoperation. It is concluded that laparoscopic diagnosis and treatment of liver injuries is safe and has good results in cases of hemodynamically stable patients or liver injuries associated with visceral lesions.

Key words: laparoscopic surgery, liver trauma.

Classification number 3.2

Đặt vấn đề

CT gan chiếm tỷ lệ lớn trong CT bụng kín nói chung, chỉ đứng thứ hai sau CT lách [1]. Ngày nay, CT bụng kín trên thế giới cũng như ở Việt Nam có xu hướng gia tăng do tốc độ đô thị hóa cùng sự phát triển của các phương tiện giao thông cũng như tình hình giao thông phức tạp, tai nạn lao động và tai nạn sinh hoạt ngày càng nhiều [2, 3]. Cho đến những năm 80, tất cả các trường hợp chẩn đoán CT gan đều được chỉ định mổ mở. Với sự phát triển vượt bậc của khoa học và kỹ thuật trong chẩn đoán hình ảnh, ứng dụng mang tính đột phá của chụp cắt lớp vi tính (CLVT) trong chẩn đoán CT bụng kín đã cho phép xác định rõ mức độ tổn thương của gan, lượng máu trong ổ bụng cùng các tổn thương phối hợp, qua đó làm thay đổi về cơ bản thái độ điều trị trong CT bụng kín nói chung và CT gan nói riêng. Hiện nay, thái độ điều trị chủ yếu đối với CT gan là bảo tồn, tuy nhiên có 2 điều kiện quan trọng là phải xác định được chính xác mức độ tổn thương gan và loại trừ các thương tổn khác trong ổ bụng mà đặc biệt là vỡ tạng rỗng. Cả 2 yếu tố này hiện nay chủ yếu phụ thuộc vào chất lượng phim chụp CLVT. Để tăng tỷ lệ thành công của

*Tác giả chính: Email: bvvd@fpt.vn

điều trị bảo tồn và tránh bỏ sót các thương tổn khác, từ những năm đầu thế kỷ XXI, một số trung tâm đã ứng dụng PTNS ổ bụng để chẩn đoán và điều trị CT gan. Nội soi ổ bụng là kỹ thuật đơn giản, ít gây sang chấn và cho phép quan sát đánh giá chính xác thương tổn gan cũng như các tạng khác. Ngoài ra, qua nội soi có thể điều trị các thương tổn gan đơn giản như chảy máu từ dây chằng tròn, vỡ gan nông, lấy máu tụ bao gan, xử trí các thương tổn đường mật. Trước tình hình CT gan ngày càng gia tăng, đòi hỏi phải có một chiến lược chẩn đoán, xử trí thích hợp, góp phần nâng cao chất lượng điều trị CT gan, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá kết quả điều trị CT gan bằng PTNS tại Bệnh viện Việt Đức.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: các BN CT gan được chẩn đoán và điều trị bằng PTNS tại Bệnh viện Việt Đức từ tháng 1.2012 đến hết tháng 4.2014.

Tiêu chuẩn lựa chọn: BN có chỉ định phẫu thuật ở tất cả các lứa tuổi, nam và nữ, không phân biệt nguyên nhân được chẩn đoán xác định có CT gan kín và đánh giá mức độ tổn thương gan bằng CLVT theo Tiêu chuẩn của Hiệp hội phẫu thuật chấn thương Hoa Kỳ - AAST (1994).

Tiêu chuẩn loại trừ: nghiên cứu không bao gồm BN CT gan được chỉ định điều trị bảo tồn không mổ, các tổn thương gan mật do can thiệp thủ thuật gây nên, BN đã có tiền sử bệnh lý u, áp xe, xơ gan, phẫu thuật gan, BN đang sử dụng thuốc chống đông và BN có bệnh toàn thân nặng phối hợp: suy tim, suy thận nặng, bệnh hệ thống...

Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu can thiệp thử nghiệm lâm sàng không đối chứng ứng dụng tiến bộ khoa học kỹ thuật PTNS điều trị CT gan.

Kết quả nghiên cứu

Từ tháng 1.2012 đến hết tháng 4.2014, tại Bệnh viện Việt Đức đã có 32 BN CT gan được chỉ định điều trị PTNS, trong đó có 23 BN nam, chiếm 71,9%; 9 BN nữ, chiếm 28,1%; nhỏ nhất là 2 tuổi, cao nhất là 56 tuổi. Tuổi trung bình là $30,3 \pm 12,7$. Nguyên nhân do tai nạn giao thông chiếm 59%, tai nạn lao động ngã cao là 25% và tai nạn sinh hoạt 16%. Thời gian trung bình từ lúc bị nạn đến viện là: $15,7 \pm 7,5$ giờ. Chẩn đoán ban đầu: 9 BN có tổn thương phối hợp (28%) và 24 BN CT gan đơn thuần (72%).

Lâm sàng

Triệu chứng đau vùng gan CT chiếm đa số với 28/32 BN (87,5%); 12,5% còn lại có đau ngoài vùng gan do tổn thương tạng phối hợp hoặc tổn thương thành bụng. Mất máu nhẹ chiếm đa số với 29/32 BN (90,6%). Mất máu nặng chiếm 6,25% với 2 BN.

Huyết áp tối đa dưới 90 mmHg chiếm 68,7% và BN có tình trạng sốc, huyết áp tối đa dưới 90 mmHg chiếm tỷ lệ 31,3%. Nguy cơ phải chuyển mổ của nhóm có HA < 90 cao gấp 6,66 lần so với nhóm HA > 90 mmHg (95% độ tin cậy: 0,9-45,7; $p=0,03$).

Cận lâm sàng

Các bảng từ 1 đến 8 thể hiện các tổn thương và mức độ chấn thương gan qua các xét nghiệm máu, siêu âm và chụp CLVT.

Bảng 1: mức độ mất máu trên xét nghiệm liên quan với mức độ CT gan

Mức độ thiếu máu	Mức độ CT gan					Tổng
	I	II	III	IV	V	
Nặng	0	0	1	1	0	2
Vừa	0	0	0	1	0	1
Nhẹ	2	9	12	6	0	29
Tổng	2	9	13	8	0	32

Không có sự khác biệt về xét nghiệm men gan SGOT và SGPT trung bình ở hai nhóm PTNS (649 ± 214 và $380,6 \pm 47,5$) và mổ mở ($554,6 \pm 182$ và $390,6 \pm 134,7$) với $p=0,9$; men gan GOT TB là $631,5 \pm 176$; GPT trung bình: $382,5 \pm 45$.

Bảng 2: siêu âm phát hiện tổn thương gan

Tổn thương gan	Mức độ CT gan					Tổng
	I	II	III	IV	V	
Đụng giập, tụ máu	2	4	8	5	0	19
Đường vỡ	0	5	4	3	0	12
Tụ máu dưới bao gan	0	0	1	0	0	1
Tổng	2	9	13	8	0	32

Bảng 3: siêu âm phát hiện dịch ổ bụng

Lượng dịch	Cách thức phẫu thuật	
	PTNS	Chuyển mổ mở
Ít	14	0
Trung bình	11	2
Nhiều	1	4
Tổng	26	6

Dịch ổ bụng nhiều: nguy cơ chuyển mổ tăng 15,3 lần so với có ít dịch (95% độ tin cậy: 1,9-122,8; $p=0,003$).

Bảng 4: tần suất các dấu hiệu CT gan trên CLVT

Dấu hiệu CLVT	Chỉ định điều trị		Tổng
	PTNS	Chuyển mổ mở	
Tụ máu dưới bao gan	1	0	1
Đụng giập, tụ máu nhu mô	13	6	19
Đường vỡ gan	10	2	12
Thoát thuốc cản quang	0	2	2
Thiếu máu nhu mô	2	1	3
Tụ máu thượng thận phải	1	1	2
Tổn thương túi mật	0	2	2

Tổn thương gặp nhiều nhất trên CLVT là đụng giập, tụ máu nhu mô: 19 BN (59,4%).

Bảng 5: CLVT phát hiện dịch ổ bụng

Lượng dịch	Chỉ định điều trị		Tổng
	PTNS	Chuyển mổ mở	
Ít	14	0	14
Trung bình	11	2	13
Nhiều	1	4	5
Tổng	26	6	32

Dịch ổ bụng nhiều > 1000 ml có nguy cơ chuyển mổ tăng 15,3 lần so với có ít dịch (95% độ tin cậy: 1,9-122,8; p=0,003).

Bảng 6: liên quan giữa lượng dịch trên CLVT và mức độ tổn thương gan

Lượng dịch	Mức độ tổn thương gan					Tổng
	I	II	III	IV	V	
Ít	2	7	3	2	0	14
Trung bình	0	2	9	2	0	13
Nhiều	0	0	1	4	0	5
Tổng	2	9	13	8	0	32

Lượng dịch ổ bụng phát hiện trên CLVT có liên quan tuyến tính không chặt chẽ với mức độ CT gan (hệ số tương quan 0,58) với p< 0,001.

Bảng 7: phân loại mức độ CT gan trên CLVT theo AAST (1994)

Phân độ CT	Chỉ định điều trị		Tổng
	PTNS	Chuyển mổ mở	
I	2	0	2
II	8	1	9
III	11	2	13
IV	5	3	8
V	0	0	0
Tổng	26	6	32

CT gan độ I, II, III thực hiện xử trí tổn thương bằng PTNS chiếm tới 87,5% (21/24 BN).

CT độ IV: thực hiện xử trí tổn thương bằng PTNS chiếm tới 62,5% (5/8 BN).

Bảng 8: vị trí CT gan trên CLVT liên quan với chỉ định điều trị

Vị trí tổn thương	Chỉ định điều trị		Tổng
	PTNS	Chuyển mổ mở	
Gan trái	4	2	6
Gan phải	12	2	14
PTS	4	1	5
PTT	2	1	3
Hai gan	4	0	4
Tổng	26	6	32

Có 14 BN CT gan phối hợp, 4 BN CT sọ não được điều trị bảo tồn không mổ. 4 BN CT ngực được điều trị dẫn lưu màng phổi. 3 BN vỡ xương chậu được điều trị bảo tồn, 1 BN được nút mạch cấp cứu. 1 BN gãy đùi và 2 BN gãy cẳng chân được điều trị bảo tồn.

Bảng 9: đối chiếu chẩn đoán trước mổ và chỉ định điều trị

Chẩn đoán trước mổ	Chỉ định điều trị		Tổng
	PTNS	Chuyển mổ mở	
Sốc mất máu ban đầu do CT gan	5	4	9
CT gan loại trừ tổn thương tạng rỗng	21	2	23
Tổng	26	6	32

Tất cả 4 BN chuyển mổ mở do sốc mất máu đều thực hiện cắt gan theo tổn thương, trong số này có 1 BN thực hiện thêm cắt túi mật do có đụng giập túi mật và 1 BN vừa cắt lách kèm khâu rách thanh mạc ruột non. Trong 22 BN được chỉ định mổ để chẩn đoán loại trừ tổn thương tạng rỗng và xử trí tổn thương gan, có 1 BN chuyển mổ mở do vỡ tạng rỗng kèm CT lách được xử trí khâu lỗ thủng ruột non và cắt lách, 1 trường hợp chỉ khâu cầm máu tổn thương gan đơn thuần. 26 BN được thực hiện nội soi chẩn đoán và xử trí tổn thương qua nội soi gồm: 21 BN được chẩn đoán chấn thương gan loại trừ tổn thương tạng rỗng và 5 BN được chẩn đoán sốc mất máu ban đầu do CT gan.

Một trong những ưu việt của PTNS là giảm đau sau mổ, chúng tôi tính điểm đau trung bình 5 ngày đầu sau mổ giữa các nhóm PTNS, nhóm chuyển mổ mở.

Bảng 10: điểm đau trung bình sau mổ giữa các nhóm phẫu thuật

Điểm đau sau mổ	Nhóm PTNS	Nhóm chuyển mổ mở	p
Ngày thứ nhất	2,8±0,1	7,7±0,3	<0,001
Ngày thứ hai	1,7±0,1	6,2±0,3	<0,001
Ngày thứ ba	0,8±0,1	4,6±0,3	<0,001
Ngày thứ tư	0,2±0,1	3,6±0,3	<0,001
Ngày thứ năm	0,08±0,05	2,6±0,3	<0,001

Thời gian có nhu động ruột trở lại đối với nhóm PTNS là 2,1±0,1 ngày, nhóm chuyển mổ mở là 4,9±0,2 ngày, khác biệt có ý nghĩa thống kê với p=0,001.

Thời gian nằm viện trung bình là 7,6±3,7 ngày. Nhóm PTNS đơn thuần có số ngày nằm viện là 7,3±0,7 ngày, nhóm phải chuyển mổ mở là 9±1,1 ngày (p=0,3).

Không có biến chứng nhiễm trùng vết mổ cũng như biến chứng chảy máu sau mổ. Không có trường hợp nào rò mật hay tụ dịch mật sau mổ.

Bàn luận

Tỷ lệ BN có huyết động ổn định với huyết áp tối đa (HATĐ) ≥ 90 mmHg khi đến viện chiếm 68,7% (cao hơn so với nghiên cứu của Trịnh Hồng Sơn (1990-1995) [4] là 55,6%, của Dương Trọng Hiền (1996-1998) [5] là 51,8%, thấp hơn kết quả của Croce [6] nghiên cứu trên 136 BN có 112 BN tới viện có huyết động ổn định chiếm 82%), có lẽ do việc lấy mẫu của chúng tôi với số lượng còn nhỏ và sự tiến bộ về hồi sức ban đầu của y tế cơ sở trước khi chuyển người bệnh lên tuyến trung ương. Có 10 BN (31,3%) HATĐ thấp: từ 70 đến < 90 mmHg. Theo Dương Trọng Hiền [5], giữa mạch và lượng máu mất thể hiện qua HATĐ cũng có mối tương quan khá chặt chẽ. Trong nhóm nghiên cứu, tỷ lệ BN có mạch nhanh 100-120 l/phút và có HATĐ 70 đến <90 mmHg (9,4%), cho thấy BN đã được bù thể tích tuần hoàn trong giai đoạn hồi sức ban đầu nhưng vẫn thiếu máu nên dù HATĐ có hồi phục nhưng mạch vẫn nhanh đòi hỏi phải bù cả máu, như vậy yếu tố mạch cũng có giá trị trong tiên lượng sự mất máu, tuy nhiên chỉ là một dấu hiệu góp phần đánh giá mức độ mất máu. Phân tích theo phân loại huyết động của Phác đồ hồi sức chấn thương cải tiến của AAST (ATLS) cho thấy, các rối loạn huyết động nặng chủ yếu nằm trong nhóm chuyển mổ mở, các BN phải mổ trong nhóm này đều do mức độ nặng của CT gan.

Với CT gan, đáp ứng với hồi sức ban đầu đóng vai trò quyết định với chỉ định điều trị [7]. Nhóm BN có tình trạng huyết động không ổn định dù đã bù dịch,

máu hoặc sốc nặng chứng tỏ máu đang chảy, đòi hỏi phải can thiệp mổ cấp cứu. Một nhóm khác là những BN đáp ứng tạm thời với hồi sức ban đầu cần truyền dịch liên tục để duy trì huyết động ổn định, trước đây những BN này đều được điều trị phẫu thuật [7, 8], nhưng những nghiên cứu gần đây cho thấy những BN này vẫn có thể điều trị bảo tồn không mổ với truyền máu và các thủ thuật can thiệp (chọc động mạch gan chọn lọc và nút mạch) có thể giúp cầm máu không mổ vì tình trạng đáp ứng tạm thời có thể do chưa bù đủ lượng máu mất (20-40%) hoặc do máu còn đang chảy [7]. Lượng máu truyền trong trường hợp này theo tính toán [7, 9, 10] và theo kết quả các nghiên cứu trong y văn không quá 4 đơn vị trong 24 giờ đầu ở người lớn (nếu hơn tỷ lệ bảo tồn không mổ thất bại rất cao) [11] và không quá 30 ml/kg ở trẻ em (40% thể tích máu theo ước tính khoảng 80 ml/kg) [12], nếu tình trạng huyết động không cải thiện, chứng tỏ máu vẫn đang chảy, cần chỉ định can thiệp cầm máu. Trong nghiên cứu, có 4 trường hợp phải truyền máu trước phẫu thuật, khi tiến hành nội soi thăm dò đều phải chuyển mổ mở.

Mặc dù tỷ lệ BN CT gan được điều trị bảo tồn không mổ có xu hướng tăng dần theo thời gian nhưng PTNS điều trị CT gan vẫn có chỗ đứng nhất định. Lucas và Ledgerwood [13] theo dõi trong 30 năm, tỷ lệ không mổ những năm 69-70 là 0%, tăng lên 31% vào những năm 97-98. Richardson và cộng sự [14] theo dõi xu hướng điều trị CT gan trong 25 năm (1975-1999) cũng nhận thấy tỷ lệ không mổ CT gan tăng từ 0% lên đến 61%. Nghiên cứu đa trung tâm của Pachter (1995) [15] cho thấy tỷ lệ này dao động từ 20-70% tùy trung tâm, trung bình là 47%. Gần đây, tỷ lệ chỉ định điều trị bảo tồn không mổ theo nhiều báo cáo từ 50 đến hơn 80% [6, 7, 16]. Tại Bệnh viện Việt Đức, giai đoạn 2004-2005, 55,6% CT gan được chỉ định điều trị không mổ [2] và giai đoạn 2007- 2009 có 292/346 BN CT gan được điều trị bảo tồn không mổ, chiếm 84,4% [17].

Tuy vậy, vẫn có khoảng 15% các trường hợp tổn thương gan nặng hoặc có tổn thương tạng khác phối hợp có chỉ định mổ. PTNS được ứng dụng chủ yếu cho nhóm BN này. C.H Pilgrim [18] nhận xét qua 3 BN được thực hiện PTNS để điều trị rò dịch mật sau CT gan thành công, an toàn và hiệu quả. Nhận định này cũng được các tác giả khác như Carrillo đồng thuận [7].

Qua các phân tích nêu trên và kết quả nghiên cứu

này cho thấy, điều trị PTNS có thể chỉ định và điều trị thành công với những trường hợp huyết động ổn định từ đầu hoặc ổn định trở lại sau hồi sức bù dịch, máu. Huyết động ổn định trở lại sau hồi sức bù dịch, máu (2000 ml dịch truyền nhanh và không quá 4 đơn vị máu trong 24 giờ đầu) có tỷ lệ bảo tồn không mổ thành công 80-90% [6, 19, 20]. CT nặng độ IV, V, dịch ổ bụng nhiều vẫn có thể xem xét điều trị bảo tồn nếu đáp ứng được điều kiện về huyết động [19, 21]. Đa số các tác giả đều thống nhất rằng huyết động là yếu tố quyết định thái độ xử trí hơn là mức độ CT gan [15, 19, 22]. Hiện nay, ngoài đa số các CT gan độ I-III còn có 30-60% CT độ IV, V được điều trị bảo tồn không mổ với tỷ lệ thành công khá cao [19, 22, 23, 24]. Tuy nhiên, trong CT gan độ V, tỷ lệ sốc và huyết động không ổn định phải mổ cấp cứu rất cao, tới 95% theo Boone [8] và 82% theo nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Hùng [17]. Nghiên cứu đa trung tâm của Pachter [15] cho thấy, hầu hết trường hợp điều trị bảo tồn không mổ thất bại đều là CT gan độ IV, V. Nghiên cứu này cũng như của nhiều tác giả khác đều cho thấy những trường hợp trên có nguy cơ biến chứng, chuyển mổ cao hơn nên cần phải theo dõi hết sức chặt chẽ nếu có chỉ định điều trị bảo tồn không mổ [21, 23].

Trong nghiên cứu này, với 32 BN được chẩn đoán có CT gan trước mổ, 26 BN được nội soi chẩn đoán và xử trí đốt điện cầm máu và rửa sạch ổ bụng dẫn lưu, 4 BN chuyển mổ mở do chấn thương gan nặng, có sốc mất máu, 2 BN mổ mở vì chấn thương gan nặng, không tổn thương tạng rỗng.

Do nguyên nhân chủ yếu là tai nạn giao thông và gan là tạng bụng dễ bị tổn thương nhất nên CT gan thường gặp trong đa CT. Nhóm nghiên cứu có 14/32 BN có một hoặc nhiều tổn thương phối hợp chiếm 43,8%. Theo nhiều nghiên cứu [10, 25], tổn thương phối hợp và đa CT gặp từ 51,4 đến 92,5% các trường hợp; tổn thương phối hợp ngoài ổ bụng hay gặp nhất là CT ngực (36,5-80,9%), sau đó là tổn thương xương lớn (26,9-66%), CT sọ não (26,98-55,7%), CT hàm mặt (7,9%) và CT cột sống ít gặp nhất với tỷ lệ 4,76%; tổn thương phối hợp ổ bụng gặp nhiều nhất là CT lách 14,3%, thận 7,9%, ruột 4,8%, tụy ít gặp nhất với 4,76%. Nghiên cứu này cũng cho kết quả tương tự với tổn thương ngoài ổ bụng gặp nhiều nhất là CT ngực 12,5%, vỡ xương chậu 9,4%, CT sọ não 12,5%; với tổn thương tạng bụng trong nhóm nghiên cứu gặp nhiều nhất lại là CT thận 9,4%, tiếp theo là CT lách 9,4%, CT ruột 3,1%.

Có 9 trường hợp BN có CT gan phối hợp được thực

hiện PTNS, 24 trường hợp tổn thương gan đơn thuần nhưng trước mổ chưa loại trừ được tổn thương tạng rỗng đã được thực hiện nội soi thăm dò và xử trí tổn thương gan qua nội soi.

Tỷ lệ thực hiện PTNS là 81,3%, trong đó điều trị cầm máu bảo tồn thành công 100%, tuy nhiên phần lớn các tổn thương được thực hiện bảo tồn thông qua PTNS là những thương tổn không gây chảy máu nhiều cũng như không tổn thương sâu vào hệ thống đường mật phân thủy nên khả năng điều trị bảo tồn thành công cao. Nhóm được xử trí PTNS không có biến chứng trong cũng như sau mổ và không có tử vong trong thời gian nằm viện. BN được thực hiện điều trị bằng PTNS đơn thuần có mức độ đau sau mổ giảm hơn hẳn so với nhóm phải chuyển mổ mở cũng như thời gian có nhu động ruột trở lại sớm hơn cho thấy hiệu quả của điều trị bằng PTNS.

Những BN chuyển mổ mở chủ yếu là những CT gan độ IV có chảy máu nhiều gây tụt huyết áp, không thể thực hiện xử trí qua PTNS. Trong điều kiện cấp cứu cũng như trong hoàn cảnh huyết động không ổn định, việc thực hiện phẫu thuật cắt gan qua nội soi có thể gây tăng nguy cơ cho BN nên đã được chuyển sang phẫu thuật mở và thực hiện khâu cầm máu cũng như cắt gan đều an toàn trong mổ cũng như hậu phẫu không gặp biến chứng.

Về cơ bản, thời gian PTNS ngắn hơn so với mổ mở. Ngay cả nhóm BN phải mổ mở thì thời gian cũng không dài hơn xử trí tổn thương của mổ mở. Một số tác giả khác như Safi [26] và Thapar [27] đã ứng dụng PTNS trên BN CT gan độ IV kết hợp với tắc mạch qua chụp mạch và làm thủ thuật mở cơ thất oddi.

Kết luận

Chỉ định PTNS trong những trường hợp CT gan có nghi ngờ tổn thương tạng rỗng là thích hợp và an toàn. PTNS điều trị CT gan là an toàn và hiệu quả cho những trường hợp CT gan có huyết động ổn định, giúp chẩn đoán và xử trí hiệu quả các tổn thương phối hợp với CT gan trong ổ bụng. PTNS áp dụng trong CT gan giúp BN giảm đau sau mổ và sớm phục hồi lưu thông tiêu hoá.

Tài liệu tham khảo

[1] T.V Clancy, J Gary Maxwell, D.L Covington, et al (2001), "A statewide analysis of level I and II trauma centers for patients with

major injuries", *J Trauma*, **51(2)**, 346-51.

[2] Trần Bình Giang, Nguyễn Đức Tiến, Nguyễn Ngọc Hùng và các cộng sự (2006), "Chỉ định và kết quả bước đầu điều trị bảo tồn không mổ CT gan tại Bệnh viện Việt Đức 2004-2005", *Tạp chí Ngoại khoa*, **56**, 97-104.

[3] Lê Tư Hoàng (2006), "Vai trò của PTNS trong chẩn đoán và thái độ xử trí CT bụng kín tại Bệnh viện Việt Đức từ 8.2005-7.2006", *Tạp chí Ngoại khoa*, **56**, 2-8.

[4] Trịnh Hồng Sơn, Tôn Thất Bách, Phạm Văn Bình và các cộng sự (1996), "CT và vết thương gan: phân loại mức độ tổn thương, chẩn đoán và điều trị", *Tạp chí Y học thực hành*, **1**, 40-46.

[5] Dương Trọng Hiền (1998), *Nghiên cứu các yếu tố đánh giá, phân loại và tiên lượng mức độ nặng, tử vong ở BN CT gan tại Bệnh viện Việt Đức*, Luận văn bác sỹ nội trú Trường Đại học Y Hà Nội.

[6] M.A Croce, T.C Fabian, P.G Menke, et al (1995), "Nonoperative management of blunt hepatic trauma is the treatment of choice for hemodynamically stable patients. Results of a prospective trial", *Ann Surg.*, **221(6)**, 744-55.

[7] E.H Carrillo, C Wohltmann, J.D Richardson (2001), "Evolution in the treatment of complex blunt liver injuries", *Curr Probl Surg.*, **38(1)**, 1-60.

[8] D.C Boone, M Federle, T.R Billiar, et al (1995), "Evolution of management of major hepatic trauma: identification of patterns of injury", *J Trauma.*, **39(2)**, 344-50.

[9] American college of surgeons (2004), *Advanced trauma life support course for physicians*, 7th, ed, IL, Chicago.

[10] A.S Al-Mulhim, H.A Mohammad (2003), "Non-operative management of blunt hepatic injury in multiply injured adult patients", *Surgeon.*, **1(2)**, 81-5.

[11] K.I Maull (2001), "Current status of nonoperative management of liver injuries", *World J Surg.*, **25 (11)**, 1403-4.

[12] S.L Moulton, F.P Lynch, D.B Hoyt (1992), "Operative intervention for pediatric liver injuries: avoiding delay in treatment", *J Pediatr Surg.*, **27(8)**, 958-63.

[13] C.E Lucas, A.M. Ledgerwood (2000), "Changing times and the treatment of liver injury", *Am Surg.*, **66(4)**, 337-41.

[14] J.D Richardson, F.A Glen, L.K James, et al (2000), "Evolution in the management of hepatic trauma: a 25-year perspective", *Ann*

Surg., **232(3)**, 324-330.

[15] H.L Pachter, M.M Knudson, B Esrig, et al (1996), "Status of nonoperative management of blunt hepatic injuries in 1995: a multicenter experience with 404 patients", *J Trauma.*, **40(1)**, 31-8.

[16] H.L Pachter, D.V Feliciano (1996), "Complex hepatic injuries", *Surg Clin North Am.*, **76(4)**, 763-82.

[17] Nguyễn Ngọc Hùng, Lê Nhật Huy, Trần Bình Giang (2012), "Nghiên cứu các yếu tố nguy cơ trong chỉ định và điều trị không mổ CT gan", *Tạp chí Ngoại khoa*, **61(1-2-3)**, 85-94.

[18] C.H Pilgrim, V Usatoff (2006), "Role of laparoscopy in blunt liver trauma", *ANZ Journal of Surgery*, **76(5)**, 403-6.

[19] Y.G Goan, M.S Huang và J.M Lin (1998), "Nonoperative management for extensive hepatic and splenic injuries with significant hemoperitoneum in adults", *J Trauma.*, **45(2)**, 360-4; discussion 365.

[20] J.W Meredith, J.S Young, J Bowling (1994), "Nonoperative management of blunt hepatic trauma: the exception or the rule?", *J Trauma.*, **36(4)**, 529-34; discussion 534-5.

[21] E.H Carrillo, J.D Richardson (2001), "The current management of hepatic trauma", *Adv Surg.*, **35**, 39-59.

[22] G.C Velmahos, K Toutouzas, R Radin (2003), "High success with nonoperative management of blunt hepatic trauma: the liver is a sturdy organ", *Arch Surg.*, **138(5)**, 475-80; discussion 480-1.

[23] A.B Christmas, A.K Wilson, B Manning (2005), "Selective management of blunt hepatic injuries including nonoperative management is a safe and effective strategy", *Surgery.*, **138(4)**, 606-10; discussion 610-1.

[24] H.L Pachter, S.R Hofstetter (1995), "The current status of nonoperative management of adult blunt hepatic injuries", *Am J Surg.*, **169(4)**, 442-54.

[25] B Schnuriger, D Inderbitzin, M Schafer (2009), "Concomitant injuries are an important determinant of outcome of high-grade blunt hepatic trauma", *Br J Surg.*, **96(1)**, 104-10.

[26] F Safi, S Weiner, B Poch (1999), "Surgical management of liver rupture", *Chirurg.*, **70(3)**, 253-8.

[27] Ghawat Thapar, Dalvi Rokade Philip, Warawdekar Bapat (2013), "Massive Liver Trauma-Multidisciplinary Approach and Minimal Invasive Surgery can Salvage Patients", *Indian J Surg.*, **75** (Suppl 1), 449-52.

Đánh giá ảnh hưởng của laser trên một số chỉ tiêu hình thái phôi 3 ngày tuổi để chẩn đoán di truyền tiền làm tổ

Nguyễn Đình Tảo*, Nguyễn Ngọc Diệp, Nguyễn Thanh Tùng, Quàn Hoàng Lâm

Trung tâm Công nghệ phôi, Học viện Quân y

Ngày nhận bài 27.4.2015, ngày chuyển phản biện 4.5.2015, ngày nhận phản biện 3.6.2015, ngày chấp nhận đăng 8.6.2015

Hiện nay, có nhiều phương pháp điều trị cho các bệnh nhân (BN) hiếm muộn, trong đó phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) đóng vai trò quan trọng và ngày càng được phát triển rộng khắp trên thế giới, song tỷ lệ thành công mới chỉ đạt khoảng 30-40%. Việc lựa chọn phôi hầu như chỉ dựa trên những tiêu chuẩn về hình thái, do vậy chưa phản ánh đầy đủ chất lượng thực của phôi, dẫn đến kết quả điều trị TTTON bị hạn chế. Để nâng cao chất lượng điều trị, đồng thời sàng lọc một số bệnh di truyền, việc chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi (Preimplantation Genetic Diagnosis - PGD) là một trong những yêu cầu quan trọng và cấp thiết, nhưng để thực hiện được kỹ thuật này cần phải sinh thiết phôi. Trên cơ sở đó, các tác giả đã triển khai đề tài “Nghiên cứu hình thái phôi sau sinh thiết để chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi” nhằm đánh giá sự thay đổi hình thái phôi sau sinh thiết ngày 3 (phôi được nuôi cấy đến ngày thứ 3 trước khi sinh thiết) và tìm hiểu một số yếu tố ảnh hưởng tới khả năng phôi sống sót và tạo phôi túi sau sinh thiết. Đối tượng nghiên cứu là 102 phôi còn dư khi TTTON, sinh thiết ngày 3. Chất lượng phôi được đánh giá dựa theo tác giả Andres Salumets (2001) [1] với 3 tiêu chuẩn chính là: số lượng của các phôi bào trong một phôi; sự đồng đều giữa các phôi bào; tỷ lệ (%) giữa mảnh vỡ bào tương và thể tích của phôi. Kết quả cho thấy, sau sinh thiết 24 giờ, tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển chung của cả 3 nhóm là 93/102 phôi, đạt 91,17% và sau 48 giờ tỷ lệ hình thành phôi túi là 83 phôi, đạt 81,37%, trong đó số phôi túi tiếp tục sống sót và phát triển (loại AA và AB) là 67 phôi, chiếm 65,68%. Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương, độ dày màng trong suốt, đường kính phôi giữa các nhóm thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Từ kết quả nghiên cứu có thể kết luận: sinh thiết bằng tia laser không làm thay đổi hình thái phôi, khả năng sống sót và tạo thành phôi túi. Tuổi mẹ, thời gian vô sinh, nồng độ FSH (hormone kích thích nang trứng) càng cao thì tỷ lệ phôi sống sót và tạo thành phôi túi càng giảm. Phương pháp TTTON thông thường (IVF) hoặc phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) không ảnh hưởng tới tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển và tạo thành phôi túi sau sinh thiết.

Từ khóa: BN hiếm muộn, chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi, hình thái phôi, sinh thiết bằng laser.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

Vô sinh là vấn đề đang được quan tâm ngày càng nhiều trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Theo Tổ chức y tế thế giới, tỷ lệ vô sinh chiếm khoảng 10% trong các cặp vợ chồng. Tại Việt Nam, theo Nguyễn Viết Tiến và cộng sự (2013) [2], tỷ lệ vô sinh trong cộng đồng chiếm 7,5%. Ngày nay có nhiều phương pháp điều trị cho các BN hiếm muộn, trong đó phương pháp TTTON đóng vai trò quan trọng trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản và ngày càng được phát triển rộng khắp trên thế giới. Tuy nhiên, tỷ lệ thành công trong hỗ trợ sinh sản mới chỉ đạt khoảng 30-40%, và trong lĩnh vực này

còn nhiều vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu. Hiện nay, hầu như việc lựa chọn phôi đều dựa trên những tiêu chuẩn về hình thái của phôi. Tuy nhiên, việc đánh giá về hình thái chưa phản ánh đầy đủ chất lượng thực của phôi, nếu chỉ dựa vào các thông số về hình thái thì kết quả điều trị TTTON bị hạn chế. Để nâng cao chất lượng trong điều trị cũng như đảm bảo các trẻ TTTON khỏe mạnh về thể lực, sáng suốt về tinh thần, đồng thời sàng lọc một số bệnh di truyền, việc chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi (Preimplantation Genetic Diagnosis - PGD) là một trong những yêu cầu quan trọng, cấp thiết và thực tiễn. Nguyên tắc kỹ thuật của PGD dựa trên

*Tác giả chính: Email: dinhtao1955@gmail.com

STUDY ON EMBRYO MORPHOLOGICAL CHANGES AFTER EMBRYO BIOPSY FOR GENETIC DIAGNOSIS PRIOR TO EMBRYO TRANSFER

Summary

There are many methods for treating infertility patients, of which IVF plays an important role in the field of assisted reproduction and development and has increasingly widespread in the world. However, the success rate in assisted reproduction has only reached 30-40%. Currently, most are choosing embryos based on morphological criteria of the embryo. However, the morphological assessment does not fully reflect the true quality of the embryos if only based on morphological parameters, so the results of in vitro fertilization treatment is still limited. To improve the quality of the treatment and refinement of some genetic diseases, Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) is one of the critical, urgent and practical requirements. On that basis, the authors have conducted a project "Study on embryo morphological changes after embryo biopsy for genetic diagnosis prior to embryo transfer" to evaluate embryo morphological changes and assess some factors affecting the ability of embryo survival and creating blastocyst after biopsy. Subjects and Methods: 102 surplus embryos have been biopsied on day 3. The quality is evaluated based on the author Andres Salumets (2001) [1] on three main criteria: number of blastomeres in an embryo, uniform between embryos, and percentage rate between cytoplasm fragments and the embryo volume. The results have shown that: after 24 hours of biopsy, survival rate of embryos and further development of the 3 groups is 93 embryos in total 102 embryos, reaching 91.17%; and after 48 hours, blastocyst formation is 83, reaching 81.37%. The number of embryos that survive and continue their development (AA and AB) accounts for 65.68% (67 embryos). Cytoplasm fragment ratio, ZP thickness, embryo diameter among the groups have not changed significantly. In conclusion, laser biopsy does not alter embryo morphology, viability and blastocyst forming. The higher maternal age, duration of infertility, FSH concentration, the less survival rate of embryos and blastocyst forming. IVF or ICSI does not affect the survival rate of embryos, further development of blastocyst after embryo biopsy.

Keywords: *embryo morphology, infertility patients, laser biopsy, Preimplantation Genetic Diagnosis.*

Classification number 3.2

việc thực hiện TTON để tạo phôi, sau đó sinh thiết phôi và phân tích nhiễm sắc thể (NST) hoặc ADN bằng kỹ thuật FISH (fluorescence in situ hybridization), CGH (comparative genomic hybridization) hoặc PCR (polymerase chain reaction) [3].

Kỹ thuật sinh thiết phôi là kỹ thuật xâm lấn, đòi hỏi nhiều thao tác tỉ mỉ, chính xác. Vì vậy, trong quá trình thực hiện có thể ảnh hưởng đến chất lượng của phôi. Song song với công việc hoàn thiện quy trình sinh thiết phôi, chúng tôi tiến hành đánh giá hình thái phôi và khảo sát một số yếu tố có thể ảnh hưởng tới sự phát triển của phôi sau sinh thiết. Trên cơ sở đó, chúng tôi thực hiện đề tài "Nghiên cứu ảnh hưởng của laser trên một số chỉ tiêu hình thái phôi 3 ngày tuổi để chẩn đoán di truyền tiền làm tổ" nhằm đánh giá sự thay đổi hình thái phôi sau sinh thiết ngày 3 bằng tia laser và tìm hiểu một số yếu tố ảnh hưởng tới khả năng phôi sống sót và tạo phôi túi sau sinh thiết.

Tổng quan tài liệu

PGD đã được áp dụng tại nhiều nước tiên tiến trên thế giới từ những thập kỷ trước. Nguyên tắc kỹ thuật của PGD dựa trên việc thực hiện TTON để tạo phôi, sau đó sinh thiết phôi và phân tích NST hoặc ADN bằng kỹ thuật FISH, CGH hoặc PCR. Nhìn chung, kỹ thuật PGD gồm 2 bước chính: sinh thiết phôi và chẩn đoán di truyền. Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả [3] cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ thành công cũng như khả năng phát triển tinh thần và tâm sinh lý khi so sánh trẻ sau PGD với trẻ sau khi ICSI và nhóm trẻ sinh ra từ thụ thai tự nhiên.

Sinh thiết phôi được tiến hành qua 3 bước: chuẩn bị, mở cửa sổ màng trong suốt và lấy tế bào. Có 3 phương pháp chính được dùng để mở cửa sổ màng trong suốt: cơ học, hóa học hay dùng tia laser. Hiện nay, dùng tia laser để mở cửa sổ màng zona được xem là phương pháp đơn giản, an toàn và dễ áp dụng nhất. Sự phát triển của phôi sau sinh thiết phụ

thuộc vào rất nhiều yếu tố, sau đây là một số yếu tố liên quan có thể ảnh hưởng tới hình thái phôi sau sinh thiết.

Năm 1995, sử dụng phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ, Munne nhận thấy rằng tỷ lệ phôi bị lệch bội và số lượng mảnh vỡ tăng dần theo tuổi của người mẹ: 16% trên phụ nữ 20 đến 34 tuổi; 37% trên phụ nữ từ 35 đến 39 tuổi và cao nhất 53% ở phụ nữ trên 40 tuổi. Tác giả này năm 2002 nghiên cứu dựa trên 1 tế bào (94 phôi) và trên 2 tế bào (304 phôi) thấy rằng tỷ lệ đột biến NST (thể dị bội), mảnh vỡ tăng theo tuổi mẹ, từ 12,2% ở lứa tuổi dưới 35, đến 31% ở lứa tuổi trên 40 [4].

Nghiên cứu so sánh giữa phương pháp IVF và ICSI thấy rằng, hình thái phôi tạo ra từ 2 phương pháp trên là như nhau. Tuy nhiên, Walker M.C, Murphy K.E, Pan S (2004) cho thấy tỷ lệ NST bất thường cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm BN dùng phương pháp ICSI, khi những BN này là người mang rối loạn về NST, có tinh trùng ít, yếu và dị dạng [5]. Trong những trường hợp này, chẩn đoán trước khi làm tổ (nên được tiến hành khi xét nghiệm máu và tinh dịch đồ) thấy rằng những BN này có xu hướng truyền các bệnh về rối loạn NST.

Munne và cs [6] đã công bố kết quả so sánh mối liên quan giữa hình thái phôi và nồng độ FSH để từ đó đánh giá mối liên quan giữa nồng độ FSH cơ bản với những biến đổi hình thái phôi và sai lệch về gen trong quá trình phân bào giảm nhiễm và giai đoạn phôi phân chia. Đối với phụ nữ dưới 40 tuổi, nồng độ FSH cao, có tỷ lệ rối loạn NST, phôi độ III, độ IV tăng đáng kể ($p < 0,02$), nhưng không phụ thuộc vào nồng độ FSH. Tỷ lệ bất thường NST, phôi độ 3, độ 4 ở phụ nữ dưới 40 tuổi có nồng độ FSH trên 10 mIU/ml tương đương với tỷ lệ rối loạn NST ở phụ nữ trên 40 tuổi có cùng nồng độ FSH. Như vậy, tăng tỷ lệ rối loạn NST, hình thái phôi ở phụ nữ trên 40 tuổi không phụ thuộc vào nồng độ FSH.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Gồm 102 phôi người còn dư khi TTTON. Các đối tượng nghiên cứu được chia thành 3 nhóm:

- Nhóm I: 33 phôi của BN ≤ 30 tuổi
- Nhóm II: 39 phôi của BN từ 30 đến 35 tuổi
- Nhóm III: 30 phôi của BN > 35 tuổi

* Tiêu chuẩn lựa chọn phôi để sinh thiết: phôi được

nuôi cấy đến ngày thứ 3 trong môi trường nuôi cấy của TTTON. Các phôi có tế bào đồng đều, tỷ lệ mảnh vỡ bào tương (fragment) dưới 20% (phôi độ III, độ IV).

* Tiêu chuẩn loại trừ: các phôi giai đoạn sớm độ I, độ II: các tế bào không đồng đều, tỷ lệ mảnh vỡ bào tương từ 20% trở lên.

Phương pháp

Đánh giá thụ tinh và quá trình nuôi cấy phôi: khoảng 16-18 giờ sau khi tiêm tinh trùng vào trứng, trứng được đánh giá xem có thụ tinh hay không. Nếu đã thụ tinh tạo thành phôi sẽ xuất hiện 2 tiền nhân và 2 thể cực. Sau đó, phôi được đánh giá ghi điểm ở từng thời điểm 40, 68 và 112 giờ sau khi thụ tinh và đánh giá hình thái phôi sau sinh thiết 24 và 48 giờ. Số lượng, hình thể phôi bào và thể loại mảnh vỡ, độ dày màng trong suốt, đường kính phôi được thu thập để đánh giá chất lượng của phôi [7].

Các tiêu chuẩn đánh giá chất lượng phôi: đánh giá chất lượng phôi nuôi cấy ngày thứ 3 theo T. Ebner (2003) đang được áp dụng tại Trung tâm Công nghệ phôi. Theo cách cho điểm này, việc đánh giá chất lượng phôi nuôi cấy ngày thứ 3 dựa vào 3 tiêu chuẩn chính là: số lượng của các phôi bào trong một phôi; sự đồng đều giữa các phôi bào; tỷ lệ (%) giữa mảnh vỡ bào tương và thể tích của phôi [8].

- Số phôi bào (được ký hiệu là một con số).

- So sánh sự đồng đều giữa các phôi bào (được ký hiệu là một chữ cái viết hoa): A - các phôi bào đồng đều, B- các phôi bào không đồng đều.

- Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương (được ký hiệu là một con số, chính là tỷ lệ % mảnh vỡ bào tương so với thể tích của phôi): 1 - không có mảnh vỡ bào tương, 2 - tỷ lệ mảnh vỡ bào tương $< 20\%$, 3 - tỷ lệ mảnh vỡ bào tương $20-50\%$, 4 - tỷ lệ mảnh vỡ bào tương $> 50\%$.

- Phân độ phôi theo 4 cấp độ được áp dụng để đánh giá chất lượng phôi tại Trung tâm Công nghệ phôi, Học viện Quân y theo tác giả Andres Salumets (2001) [1]: độ I - các phôi có tỷ lệ mảnh vỡ bào tương $\geq 50\%$ thể tích của phôi; độ II - các phôi có tỷ lệ mảnh vỡ bào tương từ 20 đến $< 50\%$ thể tích của phôi; độ III - các phôi có số phôi bào không đồng đều và/hoặc có tỷ lệ mảnh vỡ bào tương $< 20\%$ thể tích của phôi; độ IV - các phôi có số phôi bào đồng đều, và không có hoặc có rất ít (không đáng kể) các mảnh vỡ bào tương.

Kết quả nghiên cứu

Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 102 BN, mỗi BN 1 phôi được đưa vào đối tượng nghiên cứu. Trong tổng số 102 BN, chúng tôi chia làm 3 nhóm: nhóm I gồm 33 BN có độ tuổi dưới 30, chiếm 32,35%; nhóm II gồm 39 BN có độ tuổi từ 30-35, chiếm 38,24% và nhóm III gồm 30 BN có độ tuổi trên 35, chiếm 29,41%, với số lượng trên đảm bảo cho các chỉ tiêu nghiên cứu. Tuổi trung bình của tất cả các BN nghiên cứu là $29,3 \pm 3,6$ (từ 20 đến 42 tuổi), Tuổi trung bình của BN thuộc nhóm I là $21,5 \pm 3,2$ (tuổi thấp nhất là 20, tuổi cao nhất là 29). BN thuộc nhóm II có tuổi trung bình là $32,5 \pm 2,2$ (tuổi thấp nhất là 30, tuổi cao nhất là 35). BN thuộc nhóm III có tuổi trung bình là $38,4 \pm 3,0$ (tuổi thấp nhất là 36, tuổi cao nhất là 42).

Thời gian vô sinh trung bình của các BN thuộc nhóm I là $3,3 \pm 2,3$ năm, thời gian ngắn nhất là 1 năm và nhiều nhất là 5 năm. Các BN thuộc nhóm II có thời gian vô sinh trung bình là $4,1 \pm 2,6$ năm, thời gian ngắn nhất là 1 năm và dài nhất là 7 năm. Các BN thuộc nhóm III có thời gian vô sinh trung bình là $4,8 \pm 3,4$ năm, thời gian ngắn nhất là 1 năm và dài nhất là 12 năm. Qua số liệu ta thấy, thời gian vô sinh của nhóm I là ngắn nhất và thời gian vô sinh của nhóm III là dài nhất.

Sự thay đổi hình thái của phôi sau sinh thiết

Hình thái phôi ở thời điểm 3 ngày tuổi trước sinh thiết: trước khi tiến hành sinh thiết, chúng tôi tiến hành đo các chỉ tiêu để làm cơ sở so sánh, đánh giá sự thay đổi đặc điểm hình thái của các phôi trước và sau sinh thiết. Các chỉ tiêu đánh giá lần lượt là: số lượng phôi bào, tỷ lệ mảnh vỡ bào tương, chiều dày màng trong suốt và đường kính phôi. Số lượng phôi bào trung bình của nhóm tuổi I, II, III lần lượt là $7,8 \pm 1,21$; $7,9 \pm 3,13$; $8,2 \pm 2,25$, độ dày màng trong suốt lớn nhất là $24,4 \mu\text{m}$ thuộc nhóm III, mỏng nhất là $7,2 \mu\text{m}$ thuộc nhóm II. Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương trung bình tương ứng của 3 nhóm là $6,21 \pm 1,23$; $5,63 \pm 1,31$; $6,82 \pm 1,27$. Chiều dày màng trong suốt được đo ngẫu nhiên ở 3 vị trí khác nhau, độ dày màng trong suốt trung bình của 3 nhóm I, II, III lần lượt là $15,70 \pm 3,14$; $16,20 \pm 2,22$; $16,60 \pm 2,42$. Đường kính phôi trung bình tương ứng 3 nhóm là $151,50 \pm 6,32$; $151,30 \pm 4,92$; $152,50 \pm 5,32 \mu\text{m}$. Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương cao nhất là 15%, phân bố nhiều nhất ở nhóm tuổi trên 35 và ít nhất ở nhóm tuổi dưới 30. Tuy vậy, sự khác biệt về số lượng phôi bào, tỷ lệ mảnh vỡ bào tương, độ dày màng trong suốt, đường

kính phôi giữa 3 nhóm tuổi không có ý nghĩa thống kê.

Phôi sau khi sinh thiết tiếp tục được nuôi trong tủ nuôi cấy Cook, sau sinh thiết lần lượt 24, 36 và 48 giờ chúng tôi lại tiến hành đo các chỉ tiêu: đường kính phôi, độ dày màng trong suốt, tỷ lệ phôi kết dính và tỷ lệ hình thành blastocyst ở mỗi nhóm tuổi để đánh giá sự phát triển của phôi sau sinh thiết.

Tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển và tỷ lệ phôi tạo blastocyst sau sinh thiết: sau sinh thiết 24 giờ, tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển chung của cả 3 nhóm là 93 trong tổng số 102 phôi, đạt 91,17% và của từng nhóm I, II và III là 93,93%; 92,31%; 86,66%. Đến ngày thứ 5, tỷ lệ hình thành blastocyst chung của cả 3 nhóm là 83 phôi trong tổng số 102 phôi, đạt 81,37% và của từng nhóm là 84,84%; 82,05%; 76,66%. Sự khác biệt giữa các nhóm I và II không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$, tuy nhiên sự khác biệt giữa các nhóm I so với III và II so với III có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Một số yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sống sót của phôi và tạo blastocyst

Tuổi của BN ảnh hưởng tới khả năng sống sót của phôi và tạo blastocyst: sau sinh thiết 24 giờ, tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển của từng nhóm BN là: 93,93% (nhóm I); 92,31% (nhóm II); 86,66% (nhóm III) và đến ngày thứ 5 tỷ lệ hình thành blastocyst là 84,84%; 82,05%; 76,66%. Sự khác biệt giữa các nhóm I và II không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$, tuy nhiên sự khác biệt giữa các nhóm I so với III và II so với III có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Thời gian vô sinh của BN ảnh hưởng tới khả năng sống sót của phôi và tạo blastocyst: trong tổng số 102 phôi được nghiên cứu có 58 BN vô sinh từ 1-5 năm (nhóm I), 29 BN vô sinh từ 5-10 năm (nhóm II) và 15 BN vô sinh trên 10 năm (nhóm III). Trong đó, tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển tương ứng là 91,13%; 93,10%; 86,66% và tỷ lệ phôi tạo blastocyst tương ứng là 84,48%; 82,76%; 66,66%. Sự khác biệt giữa các nhóm I và II không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$, tuy nhiên sự khác biệt giữa các nhóm I so với III và II so với III có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Nội tiết FSH (đơn vị đo IU/l) ngày 2 chu kỳ kinh của BN ảnh hưởng tới khả năng sống sót của phôi và tạo blastocyst: trong tổng số 102 phôi được nghiên cứu có 23 BN có chỉ số nội tiết FSH ngày 2 chu kỳ kinh $< 5 \text{ IU/l}$ (nhóm I), 72 BN FSH từ 5-10 IU/l (nhóm II) và 7 BN FSH trên 10 IU/l (nhóm III). Trong đó, tỷ lệ

phôi sống sót, tiếp tục phát triển tương ứng là 91,30; 91,67; 85,71% và tỷ lệ phôi tạo blastocyst tương ứng là 84,53; 83,33; 71,42%. Sự khác biệt giữa các nhóm I và II không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$, tuy nhiên sự khác biệt giữa các nhóm I so với III và II so với III có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Phương pháp sử dụng thuốc hormon kích thích ảnh hưởng tới khả năng sống sót của phôi và tạo blastocyst: trong tổng số 102 phôi được nghiên cứu có 53 BN sử dụng phác đồ ngắn (nhóm I), 21 BN sử dụng phác đồ dài (nhóm II) và 28 BN sử dụng phác đồ antagonist (nhóm III). Trong đó, tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển tương ứng là 92,45; 95,23; 85,71% và tỷ lệ phôi tạo blastocyst tương ứng là 84,90; 80,95; 75,00%. Sự khác biệt giữa các nhóm I và II không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$, tuy nhiên sự khác biệt giữa các nhóm I so với III và II so với III có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Phương pháp thụ tinh (IVF hoặc ICSI) ảnh hưởng tới khả năng sống sót của phôi và tạo blastocyst: trong tổng số 102 phôi được nghiên cứu có 26 bệnh nhân áp dụng phương pháp IVF, 76 bệnh nhân ICSI. Trong đó, tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển tương ứng là 88,46; 92,11 và tỷ lệ phôi tạo blastocyst tương ứng là 80,76; 81,57. Sự khác biệt giữa các nhóm không có ý nghĩa thống kê.

Bàn luận

Hình thái phôi trước và sau sinh thiết

Đối với phôi sinh thiết ngày 3: trong nghiên cứu, các phôi trước và sau sinh thiết đều được chia thành 4 độ dựa vào hình thái cấu trúc của phôi theo tiêu chuẩn đánh giá phôi của Salumets A (2001) [1]. Mặc dù bằng những nhận xét chủ quan nhưng lượng giá được số lượng tế bào của phôi, cấu trúc và tỷ lệ sống sót của phôi, đặc biệt là quan sát những mảnh vỡ bào tương, chúng tôi có thể đánh giá được độ phôi trước và sau sinh thiết, nhưng sự lượng giá cụ thể là cần thiết để phân độ phôi. Cho đến nay, đánh giá chất lượng phôi chủ yếu dựa vào các chỉ tiêu sau: số lượng tế bào, tỷ lệ các mảnh vỡ bào tương và sự đồng đều giữa các phôi bào. Nhiều nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng, những phôi có chất lượng tốt, có số phôi bào đồng đều, có ít mảnh vỡ bào tương thì ít hoặc không bị thay đổi hình thái sau khi sinh thiết, những phôi có tỷ lệ các mảnh vỡ bào tương càng cao thì tỷ lệ sống sau sinh thiết càng giảm [9]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, những phôi độ IV sau

sinh thiết còn nguyên vẹn 100%, phôi độ III sau sinh thiết chỉ còn nguyên vẹn là 72,2%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hershberger P.E và cs (2012) cho thấy tỷ lệ phôi phát triển không tăng khi tỷ lệ các mảnh vỡ bào tương trên 20% [9].

Một số yếu tố ảnh hưởng tới khả năng phôi sống sót và tạo blastocyst

Các tác giả thấy rằng, tuổi mẹ càng cao thì tỷ lệ thành công trong IVF càng thấp. Mặc dù khi chất lượng phôi đã đạt được độ III và độ IV, nhưng khi nghiên cứu trên khả năng phôi tiếp tục phát triển, tạo blastocyst của các phôi sau sinh thiết thì thấy giữa các nhóm vẫn có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Đối với thời gian vô sinh, phôi có tiếp tục phát triển hay không phần lớn phụ thuộc vào chất lượng của phôi ban đầu. Hình thái của phôi sau sinh thiết không phụ thuộc vào nguồn gốc của phôi từ người mẹ có thời gian vô sinh bao nhiêu năm mà phụ thuộc vào chất lượng của phôi trước sinh thiết, tuy nhiên trong nghiên cứu này thời gian vô sinh cũng ảnh hưởng tới khả năng sống sót và tạo blastocyst của phôi, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Munne S [10].

FSH cơ bản không ảnh hưởng nhiều tới hình thái phôi sau sinh thiết, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Munne và cs đã so sánh mối liên quan giữa hình thái phôi và nồng độ FSH để từ đó đánh giá mối liên quan giữa nồng độ FSH cơ bản với những biến đổi hình thái phôi trong quá trình phát triển của phôi sau sinh thiết. Tuy nhiên, đối với phụ nữ trên 35 tuổi nồng độ FSH cao, mặc dù hình thái phôi ít phụ thuộc vào nồng độ FSH, nhưng tăng nồng độ FSH liên quan đến giảm khả năng dự trữ buồng trứng và phù hợp với tỷ lệ có thai thấp ở nhóm BN này [11]. Kết quả giữa các phác đồ dùng thuốc cho thấy, sau khi sinh thiết các phôi tiếp tục phát triển và tạo blastocyst không phụ thuộc nhiều vào phôi có nguồn gốc từ BN dùng thuốc theo phác đồ nào, tuy nhiên đối với những BN tuổi cao, thời gian vô sinh kéo dài cũng ảnh hưởng tới khả năng tạo blastocyst, phù hợp với kết quả nghiên cứu của Munne và cs [10].

Walker M.C, Murphy K.E, Pan S (2004) nghiên cứu so sánh giữa phương pháp IVF và phương pháp ICSI thấy rằng, hình thái phôi tạo ra từ 2 phương pháp trên là như nhau [5]. Tuy nhiên, tỷ lệ NST bất thường cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm BN dùng phương pháp ICSI vì những BN này là người mang rối loạn về NST, có tinh trùng ít, yếu và dị dạng. Song khi phôi đã

đạt ở tiêu chuẩn phôi độ III và phôi độ IV thì không ảnh hưởng tới hình thái phôi trong quá trình phát triển sau sinh thiết [12].

Kết luận

Qua nghiên cứu hình thái 102 phôi sau sinh thiết để chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi, chúng tôi rút ra các kết luận sau:

Sinh thiết bằng tia laser không làm thay đổi hình thái phôi, khả năng sống sót và tạo thành phôi túi

Sau sinh thiết 24 giờ, tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển chung của cả 3 nhóm là 93/102 phôi, đạt 91,17% và đến ngày thứ 5 tỷ lệ hình thành phôi túi là 83 phôi, đạt 81,37%.

Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương, độ dày màng trong suốt, đường kính phôi giữa các nhóm thay đổi không có ý nghĩa thống kê.

Một số yếu tố ảnh hưởng tới khả năng phôi sống sót và tạo phôi túi sau sinh thiết

Tuổi mẹ, thời gian vô sinh, nồng độ FSH càng cao thì tỷ lệ phôi sống sót càng giảm.

Phác đồ sử dụng thuốc không ảnh hưởng tới tỷ lệ phôi sống sót.

Phương pháp thụ tinh IVF hoặc ICSI không ảnh hưởng tới tỷ lệ phôi sống sót, tiếp tục phát triển và tạo thành phôi túi sau sinh thiết.

Tài liệu tham khảo

[1] Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari A.M, Tiitinen A (2001), “The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality”, *Hum Reprod.*, **16(10)**, pp.2177-81.

[2] Nguyễn Viết Tiến (2012), *Dịch tễ học vô sinh và các phương pháp điều trị*, Nhà xuất bản Y học.

[3] Trương Đình Kiệt, Hồ Mạnh Tường (2011), *Thiết lập quy trình kỹ thuật trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ (PGD) các phôi TTON*, Báo cáo đề tài cấp thành phố, 4.2011.

[4] S Munne, et al (2002), “Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect”, *Reproductive BioMedicine Online*, **4(3)**, pp.123-130.

[5] Walker M.C, Murphy K.E, Pan S, Yang Q and Wen S.W (2004), “Adverse maternal outcomes in multifetal pregnancies”, *BJOG*, **111**, pp.1294-1296.

[6] Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J (1995), “Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities”, *Fertil Steril*, **64**, pp.382-391.

[7] Alikani M, Cohen J, et al (1999), “Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation”, *Fertil. Steril.*, **71**, pp.836-842.

[8] Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al (2003), “Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development”, *Hum Reprod Update*, **9**, pp.251-262.

[9] Hershterger P.E, Gallo A.M, Kavanaugh K (2012), “The decision-making process of genetically at-risk couples considering preimplantation genetic diagnosis: initial findings from a grounded theory study”, *Soc Sci Med.*, **74(10)**, pp.1536-43.

[10] Munne S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N (2007), “Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos”, *Reproductive Biomedicine Online*, **14**, pp.628-634.

[11] Nguyễn Thị Ngọc Phượng (2013), *Nội tiết sinh sản*, Nhà xuất bản Y học.

[12] Ederisinghe W.R, Murch A.R, Yovich J.L (1992), “Cytogenetic analysis of human oocytes and embryos in an in vitro fertilization program”, *Human Reproduction*, **7**, pp.230-236.

Nghiên cứu sản xuất mẫu chuẩn vi rút Rota cho kiểm định vắc xin Rotavin-M1

Lê Thị Luân^{1*}, Nguyễn Đăng Hiền¹, Trần Bích Hạnh¹
Nguyễn Thúy Hương¹, Lê Thu Nga¹, Nguyễn Thị Tươi¹, Nguyễn Thanh Huế¹
Nguyễn Thị Dáng Hương², Nguyễn Thị Lý³, Nguyễn Thị Yến³

¹Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

²Bộ Y tế

³Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

Ngày nhận bài 24.4.2015, ngày chuyển phản biện 4.5.2015, ngày nhận phản biện 5.6.2015, ngày chấp nhận đăng 8.6.2015

Qua nghiên cứu, Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã thiết lập được 987 ampul mẫu chuẩn nội bộ công hiệu vắc xin Rota với ký hiệu RR0213, 0,8 ml/ampul với hiệu giá 7,41 lg PFU/ml. Mẫu chuẩn sử dụng trong vòng 20-30 năm và được bảo quản ở -70°C. Loạt vắc xin mẫu chuẩn này có ý nghĩa thiết thực phục vụ cho công tác kiểm định vắc xin tại Trung tâm.

Từ khóa: vắc xin mẫu chuẩn, vắc xin Rota, vi rút Rota.

Chỉ số phân loại 3.3

RESEARCH INTO PRODUCING A STANDARD VACCINE FOR ROTAVIN-M1 QUALITY CONTROL

Summary

A Rota vaccine reference RR0213 has been established by Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals with 987 ampuls, 0.8 ml/ampul with the titer of 7.41 lg PFU/ml. They are kept at -70°C and can be usable in 20-30 years. This important standard vaccine is served for control quality of vaccines at the Center.

Keywords: Rota vaccine, Rotavin-M1, standard vaccine.

Classification number 3.3

Đặt vấn đề

Vắc xin mẫu chuẩn đóng vai trò không thể thiếu để thực hiện các thử nghiệm kiểm định theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới (WHO). Ở Việt Nam, nhu cầu sử dụng vắc xin mẫu chuẩn rất lớn. Mỗi năm, các phòng thử nghiệm vắc xin cần sử dụng hàng trăm lọ mẫu chuẩn cho một sản phẩm, trong khi đó Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế là cơ quan có thẩm quyền duy nhất được WHO cung cấp mẫu chuẩn với số lượng rất hạn chế, tối đa 5 lọ/năm. Các mẫu chuẩn này phải trải qua nhiều thủ tục nhập khẩu phức tạp, tốn kém, ngoài ra chất lượng mẫu chuẩn có thể bị ảnh hưởng bởi quá trình vận chuyển và bảo quản không đúng quy định khi lưu kho hải quan. Do đó, việc xây dựng mẫu chuẩn quốc gia là vô cùng cấp thiết. Tuy nhiên, mẫu chuẩn quốc gia hiện nay chưa có, do vậy việc nghiên cứu quy trình tạo mẫu chuẩn địa phương là vô cùng quan trọng và cấp bách. Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã sản xuất được vắc xin Rotavin-M1, do vậy mục tiêu của nghiên cứu này là thiết lập mẫu chuẩn công hiệu nội bộ vắc xin Rota phục vụ cho kiểm định vắc xin tại Trung tâm.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Sử dụng chủng G1P [1], tế bào vero, các loại môi trường đủ cho sản xuất 3 loạt vi rút, 3 loạt này bảo quản ở -60°C. 3

*Tác giả chính

loại được kiểm tra vô trùng, hiệu giá vi rút, pH và cảm quan, nếu kết quả đạt theo yêu cầu sẽ được chọn làm ứng cử viên mẫu chuẩn công hiệu, ứng cử viên này sẽ được kiểm tra 15 lần hiệu giá, mỗi lần 5 mẫu để xác định hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn. Sau đó, ứng cử viên được đóng vào vào ampul với dung tích 0,8 ml/ampul, tổng ampul tối thiểu là 900 cho mỗi ứng cử viên. Các ứng cử viên được bảo quản ở -60°C và được lấy mẫu ngẫu nhiên, kiểm tra 15 ampul ngẫu nhiên (>1%), thực hiện 3 lần, mỗi lần 5 ampul khác nhau, kiểm tra cùng một thời điểm với các thông số như hiệu giá vi rút, vô trùng, pH, cảm quan. Ứng cử viên được lựa chọn làm mẫu chuẩn khi đủ các điều kiện: không nhiễm vi khuẩn, nấm và Mycoplasma; pH: 6,5-8,5; dung dịch có màu hồng trong suốt; hàm lượng vi rút Rota trong ứng cử viên mẫu chuẩn $\geq 10^6$ PFU/ml với độ lệch chuẩn (SD), khoảng dao động $\pm 2SD$ và lựa chọn ứng cử viên làm mẫu chuẩn nếu $SD \leq 0,25$. Sau khi mẫu chuẩn đã được xác định, dùng mẫu chuẩn trong kiểm định vắc xin và phân tích các kết quả thu được.

Kết quả

Kết quả kiểm tra các ứng cử viên mẫu chuẩn được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1: kết quả kiểm tra các ứng cử viên mẫu chuẩn

Tên ứng cử viên mẫu chuẩn	Số lượng ampul	Kết quả			
		Hiệu giá lg PFU/ml	Vi khuẩn, nấm	pH	Cảm quan
RR0113	1219	6,68	Âm tính	7,39	Đạt
RR0213	987	7,41	Âm tính	7,22	Đạt
RR0313	1125	6,21	Âm tính	7,20	Đạt

Bảng 1 cho thấy, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113, RR0213 và RR0313 đều đạt các chỉ số quy định về vi khuẩn, nấm, pH, cảm quan và hiệu giá. Không có mẫu nào nhiễm vi khuẩn hoặc nấm; pH cả 3 ứng cử viên trong dải từ 7,20 tới 7,39; hiệu giá vi rút từ 6,21 đến 7,41 lg PFU/ml.

Hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113 được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: xác định hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113

Lần thử nghiệm	Hiệu giá trung bình (lg PFU/ml)	Vi khuẩn, nấm	pH	Cảm quan
1	6,79 $\pm$ 0,11	Âm tính	7,37	Đạt
2	6,79 $\pm$ 0,10	Âm tính	7,35	Đạt
3	6,72 $\pm$ 0,16	Âm tính	7,40	Đạt
4	6,63 $\pm$ 0,17	Âm tính	7,35	Đạt
5	6,62 $\pm$ 0,18	Âm tính	7,31	Đạt
6	6,57 $\pm$ 0,17	Âm tính	7,40	Đạt
7	6,54 $\pm$ 0,19	Âm tính	7,32	Đạt
8	6,63 $\pm$ 0,16	Âm tính	7,37	Đạt
9	6,84 $\pm$ 0,11	Âm tính	7,33	Đạt
10	6,67 $\pm$ 0,14	Âm tính	7,35	Đạt
11	6,65 $\pm$ 0,15	Âm tính	7,39	Đạt
12	6,58 $\pm$ 0,13	Âm tính	7,32	Đạt
13	6,65 $\pm$ 0,16	Âm tính	7,40	Đạt
14	6,64 $\pm$ 0,14	Âm tính	7,38	Đạt
15	6,66 $\pm$ 0,14	Âm tính	7,36	Đạt
16	6,82 $\pm$ 0,15	Âm tính	7,34	Đạt
TB	6,68 $\pm$ 0,09 (6,49-6,87)			

Bảng 2 cho thấy, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113 sau 15 lần kiểm tra, mỗi lần kiểm tra 5 mẫu ngẫu nhiên, riêng rẽ, kết quả không mẫu nào bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm, pH trong dải 7,31-7,40; nồng độ vi rút từ 6,54 $\pm$ 0,19 đến 6,84 $\pm$ 0,11 lg PFU/ml, SD đều <0,25; nồng độ vi rút trung bình 6,68 $\pm$ 0,09 lg PFU/ml. Ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113 được phê chuẩn làm vắc xin mẫu chuẩn khi thử nghiệm xác định tính đồng nhất khi hiệu giá dao động từ 6,49-6,87 lg PFU/ml.

Kết quả xác định tính đồng nhất về hiệu giá mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0113 được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: kết quả xác định tính đồng nhất về hiệu giá mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0113

Lần thử nghiệm	Ampul									
	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)
1	1	6,62	2	6,7	3	6,74	4	6,68	5	6,76
2	6	6,68	7	6,85	8	6,73	9	6,85	10	7,01
3	11	7,11	12	6,99	13	6,91	14	6,85	15	6,9

Bảng 3 là kết quả thử nghiệm xác định tính đồng nhất trong các ampul vắc xin mẫu chuẩn. Thử nghiệm

này được tiến hành 3 lần, mỗi lần 5 ampul ngẫu nhiên trong 1219 ampul vắc xin mẫu chuẩn loạt RR0113 (1,3%), kết quả cho thấy, ở lần thử nghiệm thứ nhất cả 5 ampul đều đạt hiệu giá trong khoảng 6,49-6,87 lg PFU/ml. Nhưng tới lần 2, 1/5 ampul hiệu giá không trong giới hạn cho phép. Đặc biệt ở lần 3, 4/5 ampul hiệu giá nằm ra ngoài giới hạn cho phép. Điều này chứng tỏ vắc xin mẫu chuẩn loạt RR0113 không đồng nhất trong các ampul, không được sử dụng làm mẫu chuẩn cho thử nghiệm công hiệu vắc xin.

Kết quả thử nghiệm về tính ổn định hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0213 được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4: kết quả xác định tính ổn định hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0213

Lần thử nghiệm	Hiệu giá trung bình (lg PFU/ml)	Vi khuẩn, nấm	pH	Cảm quan
1	7,40±0,05	Âm tính	7,23	Đạt
2	7,40±0,05	Âm tính	7,22	Đạt
3	7,30±0,12	Âm tính	7,22	Đạt
4	7,26±0,13	Âm tính	7,24	Đạt
5	7,36±0,11	Âm tính	7,25	Đạt
6	7,35±0,16	Âm tính	7,23	Đạt
7	7,42±0,11	Âm tính	7,21	Đạt
8	7,33±0,12	Âm tính	7,20	Đạt
9	7,45±0,14	Âm tính	7,20	Đạt
10	7,52±0,11	Âm tính	7,24	Đạt
11	7,48±0,13	Âm tính	7,26	Đạt
12	7,40±0,09	Âm tính	7,23	Đạt
13	7,48±0,13	Âm tính	7,25	Đạt
14	7,49±0,16	Âm tính	7,24	Đạt
15	7,48±0,08	Âm tính	7,21	Đạt
16	7,49±0,11	Âm tính	7,22	Đạt
TB	7,41±0,08 (7,25-7,57)			

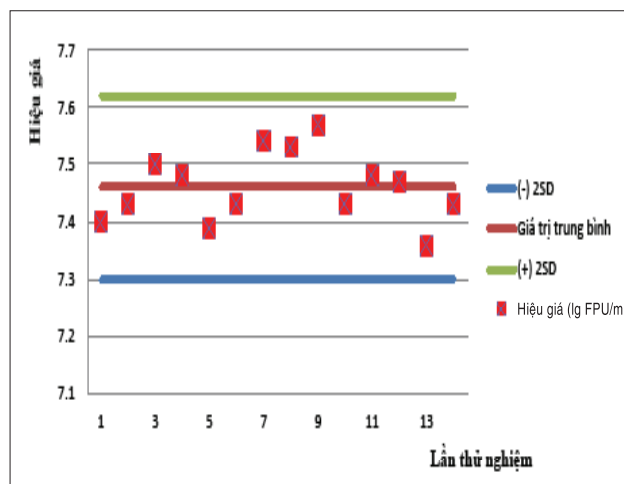
Bảng 4 cho thấy, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0213 sau 15 lần kiểm tra, mỗi lần kiểm tra 5 mẫu ngẫu nhiên, riêng rẽ, kết quả không mẫu nào bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm, pH trong dải 7,20-7,26; nồng độ vi rút từ 7,30±0,12 đến 7,52±0,11 lg PFU/ml, SD đều nhỏ hơn 0,25; nồng độ vi rút trung bình 7,41±0,08 lg PFU/ml. Với kết quả này, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0213 được phê chuẩn làm vắc xin mẫu chuẩn khi thử nghiệm xác định tính đồng nhất khi hiệu giá dao động từ 7,25-7,57 lg PFU/ml.

Kết quả xác định tính đồng nhất về hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0213 được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5: kết quả xác định tính đồng nhất về hiệu giá của ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0213

Lần thử nghiệm	Ampul									
	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)	Số	Hiệu giá (lg PFU/ml)
1	1	7,48	2	7,37	3	7,42	4	7,36	5	7,47
2	6	7,36	7	7,34	8	7,49	9	7,46	10	7,43
3	11	7,44	12	7,38	13	7,43	14	7,4	15	7,41

Thử nghiệm xác định tính đồng nhất trong các ampul vắc xin mẫu chuẩn được tiến hành 3 lần, mỗi lần 5 ampul ngẫu nhiên trong 987 ampul vắc xin mẫu chuẩn loạt RR0113 (1,5%), kết quả cho thấy cả 3 lần thử nghiệm 15/15 ampul đều đạt hiệu giá trong khoảng 7,25-7,57 lg PFU/ml. Điều này chứng tỏ vắc xin mẫu chuẩn loạt RR0213 đồng nhất trong các ampul, được sử dụng làm mẫu chuẩn cho thử nghiệm công hiệu vắc xin Rota. Khi sử dụng mẫu chuẩn trong thử nghiệm công hiệu của vắc xin Rotavin-M1 hoặc các thử nghiệm liên quan đến hiệu giá vắc xin Rota, nếu vắc xin mẫu chuẩn có hiệu giá từ 7,25-7,57 lg PFU/ml thì kết quả của mẫu thử nghiệm được chấp nhận.



Hình 1: hiệu giá mẫu chuẩn RR0213 sử dụng trong kiểm định vắc xin

Hình 1 cho thấy, sử dụng vắc xin mẫu chuẩn RR0213 trong 14 lần kiểm tra hiệu giá vắc xin Rotavin-M1, vắc xin được chấp nhận hiệu giá vì mẫu chuẩn nằm trong giới hạn quy định 7,25-7,57 lg PFU/ml.

Kết quả xác định hiệu giá ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0311 được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6: kết quả xác định hiệu giá ứng cử viên mẫu chuẩn vắc xin Rota RR0311

Lần thử nghiệm	Hiệu giá trung bình (lg PFU/ml)	Vi khuẩn, nấm	pH	Cảm quan
1	6,13±0,26	Âm tính	7,20	Đạt
2	6,00±0,22	Âm tính	7,18	Đạt
3	6,15±0,13	Âm tính	7,20	Đạt
4	6,13±0,16	Âm tính	7,21	Đạt
5	6,26±0,16	Âm tính	7,19	Đạt
6	6,06±0,15	Âm tính	7,19	Đạt
7	6,26±0,13	Âm tính	7,21	Đạt
8	5,71±0,27	Âm tính	7,20	Đạt
9	6,33±0,06	Âm tính	7,22	Đạt
10	6,53±0,17	Âm tính	7,18	Đạt
11	6,19±0,24	Âm tính	7,21	Đạt
12	6,32±0,09	Âm tính	7,22	Đạt
13	6,31±0,18	Âm tính	7,23	Đạt
14	6,25±0,10	Âm tính	7,17	Đạt
15	6,50±0,13	Âm tính	7,18	Đạt
16	6,26±0,16	Âm tính	7,18	Đạt
TB	6,21±0,19 (6,02-6,40)			

Bảng 6 cho thấy, ứng cử viên mẫu chuẩn RR0313 sau 15 lần kiểm tra, mỗi lần kiểm tra 5 mẫu ngẫu nhiên, riêng rẽ, kết quả không mẫu nào bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm, pH trong dải 7,17-7,23; nồng độ vi rút từ 5,71±0,27 đến 6,53±0,17 lg PFU/ml nhưng 2/15 lần thử nghiệm SD cao hơn 0,25 nên ứng cử viên này không được phê chuẩn làm vắc xin mẫu chuẩn.

Bàn luận

Theo hướng dẫn của WHO về xây dựng các sinh phẩm chuẩn [1-4], Trung tâm Nghiên cứu, Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã thiết lập được một số mẫu chuẩn [5-7], trong đó có mẫu chuẩn nội bộ về công hiệu vắc xin Rota với ký hiệu RR0213 từ 3 ứng cử viên mẫu chuẩn RR0113, RR0213 và RR0313.

Bản chất, nguồn gốc và bảo quản mẫu chuẩn nội bộ RR0213: thành phần của vật liệu sử dụng làm mẫu chuẩn nội bộ giống thành phần của mẫu thử. Mẫu chuẩn có độ ổn định cao, có hoạt tính đặc hiệu phù hợp và tính đồng nhất. Với lượng mẫu chuẩn 987 ampul bảo quản tại nhiệt độ -70°C, lượng mẫu chuẩn này có thể đủ sử dụng trong 20-30 năm. RR0213 đạt được những tiêu chuẩn phù hợp cho mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn được lấy một phần mẻ bán thành phẩm được trộn thật kỹ nên đạt được tính đồng nhất. Lượng mẫu chuẩn trong một ampul có thể thực hiện được ít nhất 2 lần

thử nghiệm. Mẫu chuẩn ở dạng dung dịch và được bảo quản tại nhiệt độ -70°C nên có độ ổn định cao. Ampul đựng mẫu có độ bền vững để chịu được các điều kiện bảo quản nhiệt độ dưới -70°C nên không ảnh hưởng đến sản phẩm trong quá trình bảo quản lâu dài. Mẫu chuẩn RR0213 đều đạt tất cả các yêu cầu của một mẫu chuẩn [1-4].

RR0213 là mẫu chuẩn công hiệu vắc xin Rota duy nhất tại nước ta, hiện nay Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm cũng chưa được cung cấp mẫu chuẩn quốc tế cho hiệu chuẩn mẫu chuẩn quốc gia và nội bộ. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã dựa vào công hiệu của chủng sản xuất vắc xin Rotavin-M1 để hiệu chỉnh mẫu chuẩn nội này. Mẫu chuẩn này có hiệu giá 7,41 lg PFU/ml, khi sử dụng mẫu chuẩn tại các phòng thí nghiệm khác, kết quả mẫu thử được xác định khi hiệu giá mẫu chuẩn trong thử nghiệm đạt 7,41±0,5 lg PFU/ml.

Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập được loạt vắc xin mẫu chuẩn RR0213 từ 3 ứng cử viên: RR0113, RR0213 và RR0313. Mẫu chuẩn RR0213 đạt tất cả các chỉ tiêu về vắc xin mẫu chuẩn. Hiệu giá vắc xin mẫu chuẩn này là 7,41.

Tài liệu tham khảo

- [1] WHO Consultation on Recommendation for the Preparation (2004), *Characterization, and Establishment of WHO International Standards and Other Biological Reference Material*, Geneva, World Health Organization, 2004 (QSB/IVB/WHO).
- [2] WHO Expert Committee on Biological Standardization: TRS 962.
- [3] WHO Expert Committee on Biological Standardization: TRS 963.
- [4] WHO Technical Report Series (revised 2004), *Recommendation for the preparation, characterization, and establishment of international and other biological reference standards*, Annex 2, No 932.2006, pp.74-127.
- [5] Viện Vắc xin và Các chế phẩm sinh học (1999), *Nghiên cứu sản xuất vắc xin mẫu chuẩn quốc gia bạch hầu, ho gà, uốn ván*.
- [6] Lê Thu Nga, Lê Thị Luân, Nguyễn Đăng Hiền, Ngô Thu Hoàng, Ngô Thị Thanh Hương (2013), “Chất lượng mẫu chuẩn vắc xin sởi dự tuyển sản xuất tại POLYVAC”, *Tạp chí Y học dự phòng*, 12(148), tr.97-102.
- [7] Hoàng Thị Liên (2000), “Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn hiệu lực cho mẫu chuẩn quốc gia vắc xin uống phòng bệnh bại liệt”, *Luận án Tiến sĩ Y học*.

Ảnh hưởng của thời gian và số lần cấy chuyển đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh

Vũ Tuấn Anh*, Chủ Văn Mến

Học viện Quân y

Ngày nhận bài 20.4.2015, ngày chuyển phản biện 27.4.2015, ngày nhận phản biện 5.6.2015, ngày chấp nhận đăng 10.6.2015

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và số lần cấy chuyển tới sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của sinh khối sâm Ngọc Linh trên hệ thống bioreactor 30 lít đã được xác định. Với môi trường MS bổ sung NAA = 1,5 mg/l; kinetin = 0,1 mg/l; đường = 30,0 g/l, pH = 5,6-5,8; nhiệt độ nuôi cấy là 24-26°C, không có ánh sáng, tốc độ cánh khuấy là 50 vòng/phút, thời gian nuôi cấy tối ưu trên bioreactor 30 lít là 24 ngày, khối lượng tế bào thu được là 31,24 g/l và khối lượng saponin toàn phần đạt 24,97 mg/g tế bào khô. Sau lần cấy chuyển thứ 2, tế bào cần được chuyển sang môi trường mới ở quy mô cao hơn để đảm bảo tốc độ phát triển tối ưu.

Từ khóa: hoạt chất, số lần cấy chuyển, tế bào sâm Ngọc Linh, thời gian nuôi cấy.

Chỉ số phân loại 3.4

THE EFFECTS OF CULTIVATION TIME AND NUMBER OF TRANSPLANTATIONS IN 30-LITER BIOREACTOR SYSTEM ON THE GROWTH AND BIOACTIVE CONTENT OF PANAX VIETNAMENSIS CELLMASS

Summary

In this study, the effects of cultivation time and number of transplantations in 30-liter bioreactor system on the growth and bioactive content of *Panax vietnamensis* cell mass have been evaluated. The medium composition includes: MS liquid medium supplemented with NAA 1.5 mg/l, kinetin 0.1 mg/l, saccharose 30.0 g/l, pH of 5.6-5.8 at temperature of 24-26°C, speed at 50 rpm, and culture time as variable. The results have shown that: the optimal culture time is 24 days; the cell mass is 31.24 g/l; and total saponin content is 24.97 mg/g dry weight. After the second transplantation, the cells need to be transferred to new and bigger system to get optimal growth and bioactive content.

Keywords: bioactive, cultivation time, number of transplantations, *Panax vietnamensis* cellmass.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae), chủ yếu mọc ở vùng núi Ngọc Linh thuộc hai huyện Đắc Tô (Kon Tum) và Trà My (Quảng Nam). Sâm Ngọc Linh là cây thuốc có nhiều tác dụng sinh học như: bổ dưỡng, tăng lực, chống oxy hóa, chống lão hóa và bảo vệ gan... nên đã bị khai thác kiệt quệ trong tự nhiên [1, 2].

Từ năm 2007, Học viện Quân y đã phối hợp với một số đơn vị trong và ngoài nước thực hiện các đề tài nghiên cứu về nuôi cấy, sản xuất sâm Ngọc Linh sinh khối và các chế phẩm liên quan [3-5]. Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu đã thực hiện, Bộ Khoa học và Công nghệ đã đồng ý cho Học viện Quân y thực hiện dự án sản xuất thử nghiệm cấp nhà nước: “Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất sâm Ngọc Linh sinh khối và chế phẩm tăng lực Vinatonic”. Để thực hiện dự án này, việc nghiên cứu xây dựng quy trình nuôi cấy sâm Ngọc Linh quy mô 30 lít/mẻ rất quan trọng, bởi đây là giai đoạn trung gian tạo giống cấp 2 cho các bước nuôi cấy tiếp theo. Trong bài viết này, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và số lần cấy chuyển tới sự phát triển và hàm lượng hoạt chất trong sinh khối sâm Ngọc Linh quy mô 30 lít/mẻ.

*Tác giả chính: Email: tuananhbt15@yahoo.com

Thực nghiệm

Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Thiết bị: tủ cấy vi sinh - an toàn cấp 2 NU-440-400E, máy lắc Orbital shaker, tủ ẩm có lắc dung tích lớn ISF4-W, Bioreactor 30 lít Biostat C200 (Đức).

- Hóa chất: myo-inositol, acid nicotinic, glycin, pyridoxin hydroclorid, thiamin hydroclorid, kinetin, glucose, sucrose, acid 2,4-dichloro phenoxy acetic, kali nitrat, amoni nitrat, magnesi sulfat, kali dihydro phosphat và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn nuôi cấy.

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: đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 30 lít: pha 25 lít môi trường MS, bổ sung thêm NAA 1,5 mg/l, kinetin 0,1 mg/l và saccharose 30 g/l, pH môi trường = 5,8. Hấp diệt khuẩn ở 121°C/25'. Cấy vào bioreactor lượng tế bào theo tỷ lệ 80 g tế bào sâm/lít môi trường. Nuôi cấy tế bào ở điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 24-26°C, độ ẩm 50-60% và tốc độ cánh khuấy là 50 vòng/phút. Vào các ngày nuôi cấy thứ 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 tiến hành thu hoạch tế bào. Cân xác định khối lượng tế bào sâm tươi và khối lượng tế bào khô (sấy khô tế bào sâm ở 45-50°C đến khối lượng không đổi). Quy đổi số gam tế bào trong 1 lít môi trường.

Các chỉ tiêu đánh giá:

- Tốc độ phát triển của tế bào theo thời gian dựa trên các chỉ tiêu: khối lượng tế bào tươi, khối lượng tế bào khô và tỷ lệ sinh trưởng.

- Khả năng thích nghi của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 30 lít: xác định sau bao nhiêu lần cấy chuyển thì tế bào sâm Ngọc Linh thích nghi với môi trường nuôi cấy trong bioreactor 30 lít.

Kết quả và bàn luận

Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh

Chọn môi trường lỏng MS có bổ sung NAA 1,5 mg/l, kinetin 0,1 mg/l và 30 g/l saccharose. Sau ngày thứ 4, 8, 12, 16, 20, 24 và 28, thu hoạch tế bào. Sấy khô và cân xác định khối lượng tế bào cũng như định lượng hàm lượng saponin. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hàm lượng saponin toàn phần của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 30 lít

Thời gian nuôi cấy (ngày)		Khối lượng tế bào khô (g/l)	Khối lượng saponin (mg/g)
4	(1)	7,12±0,73	20,17±2,23
8	(2)	11,36±1,26	20,34±2,28
12	(3)	15,33±1,72	22,14±2,69
16	(4)	20,44±2,48	17,17±2,07
20	(5)	27,26±3,06	18,07±2,23
24	(6)	31,24±3,79	24,97±2,66
28	(7)	29,53±3,56	21,34±2,25

Kết quả thực nghiệm ở bảng 1 cho thấy, không có sự khác biệt giữa kết quả sau các lần thu hoạch tế bào ở các ngày theo kế hoạch nghiên cứu. Khi nuôi tế bào ở môi trường đã được tối ưu, sau 24 ngày khối lượng tế bào khô thu được là 31,24 g/l và khối lượng saponin toàn phần đạt cao nhất là 24,97 mg/g tế bào khô. Kết quả nghiên cứu thu được chỉ ra rằng, hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 30 lít thay đổi không đáng kể so với thời gian nuôi cấy 28 ngày.

Ảnh hưởng của số lần cấy chuyển trong bioreactor 30 lít đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh

Khi nuôi cấy ở quy mô càng lớn thì lượng tế bào ban đầu cho vào càng cao, do vậy mà khả năng cạnh tranh môi trường dinh dưỡng càng lớn. Cần khảo sát mức độ thích nghi và số lần cấy chuyển tế bào ở quy mô này để có được sinh khối tế bào khi thu hoạch đạt số lượng lớn nhất và chất lượng cao nhất. Tiến hành nuôi cấy tế bào sâm Ngọc Linh theo đúng quy trình như đã trình bày trong các nội dung nghiên cứu trước, theo dõi sự phát triển, đến thời điểm thu hoạch sinh khối tế bào tiến hành cân khối lượng tươi và khô. Xác định hàm lượng saponin toàn phần bằng phương pháp cân. Kết quả đánh giá khả năng thích nghi tế bào với điều kiện nuôi cấy trên môi trường lỏng trong bioreactor 30 lít bằng cách cấy chuyển tế bào nhiều lần trên cùng loại môi trường được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: tỷ lệ sinh trưởng của tế bào sâm Ngọc Linh sau các lần cấy chuyển

Lần cấy chuyển	N	Khối lượng tế bào sâm (g/l)		Tỷ lệ sinh trưởng (lần)	Hàm lượng saponin (%)
		Khối lượng tươi	Khối lượng khô		
Lần 1	10	440,8±9,63	31,30±1,21	4,51±0,10	2,14±0,24
Lần 2	10	442,4±10,21	30,97±1,03	4,53±0,13	2,12±0,21
Lần 3	10	425,6±8,56	29,80±0,97	4,32±0,15	2,15±0,24
Lần 4	10	409,6±7,48	28,67±0,85	4,12±0,11	2,19±0,22
P		$p_{4-1, 4-2, 4-3, 3-1, 3-2} < 0,05; p_{3-4} > 0,05$			

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, ở lần cấy chuyển thứ 2, tốc độ phát triển của tế bào đạt cao nhất là $4,53 \pm 0,13$ lần; ở lần cấy chuyển thứ 3, tốc độ phát triển của tế bào có xu hướng giảm đi so với các lần trước ($4,32 \pm 0,15$ lần) và tiếp tục giảm ở lần cấy chuyển thứ 4 ($4,12 \pm 0,11$ lần). Các tế bào sau lần cấy chuyển thứ 4 không còn liên kết với nhau nữa, hình thái các tế bào sáng, màng tế bào mỏng. Tuy nhiên, tốc độ phát triển của tế bào ở lần cấy chuyển thứ 4 tiếp tục giảm so với lần cấy chuyển thứ 3, điều đó chứng tỏ qua các lần cấy chuyển ở các môi trường thạch khi nuôi cấy trong bình tam giác, trong môi trường lỏng ở các quy mô khác nhau các tế bào có xu hướng già đi và thoái hóa. Do vậy, đến lần cấy chuyển thứ 2 cần phải chuyển tế bào sang môi trường mới ở quy mô lớn hơn hoặc tiếp tục cấy chuyển ở quy mô đó đến lần cấy chuyển 4 và tiến hành thu hoạch sinh khối tế bào.

Theo kết quả ở bảng 2, sau lần cấy chuyển thứ 4, khi định lượng hàm lượng saponin chúng tôi thấy rằng, không có sự khác biệt rõ ràng ở hàm lượng saponin

toàn phần giữa lần cấy chuyển thứ 1, 2, 3 và lần cấy chuyển thứ 4, do vậy có thể kết luận rằng số lần cấy chuyển không ảnh hưởng lớn tới hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh khi không bổ sung elicitor.

Kết luận

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và số lần cấy chuyển tới sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của sinh khối sâm Ngọc Linh trên hệ thống bioreactor 30 lít đã được xác định. Với môi trường MS bổ sung NAA = 1,5 mg/l, kinetin = 0,1 mg/l, đường = 30,0 g/l, pH = 5,6-5,8, nhiệt độ nuôi cấy là 24-26°C, không có ánh sáng, tốc độ cánh khuấy là 50 vòng/phút, thời gian nuôi cấy tối ưu trên bioreactor 30 lít là 24 ngày, khối lượng tế bào thu được là 31,24 g/l và khối lượng saponin toàn phần đạt 24,97 mg/g tế bào khô. Sau lần cấy chuyển thứ 2, tế bào cần được chuyển sang môi trường mới ở quy mô cao hơn để đảm bảo tốc độ phát triển tối ưu.

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.
- [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 cộng sự (2009), *Phương pháp sản xuất sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh*, Bằng độc quyền sáng chế.
- [5] Nguyễn Văn Long và cộng sự (2010), *Nghiên cứu bào chế nước tăng lực Vinatonic phục vụ sức khỏe cộng đồng*, đề tài cấp Bộ Quốc phòng.

Phân tích nhiệt vi sai hoạt chất Paclitaxel với các tá dược lipid

Trương Công Trị^{1*}, Đặng Thanh Long¹, Hà Diệu Ly²,
Nguyễn Quang Trị³, Nguyễn Lan Chi³, Dương Chí Toàn³

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

²Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh

³Công ty cổ phần Dược Danapha - Nanosome

Ngày nhận bài 5.5.2015, ngày chuyển phản biện 8.5.2015, ngày nhận phản biện 12.6.2015, ngày chấp nhận đăng 15.6.2015

Trong nghiên cứu này, các tác giả khảo sát và đánh giá tương tác trên biểu đồ phân tích nhiệt vi sai DSC của hoạt chất Paclitaxel với các tá dược Phospholipon 90G và Montanox 80 PPI với mục tiêu khảo sát tính chất hóa lý của hoạt chất, tương tác hoạt chất - tá dược trước khi thiết lập công thức và xây dựng quy trình bào chế hệ phân tán nanoliposome Paclitaxel. Qua biểu đồ nhiệt DSC cho thấy, có sự tương tác giữa hoạt chất và hỗn hợp tá dược phospholipid - polyoxylglycerid, Paclitaxel hòa tan hoàn toàn trong các hỗn hợp tá dược ở tỷ lệ hoạt chất - tá dược (1:10, kl/kl). Các tương tác vật lý này ổn định sau 2 tuần bảo quản ở nhiệt độ thường. Kết quả khảo sát nhiệt vi sai DSC sẽ góp phần theo dõi tương tác vật lý được chất - tá dược trong thiết kế phát triển các hệ phân tán nanoliposome trên nền tảng tá dược phospholipid - polyoxylglycerid.

Từ khóa: Paclitaxel, phân tích nhiệt vi sai, tá dược lipid.

Chỉ số phân loại 3.4

DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY OF PACLITAXEL WITH LIPID EXCIPIENTS

Summary

In this study, the DSC thermal curves of Paclitaxel and its mixture with Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI were performed to understand their interactions. Differential thermal analysis of samples were carried out using DSC Q20 (TA Instrument, USA) with a temperature range from 20°C to 350°C at the heating rate of 2°C to 15°C/min. This study showed that Paclitaxel existed at least two polymorphs by total signal pics of Paclitaxel on DSC thermal curves at the heating rate of 10°C/min. The DSC thermal curves of interactions among API - excipients demonstrated that Paclitaxel existed the completely soluble form in the mixture with Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI at the ratio of API - excipients (1:10, w/w). After two-week storage at room temperature, these interactions of API - excipients were still stable. The DSC curves of API - excipients showed that Paclitaxel interacted strongly with the mixture of Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI.

Keywords: differential scanning calorimetry, lipid excipients, Paclitaxel.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Paclitaxel là một trong các hoạt chất hiện đang được sử dụng rộng rãi trong các phác đồ điều trị nhiều bệnh ung thư như: ung thư biểu mô buồng trứng, ung thư vú, đầu, cổ và ung thư phổi [1, 2]. Tuy nhiên, Paclitaxel có nhiều tác dụng phụ, độc tính cao, rất kém bền, kém tan trong môi trường nước (<10 µg/ml) và tính thấm thấp nên giới hạn khả năng trị liệu của thuốc [3, 4]. Nang hóa Paclitaxel vào trong các giá mang liposome là một trong những hướng nghiên cứu đang được phát triển nhiều trên thế giới nhằm khắc phục những hạn chế trong trị liệu của Paclitaxel. Việc phát triển các thuốc nanoliposome Paclitaxel trên nền tảng các tá dược phospholipid và polyoxylglycerid đã và đang được quan tâm nghiên cứu trên thế giới [4-6]. Tại nước ta, hướng nghiên cứu nanoliposome chỉ mới được tiếp cận trong những năm gần đây. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả khảo sát và đánh giá tương tác trên biểu đồ nhiệt DSC của hoạt chất Paclitaxel với các tá dược Phospholipon 90G và Montanox 80

*Tác giả chính: Email: congtri1606@gmail.com

PPI với mục tiêu khảo sát tính chất hóa lý của hoạt chất, tương tác hoạt chất - tá dược trước khi thiết lập công thức và xây dựng quy trình bào chế hệ phân tán nanoliposome Paclitaxel.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Paclitaxel (99,9%) được cung cấp từ Fujian South Pharmaceutical, Trung Quốc; Phospholipon 90G được cung cấp từ Lipoid GMBH, Thụy Sĩ; Montanox 80 PPI được cung cấp từ SEPPIC, Pháp; các dung môi, hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn dược dụng của nhà sản xuất.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu khảo sát: cân các mẫu nguyên liệu (dược chất và tá dược). Hòa tan nguyên liệu trong ethanol. Làm bay hơi hoàn toàn ethanol qua hệ thống cô quay dưới áp suất giảm (Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik, Thụy Sĩ) ở nhiệt độ 50°C. Sấy khô mẫu khảo sát trong tủ sấy chân không (SL 1430D, Sheldon Manufacturing, Inc, Mỹ) ở nhiệt độ 45°C trong vòng 24 giờ.

Phân tích nhiệt vi sai: tiến hành phân tích nhiệt vi sai (DSC) trên thiết bị DSC Q20 (TA Instrument, Mỹ) với bộ chén - nắp Aluminum Tzero (chứa lượng mẫu khảo sát tối đa 3 mg). Mẫu khảo sát cân vào chén trên cân phân tích có độ chính xác 0,001 mg (Mettler Toledo, Thụy Sĩ). Tốc độ dòng khí nitơ là 50 ml/phút. Tiến trình nhiệt được cài đặt ở tốc độ nhiệt phù hợp với khoảng nhiệt độ khảo sát từ 20 đến 350°C. Thiết bị được hiệu chuẩn bằng indium chuẩn trước khi tiến hành khảo sát. Khảo sát DSC đối với các mẫu hoạt chất Paclitaxel (trước và sau khi xử lý qua ethanol), mẫu khảo sát tương tác hoạt chất - tá dược ở các tỷ lệ và mẫu khảo sát tương tác sau 2 tuần bảo quản ở nhiệt độ phòng.

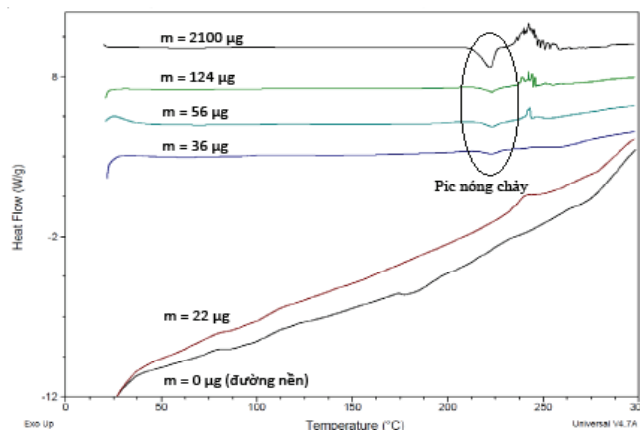
Kết quả và bàn luận

Phân tích nhiệt vi sai trên dược chất Paclitaxel

Chọn tốc độ nhiệt cho tiến trình DSC: khảo sát các tốc độ nhiệt 2°C/phút, 5°C/phút, 10°C/phút và 15°C/phút để lựa chọn tốc độ nhiệt tối ưu đối với Paclitaxel. Biểu đồ nhiệt ghi nhận được thể hiện có sự khác biệt ở các tốc độ khác nhau khi khảo sát trên mẫu Paclitaxel. Biểu đồ nhiệt ở tốc độ nhiệt 2°C/phút và 5°C/phút chỉ xuất hiện 2 pic: pic nóng chảy của Paclitaxel (ở khoảng 215-225°C) và pic phân hủy ngay sau pic nóng chảy. Ngoài pic nóng chảy và pic phân hủy, biểu đồ nhiệt ở tốc độ nhiệt là

10°C/phút và 15°C/phút còn có sự xuất hiện thêm 2 pic nhỏ hơn ở khoảng 50-90°C (pic khử dung môi solvate hóa) và 160-180°C (pic chuyển đổi pha rắn - rắn). Tốc độ nhiệt càng tăng độ phân giải pic sẽ càng giảm [7]. Do đó, tốc độ nhiệt phù hợp để khảo sát DSC đối với Paclitaxel là 10°C/phút.

Xác định giới hạn khối lượng Paclitaxel chứa trong chén mẫu DSC: tiến hành DSC trên thiết bị DSC Q20 (TA Instrument, Mỹ) với bộ chén - nắp Aluminum Tzero chứa lượng mẫu khảo sát tối đa 3 mg. Trong các mẫu khảo sát tương tác hoạt chất - tá dược, thông thường tỷ lệ hoạt chất nhỏ hơn rất nhiều so với tỷ lệ tá dược. Chính vì thế cần phải khảo sát DSC đối với Paclitaxel với các khối lượng cân nhỏ dần để tìm ra khối lượng nhỏ nhất có thể phát hiện rõ các pic chính (nóng chảy và phân hủy) trên biểu đồ nhiệt. Kết quả thể hiện trên các biểu đồ nhiệt hình 1 và bảng 1 cho thấy: với lượng mẫu khảo sát 36 µg vẫn xuất hiện rõ hai pic chính của Paclitaxel (pic nóng chảy ở 223,53°C và pic phân hủy xảy ra ở nhiệt độ cao hơn). Với lượng mẫu 22 µg, biểu đồ nhiệt gần giống với đường nền (chạy DSC với chén trống). Như vậy, giới hạn khối lượng có trong chén mẫu khảo sát để phát hiện các pic chính đối với Paclitaxel là 36 µg.



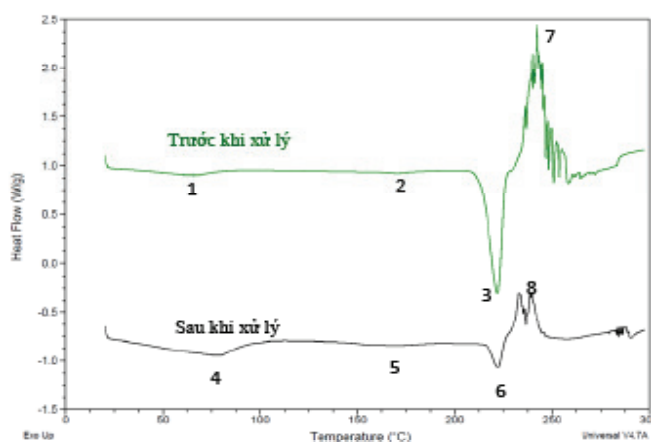
Hình 1: giới hạn phát hiện các pic trên DSC của Paclitaxel

Bảng 1: các thông số phân tích nhiệt trên biểu đồ nhiệt của Paclitaxel ở các khối lượng cân khác nhau tại pic nóng chảy của Paclitaxel

Khối lượng mẫu (µg)	2100	124	56	36	22
T _{pic} (°C)	222,04	223,21	223,55	223,53	-
Enthalpy (J/g)	57,04	16,34	21,36	10,11	-

Phân tích nhiệt DSC Paclitaxel trước và sau khi xử lý qua ethanol: Paclitaxel tan khá tốt trong ethanol. Chính vì thế, ethanol là dung môi thường được sử dụng để hỗ trợ hòa tan Paclitaxel trong nghiên cứu và phát triển các quy trình bào chế thuốc. Khảo sát

biểu đồ nhiệt DSC trước và sau khi xử lý qua dung môi ethanol để theo dõi sự biến đổi vật lý có thể xảy ra sau quá trình xử lý. Kết quả phân tích trên biểu đồ nhiệt của Paclitaxel trước và sau khi xử lý bằng ethanol không khác biệt giữa mẫu trước xử lý và sau khi xử lý được minh họa trên hình 2 và bảng 2. Biểu đồ nhiệt trước và sau khi xử lý đều có 2 pic chính là pic nóng chảy (pic 3, 6) và pic phân huỷ (pic 7, 8). Ngoài ra, trên các biểu đồ nhiệt này đều có thêm 2 pic phụ là các pic 1, pic 2, pic 4 và pic 5. Pic 1 và pic 4 có khả năng hình thành do hiện tượng khử dung môi solvate hóa trên mẫu Paclitaxel. Pic 2 và pic 5 là do hiện tượng đa hình (polymorphism) thể hiện sự chuyển pha rắn - rắn theo các tài liệu nghiên cứu trước đây [8, 9]. Kết quả này chứng tỏ Paclitaxel có thể tồn tại ít nhất 2 dạng thù hình trong cấu trúc tinh thể kết tinh.



Hình 2: biểu đồ nhiệt của Paclitaxel trước và sau khi qua xử lý bằng ethanol
(1),(4): khả năng pic khử dung môi solvate hóa;
(2),(5): pic chuyển đổi pha rắn - rắn;
(3),(6): pic nóng chảy; (7),(8): pic phân huỷ

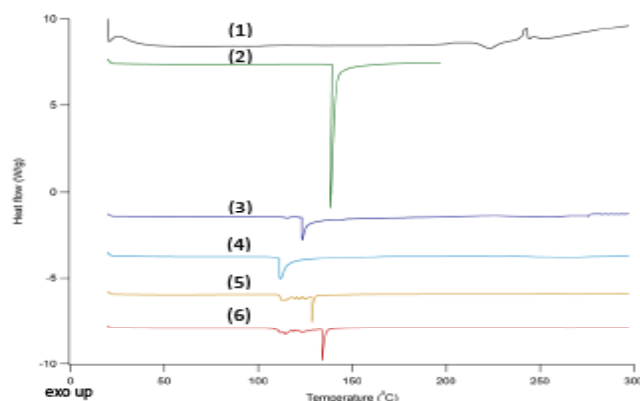
Bảng 2: các thông số trên biểu đồ nhiệt của Paclitaxel trước và sau khi xử lý bằng ethanol

Pic	1	2	3	4	5	6
T _{pic} (°C)	64,39	170,90	222,04	77,50	157,71	222,71
Enthalpy J/g)	10,46	4,60	57,04	41,18	6,45	9,60

DSC tương tác Paclitaxel với các tá dược lipid

Khảo sát biểu đồ nhiệt tương tác DSC giữa các tá dược chứng tỏ phospholipid (Phospholipon 90G) tương tác mạnh với polyoxylglycerid (Montanox 80 PPI). Tỷ lệ polyoxylglycerid càng cao thì nhiệt độ nóng chảy của phospholipid càng giảm. Qua thực nghiệm điều chế hệ phân tán nanoliposom, đề tài đã chọn tỷ lệ khối lượng phospholipid - polyoxylglycerid (2:1) và (1:2) làm hỗn

hợp tá dược để khảo sát tương tác với Paclitaxel. Khối lượng Paclitaxel của mẫu khảo sát tương tác với tỷ lệ khối lượng hoạt chất - tá dược (1:50) và (1:10) trong chén mẫu lần lượt là 59 và 273 µg. Kết quả khảo sát độ nhạy Paclitaxel trên chính thiết bị DSC-Q20 cho thấy, biểu đồ nhiệt thể hiện rõ pic nóng chảy của Paclitaxel ở lượng mẫu khảo sát 56 µg trong chén mẫu. Biểu đồ nhiệt hình 3 và các thông số ở bảng 3 cho thấy sự biến mất pic nóng chảy của Paclitaxel (ở khoảng 215-225°C) ở tất cả tỷ lệ phối hợp. Kết quả này thể hiện khả năng hoà tan hoàn toàn của Paclitaxel trong hỗn hợp tá dược phospholipid - polyoxylglycerid (1:2) và (2:1) theo tỷ lệ khối lượng. Ngoài ra, kết quả này một phần giúp dự đoán khả năng nang hoá Paclitaxel vào trong các giá mang nanoliposom hình thành từ phospholipid và polyoxylglycerid khi phát triển các dạng bào chế mới đi từ hoạt chất và các tá dược này.



Hình 3: biểu đồ nhiệt khảo sát tương tác giữa Paclitaxel và các tá dược

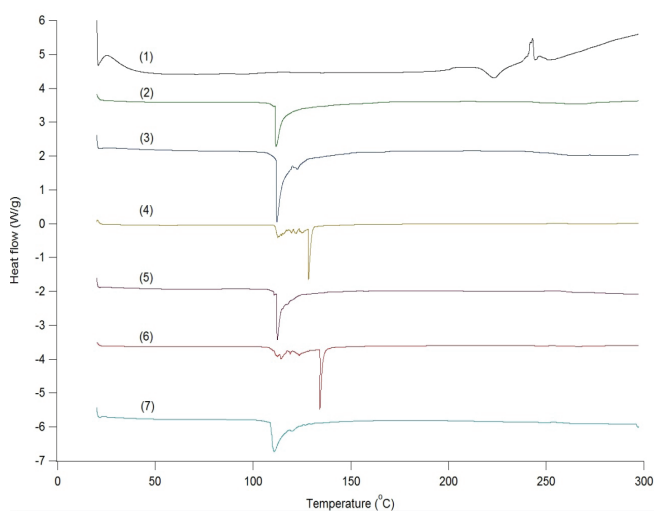
- (1) Paclitaxel 56 µg/chén mẫu; (2) Phospholipon 90G;
(3) Paclitaxel + Phospholipon 90G, 59 µg Paclitaxel/chén mẫu;
(4) Paclitaxel + Phospholipon 90G, 276 µg Paclitaxel/chén mẫu;
(5) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (1:2), 264 µg Paclitaxel/chén mẫu;
(6) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (2:1), 267 µg Paclitaxel/chén mẫu

Bảng 3: các thông số pic nóng chảy chính trên biểu đồ nhiệt tương tác giữa Paclitaxel và các tá dược lipid

Mẫu khảo sát	T _{pic} (°C)	Enthalpy (J/g)
Paclitaxel 56 µg/ chén mẫu	223,55	9,50
Phospholipon 90G	138,44	98,36
Paclitaxel + Phospholipon 90G, 59 µg Paclitaxel/chén mẫu	123,43	37,54
Paclitaxel + Phospholipon 90G, 276 µg Paclitaxel/chén mẫu	110,80	64,71
Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (1:2), 264 µg Paclitaxel/chén mẫu	128,41	36,13
Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (2:1), 267 µg Paclitaxel/chén mẫu	134,23	43,04

Độ ổn định của tương tác Paclitaxel và các tá dược lipid sau 2 tuần bảo quản

Khảo sát sự ổn định của các tương tác giữa Paclitaxel với hỗn hợp tá dược Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI ở các tỷ lệ (1:2) và (2:1) sau khi bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C, độ ẩm 65%) trong 2 tuần. Tỷ lệ hoạt chất - tá dược được khảo sát là (1:10), tương đương hàm lượng hoạt chất khoảng 273 µg trong chén mẫu. Khảo sát với tỷ lệ hoạt chất này để dễ dàng quan sát các pic của Paclitaxel nếu tương tác không bền. Biểu đồ nhiệt của mẫu khảo sát tương tác sau 2 tuần (hình 4) vẫn không thấy xuất hiện pic nóng chảy của Paclitaxel (ở khoảng 215-225°C). Điều đó có thể giải thích tương tác giữa Paclitaxel và các tá dược, hỗn hợp tá dược có tính ổn định sau 2 tuần khảo sát.



Hình 4: biểu đồ nhiệt khảo sát độ ổn định tương tác giữa Paclitaxel và các tá dược

- (1) Paclitaxel 56 µg/chén mẫu;
(2) Paclitaxel + Phospholipon 90G, 276 µg Paclitaxel/chén mẫu;
(3) Paclitaxel + Phospholipon 90G, 276 µg Paclitaxel/chén mẫu sau 2 tuần;
(4) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (1:2), 264 µg Paclitaxel/chén mẫu;
(5) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (1:2), 264 µg Paclitaxel/chén mẫu sau 2 tuần;
(6) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (2:1), 267 µg Paclitaxel/chén mẫu;
(7) Paclitaxel + Phospholipon 90G - Montanox 80 PPI (2:1), 267 µg Paclitaxel/chén mẫu sau 2 tuần

Kết luận

Qua biểu đồ nhiệt DSC cho thấy, có sự tương tác giữa hoạt chất và hỗn hợp tá dược phospholipid - polyoxyglycerid, Paclitaxel hòa tan hoàn toàn trong các hỗn hợp tá dược ở tỷ lệ hoạt chất - tá dược (1:10, kl/kl). Các tương tác vật lý này ổn định sau 2 tuần bảo quản ở nhiệt độ thường. Kết quả khảo sát nhiệt vi sai DSC sẽ góp phần theo dõi tương tác vật lý được chất - tá dược trong thiết kế phát triển các hệ phân tán nanoliposome trên nền tảng tá dược phospholipid - polyoxyglycerid.

Tài liệu tham khảo

- [1] Bocci G, Paolo D.A, Danesi R (2013), "The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of Paclitaxel", *Angiogenesis*, **16**, 481-492.
[2] Huizing M.T and Sewberath V.H (1995), "Taxanes: a new class of antitumor agents", *Cancer Investigation*, **13**(4), 381-404.
[3] Jiaher T and Valentino J.S (2008), "Degradation of Paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: epimerization", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(3), 1224-1235.
[4] Koudelka S, Turánek J (2012), "Liposomal Paclitaxel formulations", *J Control Release*, **163**(3), 322-334.
[5] Singla K.A, Garg A, Aggarwal D (2002), "Paclitaxel and its formulations", *International Journal of Pharmaceutics*, **235**, 179-192.
[6] Wei Y, Xue Z, Ye Y, Huang Y, Zhao L (2014), "Paclitaxel targeting to lungs by way of liposomes prepared by the effervescent dispersion technique", *Arch Pharm Res.*, **37**(6), 728-37.
[7] Craig M.D.Q and Lever T (2007), "Thermo Analysis for Pharmaceutical", *CRC Press*, USA, 1-53.
[8] Lee J.H, Gi U.S, Kim J.H, Kim Y, Kim S.H, Oh H and Min B (2001), "Preparation and Characterization of Solvent Induced Dihydrated, Anhydrous, and Amorphous Paclitaxel", *Bulletin Korean Chemistry Society*, **22**(8), 925-928.
[9] Liggins R.T, Hunter W.L, Burt H.M (1997), "Solid-state characterization of Paclitaxel", **86**(12), 1458-1463.

Nghiên cứu bào chế Liposome Amphotericin B

Nguyễn Tuấn Quang^{1*}, Phạm Thị Minh Huệ²

¹Học viện Quân y

²Trường Đại học Dược Hà Nội

Ngày nhận bài 4.5.2015, ngày chuyển phản biện 6.5.2015, ngày nhận phản biện 1.6.2015, ngày chấp nhận đăng 8.6.2015

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu bào chế Liposome Amphotericin B (AmB) theo 2 phương pháp: hydrat hóa film và pha loãng ethanol. Các thành phần chính dùng để bào chế bao gồm AmB, hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), distearoyl phosphatidylglycerol (DSPG) và cholesterol. Từ kết quả nghiên cứu, đã lựa chọn được một số yếu tố công thức cũng như quy trình bào chế có hiệu quả cao nhất. Với phương pháp hydrat hóa film, đã lựa chọn được tỷ lệ dược chất/tổng lượng lipid là 9% mol; tỷ lệ HSPC/DSPG là 2/0,8; dung dịch hydrat hóa là đệm citrat pH = 5 và bào chế được Liposome AmB có kích thước tiểu phân (KTTT) = 228 nm, độ phân bố KTTT (PDI) = 0,189, hiệu suất Liposome hóa là 89,41%. Với phương pháp pha loãng ethanol, lựa chọn được tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước là 8/100, nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C, tốc độ khuấy trộn 2 pha là 3900 vòng/phút cho quy trình bào chế; bào chế được Liposome AmB có KTTT = 190 nm, PDI = 0,136, hiệu suất Liposome hóa là 73,20%.

Từ khóa: bào chế, hydrat hóa film, Liposome Amphotericin B, pha loãng ethanol.

Chỉ số phân loại 3.4

STUDY ON PREPARATION OF LIPOSOME AMPHOTERICIN B

Summary

Liposome is prepared by two methods: thin film hydration and ethanol dilution with main ingredients including Amphotericin B (AmB), hydrogenated soybean phosphatidylcholine, distearoyl phosphatidylglycerol and cholesterol. By investigating and selecting, some factors belonging to formula and pharmaceutical procedure have been achieved. The result is that a suspension of Liposome AmB which is prepared has a small dimension (of about 200 nm), consistent distribution (PDI < 0.2) and high percentage of entrapment of Liposome (above 70%).

Keywords: ethanol dilution, Liposome Amphotericin B, preparation, thin film hydration.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

AmB là một thuốc điều trị nhiễm nấm toàn thân phổ rộng và có hoạt tính kháng nấm mạnh đã được sử dụng từ rất lâu. Tuy nhiên, hạn chế của dược chất này là hầu như không tan trong nước nên sinh khả dụng không cao và thuốc gây nhiều tác dụng phụ, đặc biệt là gây độc cho thận. Điều này càng trở nên trầm trọng ở những bệnh nhân nhiễm nấm xâm lấn toàn thân do suy giảm miễn dịch, ung thư.

Còn Liposome là một trong những hệ mang thuốc mới đang nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới nhờ có những ưu điểm nổi bật về khả năng mang thuốc, kiểm soát giải phóng thuốc và khả năng đưa thuốc tới cơ quan đích [1, 2].

Vì vậy, việc nghiên cứu bào chế Liposome AmB để ứng dụng trong các chế phẩm nhằm giúp kiểm soát giải phóng, tăng sinh khả dụng và làm giảm độc tính trên thận của AmB là vấn đề khoa học mang tính cấp thiết.

Nguyên liệu, đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu, thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

- Nguyên liệu: AmB, hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC), distearoyl phosphatidylglycerol (DSPG), cholesterol, dinatri

*Tác giả chính: Tel: 0913311978

hydrophosphat, dinatrisuccinat hexahydrat, kali dihydrophosphat, acid citric, acid succinic, lactose, sucrose, mannitol, natri hydroxyd, cloroform, ethanol, methanol, N,N-dimethylacetamid (DMA), natri EDTA và các hóa chất dung môi khác đạt tiêu chuẩn của Hội đồng Dược điển Mỹ (USP), tiêu chuẩn nhà sản xuất hoặc tinh khiết hóa học, acetonitril, methanol dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

- Thiết bị và dụng cụ: cân phân tích Satorius BP121S (Đức), hệ thống cất quay Rovapor R-210 (Đức), bể siêu âm Wise clean (Hàn Quốc), máy đồng nhất hoá CAT Unidrive X1000 (Đức), thiết bị đun/ép - Liposom extruder (Mỹ), thiết bị đun/ép cao áp EmulsiFlex-c5 (Canada), thiết bị lọc tiếp tuyến MicroKros Filter Modiles (Mỹ), hệ thống thiết bị phân tích kích thước Zetasizer nano ZS90 (Anh), hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Aligent, máy đo quang Hitachi U-1800 (Nhật Bản), kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) JEOL 1010 (Nhật Bản), máy đông khô Labocono Freezone Triad 740030 (Mỹ), máy đo pH InoLab... và các dụng cụ, thiết bị khác.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Liposome AmB.

Phương pháp nghiên cứu:

* Phương pháp bào chế Liposome AmB: dựa theo các tài liệu tham khảo [3], Liposome AmB được nghiên cứu bào chế với các thành phần chính gồm AmB, DSPG, HSPC, cholesterol theo phương pháp hydrat hóa film và phương pháp pha loãng ethanol [1, 2, 4]. Tiến hành khảo sát một số yếu tố thuộc về công thức và quy trình bào chế đến một số đặc tính của Liposome AmB.

* Phương pháp đánh giá Liposome AmB tạo thành và sau đông khô:

- Đo KTTT và độ đồng nhất: sử dụng phương pháp tán xạ ánh sáng động với thiết bị Zetasizer ZS90.

- Hình thái cấu trúc tiểu phân: sử dụng phương pháp chụp hiển vi điện tử truyền qua (TEM) với kỹ thuật nhuộm soi âm bản.

- Hiệu suất Liposome hóa: xây dựng quy trình định lượng AmB trong Liposome bằng phương pháp HPLC [5] và phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis ở bước sóng 405 nm. Định lượng AmB trong mẫu Liposome thô và trong mẫu Liposome sau lọc tiếp tuyến hoặc sau khi đun ép qua màng. Hiệu suất Liposome hóa (H) tính theo công thức:

$$H\% = \frac{\text{Hàm lượng AmB trong Liposome sau lọc tiếp tuyến hoặc sau đun ép qua màng}}{\text{Hàm lượng AmB trong Liposome thô}} \times 100\%$$

Kết quả và bàn luận

Kết quả bào chế Liposome AmB theo phương pháp hydrat hóa film

Lựa chọn các điều kiện cho quy trình bào chế: đã tiến hành khảo sát và lựa chọn được các điều kiện của quá trình bào chế với hệ thống cất quay Rovapor R-210 (Đức) gồm: nhiệt độ cất quay: 40°C; tốc độ quay khi tráng film: 150 vòng/phút trong 30 phút đầu, 50 vòng/phút trong thời gian còn lại của quá trình; nhiệt độ hydrat hóa: 50°C; tốc độ quay khi hydrat: 200 vòng/phút.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ dược chất trong công thức đến các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ tá dược HSPC/DSPG/Cholesterol = 2/0,8/1,9; dung dịch hydrat hóa là glucose 5%. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của tỷ lệ dược chất đến các đặc tính của Liposome AmB

Công thức	AmB (μmol)	% mol AmB/ tổng lipid	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)	Mức độ thay đổi H (%) sau 3 tuần bảo quản
A3	10,00	3	256	0,206	89,03	6,58
A5	16,67	5	266	0,276	92,36	7,68
A7	23,33	7	264	0,241	91,52	5,34
A9	30,00	9	260	0,269	87,65	3,13
A11	36,67	11	325	0,362	74,70	8,86

Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy, các mẫu từ A3 đến A9 có KTTT tương đối nhỏ và không khác biệt (256-266 nm), phân bố KTTT tương đối đồng nhất (PDI < 0,3). Trong đó, mẫu A9 có % mol dược chất cao nhất, mức độ thay đổi hiệu suất Liposome hóa nhỏ nhất (3,13%). Vì vậy, mẫu A9 với 9% mol AmB/tổng lipid được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ phospholipid đến các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ dược chất là 9% mol, tỷ lệ cholesterol là 40% tổng lượng lipid, dung dịch hydrat hóa là dung dịch glucose 5%. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: ảnh hưởng của tỷ lệ phospholipid đến các đặc tính của Liposome AmB

Công thức	HSPC/DSPG	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
A9-1	2/1	310	0,244	87,72
A9-0,8	2/0,8	217	0,208	87,16
A9-0,6	2/0,6	278	0,203	86,53

Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy, mẫu A9-0,8 có hiệu suất Liposome hóa cao (87,16%), KTTP nhỏ (217 nm), phân bố KTTP (PDI = 0,208) trong khoảng hẹp hơn so với các mẫu còn lại nên được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu ảnh hưởng của dung dịch hydrat hóa đến các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ AmB là 9% mol, tỷ lệ cholesterol là 40% so với tổng lượng lipid, HSPC/DSPG = 2/0,8. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: ảnh hưởng của dung dịch dùng hydrat hóa đến các đặc tính của Liposome AmB

Công thức	Hệ đệm	pH sau bảo chế	pH sau bảo quản 3 tuần	Δ pH	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
A9-0,8-1	Glucose 5% pH 4,5	4,85	2,88	1,97	266	0,203	89,14
A9-0,8-2	Citrat pH 4	4,60	4,35	0,25	247	0,390	86,25
A9-0,8-3	Citrat pH 5	5,48	5,36	0,12	228	0,189	89,41
A9-0,8-4	Citrat pH 6	6,39	6,08	0,31	244	0,219	89,57
A9-0,8-5	Phosphat pH 5	4,57	4,46	0,11	297	0,351	85,15
A9-0,8-6	Succinat pH 5	4,78	4,74	0,04	324	0,244	85,74

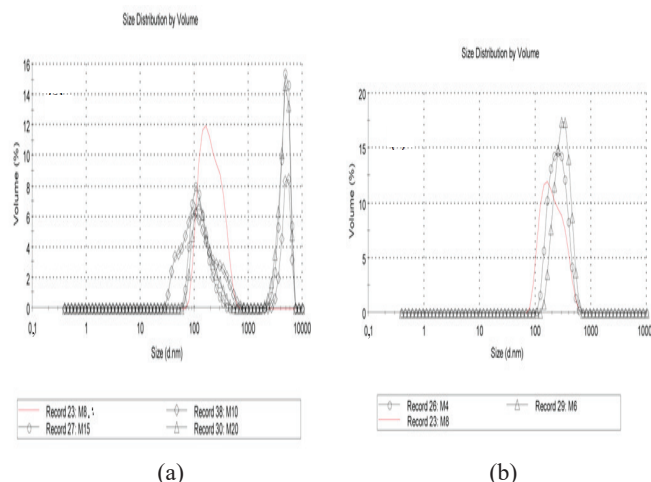
Từ kết quả ở bảng 3 cho thấy, các mẫu Liposome AmB có sự khác nhau khá lớn về KTTP (từ 228 đến 324 nm), PDI (từ 0,189 đến 0,351) và pH sau 3 tuần bảo quản (từ 2,88 đến 6,08). Trong đó, mẫu A9-0,8-3 dùng đệm citrat pH = 5 làm dung dịch hydrat hóa có KTTP nhỏ nhất (228 nm), phân bố KTTP đồng nhất (PDI = 0,189), hiệu suất Liposome hóa cao (89,41%) và ít có sự thay đổi pH sau 3 tuần bảo quản (0,12) được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả bào chế Liposome AmB theo phương pháp pha loãng ethanol

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước tới các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C, tốc độ khuấy trộn 2 pha là 3900 vòng/phút. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 4 và hình 1.

Bảng 4: ảnh hưởng của tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước đến các đặc tính của Liposome AmB

Mẫu	Thể tích pha ethanol/pha nước (ml)	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
B4	4/100	235,1	0,120	69,21
B6	6/100	227,7	0,174	68,94
B8	8/100	204,3	0,120	73,53
B10	10/100	157,8	0,222	67,98
B15	15/100	194,2	0,278	Không đánh giá
B20	20/100	176,0	0,208	Không đánh giá



Hình 1: phân bố thể tích của các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước trên 10/100 (a) và các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước dưới 10/100 (b)

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy, các mẫu khảo sát đều tạo được Liposome AmB có KTTP tương đối nhỏ ($Z_{average} < 300$ nm) và đồng nhất ($PDI < 0,3$). Tuy nhiên, kết quả ở hình 1 lại cho thấy có sự khác biệt rõ ràng về phân bố KTTP giữa các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước từ 10/100 trở lên và các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước dưới 10/100. Các công thức với tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước từ 10/100 trở lên có tỷ lệ cao các tiểu phân kích thước lớn (>1000 nm) (nên không tiến hành đánh giá hiệu suất Liposome hóa); ngược lại, các công thức với tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước dưới 10/100 có tỷ lệ các tiểu phân kích thước nhỏ chiếm đa số, không xuất hiện các tiểu phân kích thước lớn (>1000 nm). Công thức B8 có hiệu suất Liposome hóa cao nhất (đạt 73,53%) trong các công thức có tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước dưới 10/100. Kết hợp với các tài liệu tham khảo [6-8], lựa chọn tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước là 8/100 để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ phối hợp 2 pha tới các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước

là 8/100, tốc độ khuấy trộn 2 pha là 3900 vòng/phút. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: ảnh hưởng của nhiệt độ phối hợp 2 pha đến các đặc tính của Liposome AmB

Mẫu	Nhiệt độ phối hợp 2 pha (°C)	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
B8-30	30	363,4	0,283	54,89
B8-45	45	230,3	0,142	71,02
B8-60	60	204,3	0,120	73,53
B8-75	75	239,3	0,216	67,47

Từ kết quả ở bảng 5 cho thấy, nhiệt độ có ảnh hưởng đến KTTT, phân bố KTTT và hiệu suất Liposome hóa của các mẫu Liposome AmB. Mẫu B8-60 cho KTTT nhỏ nhất (204,3 nm), độ đồng nhất cao nhất (PDI = 0,12), hiệu suất Liposome hóa cao nhất (73,53%). Kết hợp với tài liệu tham khảo [7], lựa chọn nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

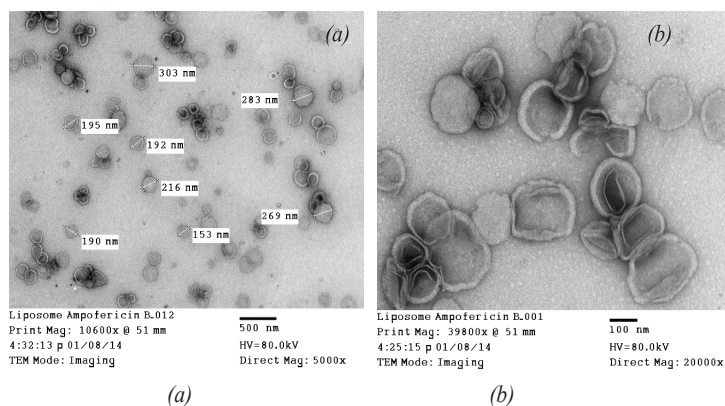
Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ khuấy trộn 2 pha tới các đặc tính của Liposome: tiến hành nghiên cứu bằng cách cố định tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước là 8/100 và nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C. Bào chế các mẫu và kết quả đánh giá một số đặc tính của Liposome tạo thành được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6: ảnh hưởng của tốc độ khuấy trộn 2 pha tới các đặc tính của Liposome AmB

Mẫu	Tốc độ khuấy trộn 2 pha (v/ph)	Z _{average} (d.nm)	PDI	H (%)
B8-60-0	Không khuấy trộn	693,1	0,509	Không đánh giá
B8-60-39	3900	204,3	0,120	73,53
B8-60-69	6900	220,2	0,242	73,11
B8-60-99	9900	289,3	0,312	69,10

Từ kết quả ở bảng 6 cho thấy, công thức không kết hợp lực phân tán (B8-60-0) cho Liposome có KTTT rất lớn (693,1 nm), không đồng nhất (PDI = 0,509) và không tiến hành đánh giá hiệu suất Liposome hóa. Các công thức còn lại đều cho Liposome có KTTT tương đối nhỏ và độ đồng nhất cao. Trong đó, công thức B8-60-39 kết hợp lực khuấy trộn là 3900 v/ph tạo được Liposome có KTTT nhỏ nhất, độ đồng nhất cao nhất và hiệu suất Liposome hóa cao được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Mẫu Liposome AmB có công thức B8-60-39 được đem chụp TEM, kết quả ở hình 2 cho thấy Liposome AmB có hình cầu, kích thước khá nhỏ, cấu trúc đa khoang, đa lớp nhưng số khoang số lớp không nhiều (dưới 3 khoang/lớp trong 1 Liposome).



Hình 2: hình ảnh chụp TEM cấu trúc (a) và KTTT Liposome AmB (b)

Kết luận

Đã tiến hành bào chế Liposome AmB theo 2 phương pháp: hydrat hóa film và pha loãng ethanol và lựa chọn được một số yếu tố thuộc về công thức cũng như quy trình bào chế.

- Với phương pháp hydrat hóa film: lựa chọn được tỷ lệ được chất/tổng lượng lipid là 9% mol; tỷ lệ HSPC/DSPG là 2/0,8; dung dịch hydrat hóa là đệm citrat pH = 5 và bào chế được Liposome AmB có KTTT = 228 nm, PDI = 0,189, hiệu suất Liposome hóa là 89,41%.

- Với phương pháp pha loãng ethanol: sử dụng hỗn hợp đồng dung môi DMA-ethanol để cải thiện độ tan của AmB và lựa chọn được tỷ lệ thể tích pha ethanol/pha nước là 8/100, nhiệt độ phối hợp 2 pha là 60°C, tốc độ khuấy trộn 2 pha là 3900 vòng/phút cho quy trình bào chế. Bào chế Liposome AmB có KTTT = 190 nm, PDI = 0,136 và hiệu suất Liposome hóa là 73,20%.

Tài liệu tham khảo

- [1] Võ Xuân Minh, Phạm Thị Minh Huệ (2013), *Kỹ thuật Nano và Liposome ứng dụng trong dược phẩm, mỹ phẩm*, Trung tâm Thông tin - Thư viện, Trường Đại học Dược Hà Nội.
- [2] Lasic D.D (1995), *Handbook of biological physics, chapter 10, applications of Liposome*, Elsevier Science B.V, California.
- [3] Deepak Singodia, Ashwni Verma, et al (2012), "Investigations on feasibility of in situ development of AmB Liposomes for industrial applications", *Journal of Liposome Research*, **22**(1), pp.8-17.
- [4] Ray A (2012), "Liposome in Drug delivery system", *Asian J Res Pharm. Sci*, **2**(2), pp.41-44.
- [5] Italia J.L, Singh D, Ravi Kumar M.N.V (2009), "High-performance liquid chromatographic analysis of AmB in rat plasma using α -naphthol as an internal standard", *Analytica chimica acta*, **634**, pp.110-114.
- [6] Anastasia S Domazou and Pier Luigi Luisi (2002), "Size distribution of spontaneously formed Liposomes by the alcohol injection method", *Journal of Liposome research*, **12**(3), pp.205-220.
- [7] Miquel Pons, Merc Foradada and Joan Estelrich (1993), "Liposomes obtained by the ethanol injection method", *International Journal of Pharmaceutics*, **95**, pp.51-56.
- [8] Oselys Rodriguez Justo, Angela Maria Moraes (2011), "Analysis of process parameters on the characteristics of Liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume", *Chemical engineering research and design*, **89**, pp.785-792.

Nghiên cứu tổng hợp Tenofovir disoproxil fumarate

Nguyễn Văn Tài*, Phan Thị Trang, Nguyễn Thị Hà

Viện Dược liệu

Ngày nhận bài 29.12.2014, ngày chuyển phản biện 6.1.2015, ngày nhận phản biện 26.2.2015, ngày chấp nhận đăng 12.3.2015

Tenofovir disoproxil fumarate (biệt dược Viread®) là thuốc kháng virus tác dụng theo cơ chế ức chế enzyme sao mã ngược - một enzyme quan trọng cho quá trình phát triển của virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) và virus gây viêm gan B. Trong bài báo này, các tác giả trình bày kết quả tổng hợp tenofovir disoproxil fumarate từ adenine qua 5 bước với hiệu suất ở mức khá cao và quy trình đơn giản, có thể áp dụng ở quy mô lớn.

Từ khóa: adenine, HIV, tenofovir disoproxil fumarate, viêm gan B.

Chỉ số phân loại 3.4

STUDY ON SYNTHESIS OF TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARATE

Summary

Tenofovir disoproxil fumarate (Viread®) is an antiretroviral agent acting under the inhibition mechanism of reverse transcriptase, an important enzyme for the growth of human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus. In this article, the synthesis of tenofovir disoproxil fumarate from adenine through five steps with a good yield is reported. The synthesis process is simple and applicable on a larger scale.

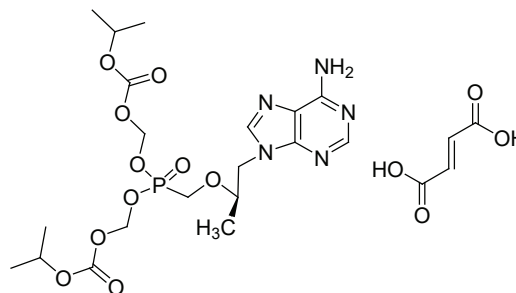
Keywords: adenine, hepatitis B, HIV, tenofovir disoproxil fumarate.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

HIV/AIDS và viêm gan B là hai căn bệnh phổ biến hiện nay. Theo ước tính, toàn thế giới hiện có khoảng 78 triệu người nhiễm HIV và 39 triệu người chết vì các nguyên nhân liên quan đến AIDS. Chỉ riêng năm 2013 đã có khoảng 2,1 triệu người mới bị nhiễm HIV, trong đó có 240.000 người ở độ tuổi dưới 15, và có khoảng 1,5 triệu người chết vì AIDS [1]. Bên cạnh đó, có khoảng 2 tỷ người đã bị nhiễm viêm gan B mạn tính. Hàng năm, có khoảng 1 triệu người chết do bệnh viêm gan B và các biến chứng của nó [2]. Việt Nam là 1 trong 9 quốc gia thuộc vùng tây Thái Bình Dương đang phải đối mặt với đại dịch viêm gan virus vì tỷ lệ nhiễm virus cao.

Tenofovir disoproxil fumarate (tên biệt dược là Viread) là một nucleotid được dùng làm thuốc điều trị HIV/AIDS và viêm gan B mạn tính [3, 4], với liều dùng 300 mg (1 viên/ngày). Tenofovir disoproxil fumarate có công thức cộng là $C_{19}H_{30}N_5O_{10}.P.C_4H_4O_4$, tên khoa học là 9-[(R)-2-bis((isopropoxycarbonyl)oxy)-methoxy]phosphinyl]methoxy]propyl]adenin fumarate. Khối lượng phân tử: 635,52 g/mol và công thức cấu tạo như sau:



Hình 1: công thức cấu tạo của tenofovir disoproxil fumarate (TDF)

* Tác giả chính: email: nguyenvantai111@gmail.com

Hiện nay, trên thế giới có một số phương pháp tổng hợp TDF, tuy nhiên qua nghiên cứu tìm hiểu, chúng tôi nhận thấy quy trình hiệu suất chưa cao, do đó cần cải tiến một số giai đoạn phản ứng để nâng cao được hiệu suất, phù hợp với điều kiện Việt Nam [5, 6]. Mặt khác, hiện trong nước chưa có công trình nghiên cứu nào về hoạt chất này. Với phổ điều trị rất rộng cho cả bệnh nhân viêm gan B và HIV/AIDS nên nhu cầu sử dụng TDF ở trong nước là rất lớn, vì vậy, các tác giả đã bước đầu nghiên cứu tổng hợp TDF ở quy mô phòng thí nghiệm với 5 bước đơn giản có thể áp dụng ở quy mô lớn.

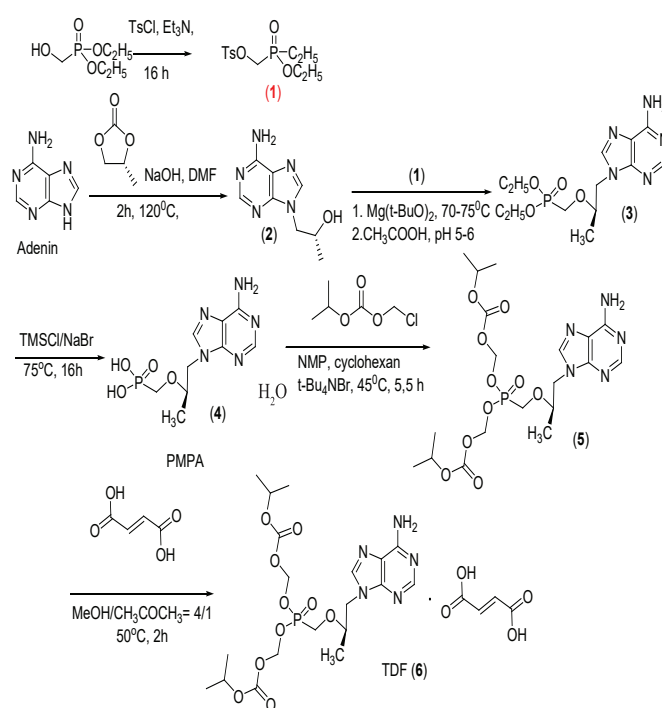
Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất và dụng cụ

Hóa chất được cung cấp bởi các hãng Merck, Fisher, AK Scientific hoặc Trung Quốc và được sử dụng trực tiếp mà không cần tinh chế thêm. Sắc ký lớp mỏng được tiến hành trên bản mỏng silicagel GF₂₅₄ (Merck, 40-63 μ m). Điểm nóng chảy được đo trên máy Stuart SMP 3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và ¹³C-NMR được đo trên máy Bruker AV500. Phổ hồng ngoại IR được đo trên máy quang phổ hồng ngoại Impact 410 Nicolet. Phổ khối lượng ESI-MS được đo trên máy Agilent 6310 Ion Trap. Phổ HR-MS được đo trên máy AutoSpec Premier USA. Sắc ký lỏng cao áp HPLC được đo trên máy Shimadzu 20A.

Phương pháp nghiên cứu

TDF được nhóm nghiên cứu tổng hợp như mô tả trên hình 2, gồm 5 bước: bước 1 thực hiện phản ứng thế nucleophin giữa adenin và R-propylen carbonat ở môi trường kiềm, thu được sản phẩm (2). Bước 2 thực hiện phản ứng ete hóa sản phẩm (2) với diethyl[(tosyloxy)-methyl]phosphonat (1) sử dụng xúc tác bazơ là magnesium di-tert-butoxide (Mg(t-BuO)₂) trong dung môi là N-methyl-2-pyrrolidon (NMP), thu được sản phẩm (3). Bước 3 là thủy phân 2 nhóm ethyl bằng cách sử dụng NaBr/TMSCl (trimethylsilyl clorid), thu được sản phẩm acid (R)-((adenin-9-yl)propan-2-oxy)methyl)phosphonic (4). Bước 4 là alkyl hóa sản phẩm (4) vừa tạo thành với cloromethyl isopropyl carbonat, thu được sản phẩm tenofovir disoproxil (5). Bước 5 là acid hóa tenofovir disoproxil (5) với acid fumaric, thu được sản phẩm cuối cùng là TDF (6).



Hình 2: sơ đồ tổng hợp TDF

Thực nghiệm

Tổng hợp hydroxypropyl adenin (2)

Hoà tan hỗn hợp adenin (1,00 g; 7,4 mmol; 1 equiv.) và NaOH (0,35 g; 8,75 mmol; 1,2 equiv.) trong DMF và khuấy trong 10 phút ở 25-30°C. Sau đó, thêm R-propylen carbonat (1,1 ml; 8,88 mmol; 1,2 equiv.) trong thời gian từ 10-15 phút ở nhiệt độ này, hỗn hợp được đun nóng tới 120°C trong 2 h. Phản ứng được đưa về 70°C, thêm hỗn hợp MeOH và 2-propanol trong 15-20 phút. Phản ứng được đưa về 15°C trong vòng 1 h. Chất rắn được lọc và rửa bằng hỗn hợp MeOH và 2-propanol lạnh rồi đem sấy chân không ở 40°C, thu được 0,99 g hydroxypropyl-adenin (2) dạng tinh thể màu trắng. Hiệu suất đạt được là 70%.

T_{nc}: 190-193°C (lit. 190-195°C) [7]

IR (KBr, ν cm⁻¹): ν = 3416 (-OH), 3324 (-NH₂), 3191 (=CH); 2973 (-CH₃), 1654 (C=N), 1606, 1576 (C=C), 1088 (C-OH)

HRMS: [M+H]⁺ = 192

¹H-NMR (500 MHz, MeOD, δ ppm): 8,21 (1H, s, H-2); 8,11 (1H, s, H-8); 4,3 (1H, dd, J = 3; 13,5 Hz, H-2'); 4,14 (2H, m, H-1'); 1,22 (1H, d, J = 6 Hz, H-3') ¹³C-NMR (125 MHz, MeOD, δ ppm): 157,3 (C-6); 153,6 (C-2); 150,9 (C-5); 143,5 (C-8); 119,9 (C-4); 66,8 (C-2'); 51,8 (C-1'); 20,8 (C-3').

Tổng hợp acid (R)-[(adenin-9-yl)propan-2-oxy)methyl] phosphonic (4)

Cho hydroxypropyl adenin (1,00 g; 5,23 mmol; 1 equiv.) vào hỗn hợp chứa NMP và $\text{Mg}(\text{t-BuO})_2$ (0,37 g; 15,69 mmol; 3 equiv.) ở 25-30°C, sau đó đun tới 70°C. Thêm diethyl[(tosyloxy)methyl]phosphonat (**1**, 2,5 g; 7,84 mmol; 1,5 equiv.) và khuấy hỗn hợp ở 70-75°C trong vòng 10-15 phút. Hỗn hợp được làm lạnh về 15-20°C, sau đó điều chỉnh pH = 6-7 bằng acid axetic, thêm ethyl acetate vào và khuấy ở 50-60°C, sau đó làm lạnh và lọc muối, rửa bằng ethyl acetate. Dung dịch sau phản ứng được chuyển sang 1 bình cầu và thêm NaBr (1,88 g; 18,3 mmol; 3,5 equiv.), hỗn hợp được làm lạnh ở 0-5°C. Thêm vào trimethylsilyl clorid (2,9 g; 26,8 mmol; 5,3 equiv) trong vòng 10 phút, hỗn hợp phản ứng được đun nóng 75°C trong 16 h. Sau đó được làm lạnh ở 20-25°C, pha loãng bằng nước và chiết 2 lần với ethyl acetate, đưa hỗn hợp phản ứng về pH 2,8-3,2 bằng cách sử dụng dung dịch NaOH 40%. Hỗn hợp được khuấy ở 58°C trong 2 h. Chất rắn được lọc và rửa bằng nước cất ở 5°C, sấy chân không ở 65°C thu được 0,59 g tenofovir (**4**). Hiệu suất đạt được là 39,7%.

T_{nc} : 275-278°C (lit. 277-279°C) [7]

IR (KBr, cm^{-1}), ν = 3407 (-OH); 3224 (-NH₂), 3204 (=CH); 2928 (-CH₃), 1699 (P=O), 1609, 1484 (C=C)

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 288$, $[\text{M}] = 287$

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ ppm): 8,36 (2H, d, J = 2 Hz, H-8, 2), 4,46 (1H, dd; J = 3,5, 14,7 Hz, H-4'), 4,28 (1H, dd, J = 7; 15 Hz, H-4'); 3,96 (1H, m, H-2'); 3,65 (1H, q; J = 9,5; 13,2 Hz, H-1'); 1,15 (3H, d; J = 6,5 Hz, H-3').

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, δ ppm): 149,6 (C-6); 148,2 (C-5); 145,1 (C-2); 144,1 (C-8); 117,2 (C-4); 75,4 (dd, J=11,75 Hz, C-4'); 63,57 (C-2'); 47,7 (C-1'); 15,5 (C-3').

Tổng hợp tenofovir disoproxil (TD) (5)

Tenofovir (**4**, 1,00 g; 3,4 mmol; 1 equiv.) được cho vào 1 bình cầu đáy tròn. Lần lượt thêm vào 10 ml NMP và 5 ml cyclohexan. Tiếp tục thêm Et₃N (3 ml, 13,6 mmol; 4 equiv.) và *n*-Bu₄NBr (1,18 g; 3,4 mol; 1 equiv.) ở 45°C, chloromethyl isopropyl carbonat (2,64 g; 17 mmol; 5,0 equiv.) được thêm vào và tiếp tục khuấy trong 5,5 h, làm lạnh hỗn hợp về 25-30°C. Hỗn hợp được chiết với ethyl acetate cho đến môi trường trung tính. Pha hữu cơ được làm khan bằng Na₂SO₄ và cất loại dung môi dưới áp suất giảm, thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tiến hành tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột với hệ dung môi *n*-hexan/axeton tăng dần độ phân cực, thu được 0,97 g sản phẩm tinh khiết ở dạng dầu (chất **5**). Hiệu suất đạt

được là 54%.

IR (KBr, v cm^{-1}): 3320 (-NH₂); 2993 (-CH₃); 1756 (C=O); 1611 (C=N); 1476 (C=C); 1105 (C-O-C).

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 520$, $[\text{M}] = 519$

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8,33 (1H, s, H-2); 7,98 (1H, s, H-8); 6,14 (2H, s, NH₂); 5,66 (3H, m, H-9', 5'); 5,59 (1H, dd, J = 5,5; 12,2 Hz, H-5'); 4,92 (2H, m, H-6', 10'); 4,36 (1H, dd, J = 3; 14,5 Hz, H-4'); 4,15 (1H, dd; J = 7,5; 14,5 Hz, H-4'); 3,94 (2H, m, H-1'); 3,71 (1H, q, J = 9; 14 Hz, H-2'); 1,31 (12 H, d, J = 2,5 Hz, H-8', 7', 11', 12'), 1,23 (3 H, d, J = 6,5 Hz, H-3')

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ ppm): 155,4 (C-5); 153,1 (C-6'); 153,0 (C-10'); 152,5 (C-8); 149,9 (C-4); 141,9 (C-2); 118,9 (C-6); 84,3 (dd, J = 6,1 Hz, C-4') ; 73,5 (C-5', 9'); 63,7 (C-7'); 62,3 (C-11'); 59,0 (C-2'); 48,1 (C-1'); 21,6 (C-8', 7', 12', 13'); 16,3 (C-3').

Tổng hợp TDF (6)

Tenofovir disoproxil (**5**, 1,00 g; 1,92 mmol; 1 equiv.) được hòa tan trong 7,5 ml aceton ở nhiệt độ phòng, làm lạnh hỗn hợp xuống 0-5°C. Sau đó, nhỏ từ từ hỗn hợp acid fumaric (0,29 g; 2,5 mmol; 1,3 equiv.) đã được hòa tan trong 1,8 ml MeOH, khuấy ở 50°C trong 2 h, kết thúc phản ứng, làm lạnh về 5°C để sản phẩm kết tinh. Lọc bỏ phần chất rắn acid fumaric còn dư. Cô cạn dung môi dưới áp suất giảm thu được sản phẩm TDF thô (**6**). Tinh chế sản phẩm thô thu được bằng cách chiết với ethyl acetate, làm khan bằng Na₂SO₄ thu được 1,1 g TDF (**6**) màu trắng, tinh khiết 99% (tính theo diện tích pic trên HPLC). Hiệu suất đạt được là 69,3%.

T_{nc} : 115-117°C (lit. 117-119°C) [7]

IR (KBr, v cm^{-1}): 3236 (-NH₂); 2989 (-CH₃); 1760 (C=O este); 1675 (C=O acid); 1619 (C=N); 1505, 1426 (C=C)

ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 520$, $[\text{M}] = 519$

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 8,11 (1H, s, H-2); 8,02 (1H, s, H-8); 7,16 (2H, s, NH₂); 6,61 (2H, s, H-1'', 2''); 5,54 (4H, m, H-9', 5'); 4,82 (2 H, m, H-6', 10'); 4,24 (1H, dd, J = 4; 14,5 Hz, H-4'); 4,15 (1H; dd; J = 6; 14,5 Hz, H-4'); 3,96 (3H, m, H-1', 2'); 1,24 (6 H, d, J = 2,5 Hz, H-8', 7'); 1,23 (6 H, J = 2 Hz, H-11', 12'); 1,1 (3H; d; J = 6 Hz, H-3')

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 165,9 (C=O acid); 155,9 (C-5); 152,5 (C-6'); 152,3 (C-10'); 149,7 (C-4); 141,2 (C-2); 133,9 (C-1'', 2''); 118,3 (C-6); 84,2 (dd, J = 6,1 Hz, C-4'); 75,9 (C-5'); 75,8 (C-9'); 72,8 (C-7'); 62,7 (C-11'); 61,4 (C-2'); 46,5 (C-1'); 21,2 (C-8', 7', 12', 13'); 16,6 (C-3').

Kết quả và bàn luận

Theo quy trình trên, việc tổng hợp TDF [8, 9] được tiến hành với nguyên liệu đầu có giá thành hạ là adenin. Bước 1 là thực hiện phản ứng thế nucleophin với R-propylen carbonat, dung môi dimethylfomamid (DMF), sử dụng xúc tác NaOH rắn, thực hiện ở 120°C, trong thời gian 1 h, thu được hydroxypropyl adenin (2). Quá trình sử dụng NaOH để thủy phân R-propylen carbonat để tạo thành một carboncation, một phân khí CO₂ được sinh ra trong phản ứng.

Việc tổng hợp acid (R)-[(adenin-9-yl)-propan-2-oxymethyl]phosphonic (4, tenofovir) được thực hiện qua hai bước 2 và 3, trong đó bước 2 là tổng hợp chất trung gian diethyl phosphonat (3), sau đó bước 3 là thủy phân chất (3) tạo (4). Ở bước 2 là phản ứng gắn diethyl[(tosyloxy)methyl]phosphonat (1) với hydroxypropyl adenin (2) bằng cách sử dụng xúc tác kiềm mạnh là Mg(t-BuO)₂ [4]. Ở đây, t-BuO⁻ được sinh ra trong quá trình phản ứng sẽ lấy hydro của nhóm hydroxy để tạo thành cacbanion trước khi phản ứng với diethyl[(tosyloxy)methyl]phosphonat (1) để tạo ra hợp chất trung gian (3) trong dung môi là NMP. Việc sử dụng CH₃COOH để đưa phản ứng về môi trường pH trung tính thuận lợi cho giai đoạn sau thủy phân liên kết ete. Chất trung gian (3) được sử dụng tiếp ngay cho bước 3 là bước thủy phân este sử dụng xúc tác là trimethylsilyl clorid (4 equiv.)/NaBr (4 equiv.) trong dung môi NMP [4], việc sử dụng TMSCl để tạo ra hợp chất trung gian bằng việc thay thế hai nhóm ethyl bằng hai nhóm trimethylsilyl. Việc sử dụng NaBr nhằm tăng tốc độ phản ứng thế nucleophin xảy ra nhanh hơn trong dung môi NMP.

Bước 4 là phản ứng alkyl hóa hay thực chất là phản ứng ete hóa giữa chloromethyl isopropylcarbonat vào hai nhóm -OH của tenofovir, phản ứng thế được xảy ra dễ dàng trong dung môi NMP [10], đặc biệt khi sử dụng với dung môi này chất đầu tenofovir được hòa tan hoàn toàn, khí HCl sinh ra trong phản ứng được trung hòa bằng xúc tác bazơ là Et₃N, sử dụng n-Bu₄NBr xúc tác làm tăng tốc độ phản ứng thế S_N2 trong hỗn hợp phản ứng đồng pha.

Bước cuối cùng (bước 5) của quy trình tổng hợp TDF là phản ứng tạo muối giữa tenofovir disoproxil với acid fumaric. Quá trình tạo muối được thực hiện trong hỗn hợp dung môi là CH₃COCH₃/MeOH [9], ở 50°C trong thời gian là 2 h, việc thực hiện trong hệ dung môi CH₃COCH₃/MeOH để có thể hòa tan hoàn toàn được chất đầu tenofovir disoproxil, đồng thời cũng có thể hòa tan hoàn toàn được acid fumaric trong quá trình phản ứng, làm cho phản ứng xảy ra dễ dàng hơn. Kết thúc phản ứng, lọc bỏ phần acid fumaric còn dư, chiết sản phẩm thu được với ethyl acetate nhằm loại bỏ các tạp chất trong sản phẩm, cô cạn dung môi dưới áp suất giảm thu được sản phẩm TDF có độ tinh khiết trên 99% (tính

theo diện tích pic HPLC).

Như vậy, bằng cách sử dụng NaOH rắn cho bước 1, chúng tôi đã tăng được hiệu suất của bước này lên 70%, đồng thời giảm được tạp chất sinh ra trong quá trình phản ứng. Ở bước 5, việc sử dụng hệ dung môi MeOH/CH₃COCH₃ đã tăng hiệu suất của phản ứng, đồng thời sử dụng phương pháp chiết lỏng với ethyl acetate (hầu hết trong các tài liệu, các tác giả đã tinh chế bằng cách kết tinh hoặc chạy sắc ký cột), chúng tôi đã thu được sản phẩm có độ tinh khiết khá cao, không cần phải tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột và phương pháp kết tinh lại, điều này sẽ có ý nghĩa rất lớn khi thực hiện sản xuất ở quy mô lớn tại Việt Nam.

Kết luận

Nhóm tác giả đã thực hiện tổng hợp thành công tenofovir disoproxil fumarate bằng việc đi từ nguyên liệu đầu là adenin, qua 5 bước với hiệu suất của toàn quy trình tổng hợp đạt 10,4%. Quy trình tổng hợp khá đơn giản, hạn chế sử dụng các dung môi độc hại, có thể áp dụng ở quy mô lớn, phù hợp với điều kiện ở Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1] UNAIDS Fact Sheet (2014), <http://www.amfar.org/worldwide-aids-stats>.
- [2] Hepatitis B foundation cause for a cure (2014), <http://www.hepb.org/hepb/statistics.htm>.
- [3] Dale O Kiesewettera, Kathleen Knudsona, Matt Collinsb, Sharat Srinivasulac, Esther Limd and Michele Di Mascioe (2008), "Enantiomeric radiochemical synthesis of R and S-[1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-fluoropropan-2-yloxy] methylphosphonic acid", *J Labelled Comp Radiopharm*, **51**(4), pp.187-194.
- [4] Michal Cesnek, Antonin Holy, Milena Masojdkova, Eva Kmonickova and Zdenek Zidek (2008), "Synthesis of guanidino analogues of PMPDAP and their immuno biolo-gical activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, pp.965-980.
- [5] Arlen L Jeffery, Jae-Hun Kim and David F Wiemer (2000), "Synthesis of Acyclic Nucleoside and Nucleotide Analogues from Amino Acids: A Convenient Approach to a PMEA -PMPA Hybrid", *Tetrahedron*, **56**(29), pp.5077-5083.
- [6] Holý A, Dvoráková H and Masojdková M (1995), "Synthesis of enantiomeric N-(2-phosphonomethoxypropyl) derivatives of heterocyclic bases", *Collect. Czech. Chem. Commun*, **60**, pp.1390-1409.
- [7] Jiandong Yuan, Suzhou C.N (2010), "Nucleotide analogue prodrug and the preparation thereof", *US 2010/0216822A1*.
- [8] Lisa M Schultze, Harlan H Chapman, Nathan J.P Dubree (1998), "Practical Synthesis of the anti-HIV Drug, PMPA", *Tetrahedron Letters*, **39**(14), pp.1853-1856.
- [9] Stephen R Houghton, Jack Melton, Joseph Fortunak, David H Brown Ripin, Christopher N Boddy (2010), "Rapid, mild method for phosphonate diester hydrolysis: development of a one-pot synthesis of tenofovir disoproxil fumarate from tenofovir diethyl ester", *Tetrahedron*, **66**(41), pp.8137-8144.
- [10] Dana Hocková, Antonin Holý, Milena Masojdková, Dianne T Keough, John de Jersey, Luke W Guddat (2009), "Synthesis of branched 9-[2-(2-phosphonoethoxy) - ethyl]purines as a new class of acyclic nucleoside phosphonates which inhibit Plasmodium falciparum hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**(17), pp.6218-6232.

Bán tổng hợp Paclitaxel từ 10-Deacetyl Baccatin trích từ cây Thông đỏ Lâm Đồng

Trần Công Luận^{1*}, Nguyễn Lê Mỹ Tiên², Lê Đặng Quỳnh Như²,
Ngô Thị Mỹ Huệ², Tống Thành Danh², Vương Chí Hùng³

¹Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Công ty cổ phần Y dược phẩm VIMEDIMEX

Ngày nhận bài 8.4.2015, ngày chuyển phản biện 10.4.2015, ngày nhận phản biện 11.5.2015, ngày chấp nhận đăng 15.5.2015

Paclitaxel là một dược chất có tác dụng điều trị ung thư, có hàm lượng rất nhỏ trong các loài Thông đỏ thuộc họ Taxaceae. Với công dụng quan trọng của dược chất này, các nhà khoa học đã và đang nỗ lực nghiên cứu để tổng hợp được Paclitaxel. Do có cấu trúc hóa học phức tạp nên việc tổng hợp toàn phần dược chất Paclitaxel là rất tốn kém. Trong nghiên cứu này, các nhà khoa học đã nghiên cứu bán tổng hợp Paclitaxel từ 10-Deacetyl Baccatin (10-DAB), một hoạt chất sẵn có cho năng suất cao được phân lập từ cây Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng, với hiệu quả kinh tế cao.

Từ khóa: bán tổng hợp, cây Thông đỏ, Lâm Đồng, Paclitaxel, 10-Deacetyl Baccatin.

Chỉ số phân loại 3.4

SEMI-SYNTHETIC PACLITAXEL FROM 10-DAB ISOLATED FROM TAXUS WALLICHIANA ZUCC

Summary

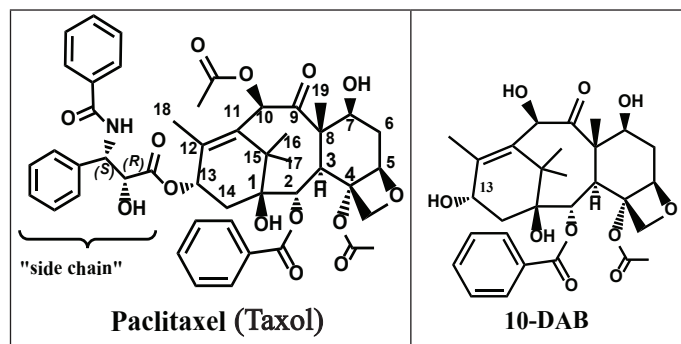
Paclitaxel is an important anticancer drug, which is isolated in an extremely low yield from the Himalayan yew (*Taxus wallichiana*). The clinical utility of Paclitaxel has prompted a tremendous effort to obtain this complex molecule's synthesis. Due to the chemical complexity of Paclitaxel, the fully synthetic Paclitaxel molecule is not likely to be economical. Semi-synthetic Paclitaxel from 10-DAB, a readily available compound isolated in higher yield from yew species, can bring a greater efficiency. In this study, the semi-synthesis of Paclitaxel from 10-DAB by coupling baccatin and N-benzyloxycarbonyl- β -phenylisoserine side chain, a compound derived from enzymatic hydrolysis of the β -lactam ring using Amano PS and AK Amano has been conducted.

Keywords: Lam Dong, Paclitaxel, Semi-synthetic, *Taxus wallichiana*, 10-Deacetyl Baccatin.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Paclitaxel là một dược chất có tác dụng điều trị ung thư, có hàm lượng rất nhỏ trong các loài Thông đỏ thuộc họ taxanes [1, 2]. Paclitaxel thường được điều chế thông qua các con đường như tổng hợp toàn phần, bán tổng hợp, sinh tổng hợp, trong đó ưu việt nhất là sử dụng hợp chất trung gian β -lactam cùng với một số dẫn xuất của 10-DAB để tạo thành một chuỗi "taxol sidechain" ở vị trí C-13 (hình 1).



Hình 1: Paclitaxel và 10-DAB

Trong các phản ứng tổng hợp hữu cơ như vậy, hầu hết các sản phẩm tổng hợp được là một hỗn hợp các đồng phân đối quang (racemic) và do đó có ảnh hưởng không tốt đến hiệu suất hình thành nên lập thể của các taxane tương ứng. Phương pháp tổng hợp sử dụng các tác nhân bất đối xứng để hình thành nên các

*Tác giả chính: Email: congluan53@gmail.com

đồng phân lập thể của các hợp chất trung gian β -lactam cũng như các sản phẩm taxane cuối cùng đã trở thành một chủ đề nghiên cứu được quan tâm trong cả lĩnh vực sinh học lẫn hoá học. Vấn đề thường gặp khi sử dụng xúc tác hoá học trong chọn lọc đối phân là độc hại với môi trường, chi phí cao, độ chọn lọc không cao; trong khi đó các xúc tác sinh học như enzyme có thể hoạt động ở điều kiện bình thường, không đòi hỏi nhiệt độ hay áp suất lớn và tránh được những tác động có hại cho môi trường. Ưu điểm lớn của enzyme so với chất xúc tác hoá học là độ chọn lọc cao kể cả độ chọn lọc lập thể (stereoselectivity), chọn lọc hoá học (chemoselectivity, regioselectivity). Nhiều loại enzyme khác nhau đã được sử dụng cho phản ứng thủy phân β -lactam trong định hướng tổng hợp mạch nhánh “side chain” của Paclitaxel. Nghiên cứu này thực hiện khảo sát đối với enzyme PK Amano và PS Amano trong quy trình tổng hợp Paclitaxel từ 10-DAB trích từ cây Thông đỏ lá dài trồng ở Lâm Đồng.

Phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Hóa chất sử dụng trong các phản ứng được đặt mua từ Aldrich-Sigma hoặc Acros. Enzyme được sử dụng là AK Amano (Amano Lipase from *Pseudomonas fluorescens* beige-brown ≥ 20000 U/g), PS Amano (Amano Lipase PS from *Burkholderia cepacia* ≥ 30000 U/g) được đặt mua của Aldrich-Sigma. Dung dịch đệm photphat pH = 7 của Hãng Hanna - Italia. Dung môi chạy cột sử dụng *n*-hexan, ethyl acetat Việt Nam đã qua chưng cất lại. Sắc ký bản mỏng sử dụng bản mỏng tráng sẵn silica gel GF₂₅₄ (Merck). Sắc ký cột sử dụng silical gel 60A°, 200-400 mesh (Merck).

Phương pháp phân tích

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR (Bruker, 500 MHz) và phổ khối lượng HR-MS (Bruker compass Data Analysis 4.0) được đo tại Trung tâm Phân tích thí nghiệm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

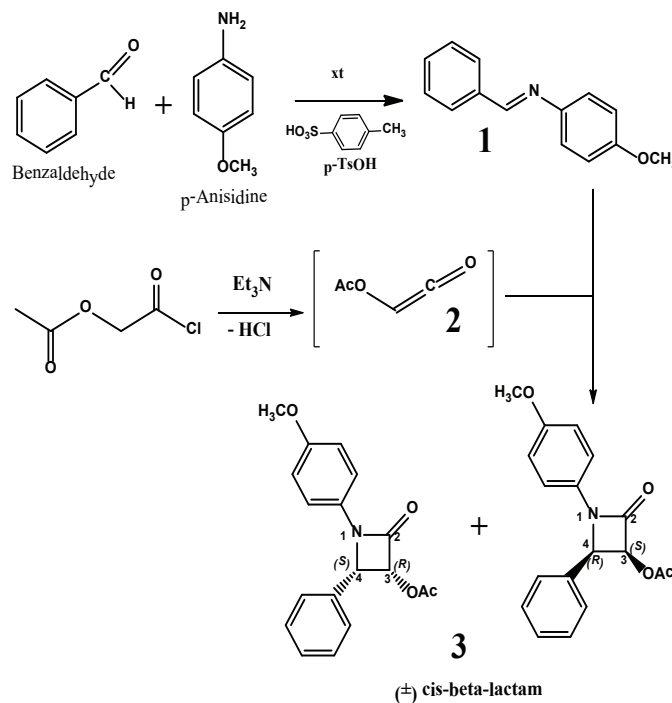
Độ tinh khiết của sản phẩm được đo sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC, G1322A - 1260 Degasser) tại Phòng thí nghiệm hữu cơ, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.

Kết quả và bàn luận

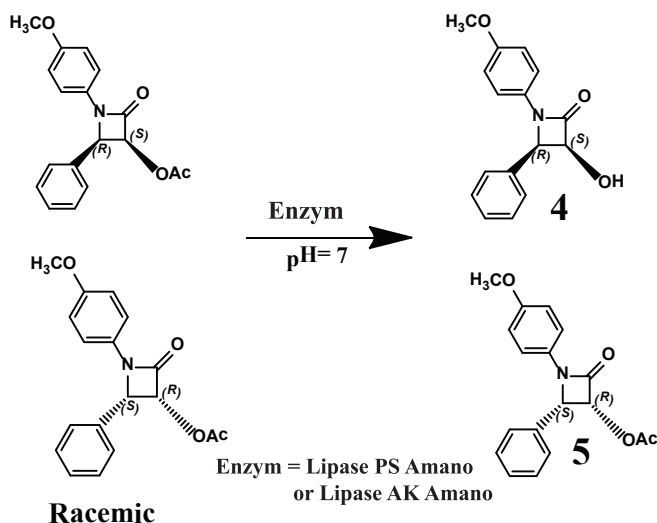
Phản ứng tổng hợp imin **1** được thực hiện trong dung môi dichloromethan với xúc tác là *p*-TsOH cho hiệu

suất 90% [3]. Hỗn hợp sau phản ứng cần trung hòa bởi một lượng dư triethylamin để đảm bảo môi trường bazơ, là môi trường cần thiết để imin bền khi phân lập trên cột sắc ký loại bỏ *p*-anisidin không phản ứng hết. Việc kết tinh imin trong nước và ethanol không giúp loại bỏ hoàn toàn *p*-anisidin và sự có mặt của *p*-anisidin sẽ làm hiệu suất phản ứng kế tiếp tạo β -lactam suy giảm đáng kể (sơ đồ 1).

Keten **2** được tạo ra *in situ* từ hỗn hợp α -acetoxy acetyl chlorid với sự có mặt của triethylamin sẽ phản ứng với imin **1** tạo thành β -lactam [4]. Đây là phản ứng cộng [2+2] đóng vòng, có sự tỏa nhiệt mạnh. Do đó, phản ứng cần được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 0-5°C trong môi trường khí trơ. Phản ứng khử được thực hiện ở nhiệt độ phòng cho thấy không tạo thành β -lactam mà chỉ có các sản phẩm bị phân hủy mạnh. Phản ứng [2+2] đóng vòng tạo β -lactam có hai tâm bất đối xứng, theo lý thuyết sẽ cho hỗn hợp bốn đồng phân quang học. Ở phản ứng nêu trên, do tác động của hai nhóm phenyl hiện diện trên imin và nhóm -OAc có trên keten nên quan sát thấy chỉ có *cis*- β -lactam **3** hình thành [5]. Trên phổ H-NMR của hợp chất β -lactam **3**, mỗi nhóm tín hiệu của H₃ và H₄ đều là mũi đôi (doublet) và có hằng số ghép $J_{H3-H4} = 5,0$ Hz, điều này chứng tỏ H₃-H₄ nằm ở vị trí *cis*. Nếu ở vị trí *trans*, hằng số ghép này thông thường rất nhỏ (nhỏ hơn 1,5 Hz) hoặc quan sát thấy mũi đơn của H₃ và H₄ [6].



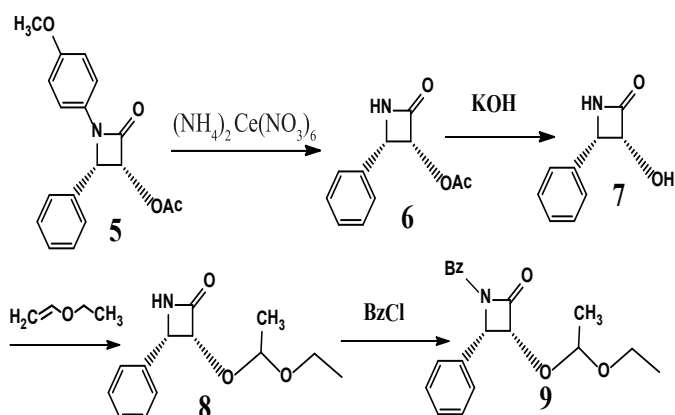
Là dẫn xuất trung gian để tạo nên mạch nhánh “side chain” tại C-13 của Paclitaxel, hợp chất *cis*- β -lactam cần có cấu hình (3*R*,4*S*). Một số nghiên cứu cho thấy, phản ứng thủy phân hỗn hợp **3** với enzym lipase có thể giúp phân lập được hai đồng phân đối quang (3*R*,4*S*) và (3*S*,4*R*). Đồng phân chịu phản ứng thủy phân nhanh hơn sẽ tạo thành hợp chất 3-hydroxy **4** và dễ dàng được phân lập khỏi đồng phân đối quang **5** còn lại nhờ sử dụng sắc ký cột thường (sơ đồ 2).



Sơ đồ 2: phản ứng thủy phân β -lactam sử dụng enzym

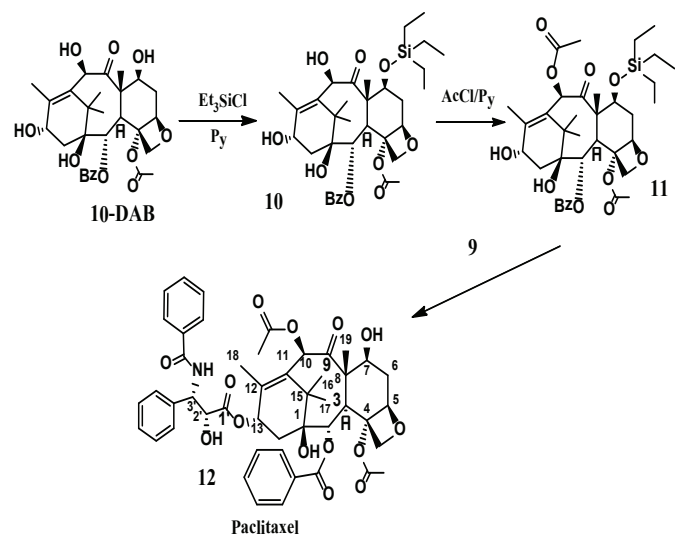
Kết quả khảo sát trên hai enzym PS và AK Amano cho thấy, phản ứng xảy ra khá nhanh đối với PS Amano. Sau 24 h, sắc ký bản mỏng của phản ứng sử dụng PS Amano cho thấy một lượng lớn sản phẩm đã tạo thành trong khi đối với AK Amano, bản mỏng chỉ cho thấy một vết sản phẩm mờ nhạt. Tỷ lệ khối lượng enzym: các chất được khảo sát là 1:1. Theo một số nghiên cứu [7], phản ứng tương tự với các enzym lipase khác đều sử dụng tỷ lệ enzym trên tác chất từ 5 đến 10 lần để tăng tốc độ của phản ứng. Việc sử dụng lượng lớn enzym là một hạn chế cần nhiều nghiên cứu để khắc phục do gây khó khăn cho việc tách chiết hỗn hợp sau phản ứng. Dung môi hữu cơ sử dụng cho phản ứng có thể là CCl_4 , cyclohexan, CS_2 , *n*-hexan, acetonitril [8], trong đó acetonitril cho kết quả tốt hơn cả.

Đồng phân β -lactam **5** sau phản ứng được cho tác dụng với ceric amoni nitrat trong acetonitril để loại nhóm *p*-methoxybenzen và thủy phân **6** trong môi trường KOH loại nhóm acetyl thu được **7**. Nhóm hydroxy tiếp tục được bảo vệ với vinyl ethyl eter thu được **8** tiếp tục được *N*-benzoyl hóa thu được **9** (sơ đồ 3).



Sơ đồ 3: tổng hợp mạch nhánh “side chain” C-13 của taxol

Phản ứng kết nối giữa **9** và **11** với tác nhân DMAP và thủy phân loại bỏ các nhóm bảo vệ triethylsilan, ethyl eter trong môi trường HCl thu được sản phẩm với phổ HNMR và HRMS phù hợp với dữ liệu của Paclitaxel (sơ đồ 4).



Sơ đồ 4: phản ứng tạo Paclitaxel

N-Benzyliden-*p*-methoxyanilin **1**: sử dụng bình cầu phản ứng 1000 ml 2 cổ nhám có gắn sinh hàn hồi lưu, hòa tan 12,45 g (0,1 mol) *p*-anisidin trong 100 ml dichlormethan (CH_2Cl_2), nhỏ từ từ 11,14 ml (0,1 mol) Benzaldehyd vào bình phản ứng, thêm vào 5 mg xúc tác *p*-toluen sulfonic acid monohydrat (*p*-TsOH). Sau 24 h, kiểm tra sắc ký bản mỏng thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn. Cho thêm 0,1 ml triethylamin để trung hòa *p*-TsOH, khuấy thêm 15 phút, sau đó đem hỗn hợp sau phản ứng cô cạn và làm sắc ký cột với hệ dung môi là *n*-hexan - ethylacetat là 85:15 thu sản phẩm, hiệu suất 90%. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ ppm 3,17 (s, 3H, OCH_3); 6,99-7,30 (m, 4H, C_6H_4); 7,50-7,90 (m,

5H, C₆H₅); 8,50 (s, H, CH=N). HRMS (ESI) C₁₄H₁₃NO [M+H]⁺: dự kiến 212,1069; tìm thấy 212,1082.

Cis-1-p-methoxyphenyl-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-one **3**: hòa tan 17,87 g (0,085 mol) N-Benzylidene-p-methoxyaniline trong 100 ml dichlormethane (CH₂Cl₂), cho thêm vào từ từ 20 ml (0,17 mol) triethylamin (dung dịch 1). Hoà tan 8,2 ml (0,077 mol) α-acetoxyacetylchlorid vào 50 ml dichlormethane (CH₂Cl₂) (dung dịch 2), làm lạnh hỗn hợp phản ứng ở 0-5°C, nhỏ từ từ từng giọt dung dịch 2 vào dung dịch 1 cho đến hết, sau đó tiếp tục khuấy hỗn hợp phản ứng trong 24 h. Hỗn hợp sau phản ứng được pha loãng với 50 ml dichlormethane, sau đó lớp dung môi hữu cơ này được rửa lại bằng nước cất 2 lần, mỗi lần 100 ml. Chiết lấy phần dung môi hữu cơ, làm khan bằng natri sulfat, lọc và cô quay đến khi cạn. Làm sắc ký cột với hệ dung môi *n*-hexan - ethylacetate là 7:3 để thu sản phẩm, hiệu suất 80%. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ ppm 1,68 (s, 3H, OAc); 3,77 (s, 3H, OCH₃); 5,37 (d, 1H, J=5,0 Hz, CH-Ph); 5,97 (d, 1H, J=5,0 Hz, CH-OAc); 6,83-7,38 (m, 9H, H-aromatic). HRMS (ESI) C₁₈H₁₇NO₄ [M+Na]⁺: dự kiến 334,1055; tìm thấy 334,1085.

Cis-1-p-methoxyphenyl-3-hydroxy-4-phenylazetidin-2-on **4**: hòa tan 6,0 g (0,02 mol) *cis-1-p-methoxyphenyl-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-on* trong 20 ml acetronitril (CH₃CN) (dung dịch 1). Hoà tan 2,8 g enzym (AK Amano hoặc PS Amano) vào 75 ml dung dịch đệm pH=7 (dung dịch 2). Nhỏ từ từ dung dịch 2 vào dung dịch 1 cho đến hết, sau đó tiếp tục khuấy hỗn hợp phản ứng trong 10 ngày. Độ pH của dung dịch được điều chỉnh ở pH=7 bằng dung dịch NaOH 1N. Kiểm tra phản ứng bằng TLC. Hỗn hợp sau phản ứng được chiết bằng ethylacetat 3 lần, mỗi lần 100 ml. Phần dung môi hữu cơ làm khan bằng natri sulfat, lọc và cô quay đến cạn. Làm sắc ký cột với hệ dung môi hexan - ethylacetat (1:1) để thu sản phẩm. ¹H NMR (DMSO, 500MHz) δ ppm 3,65 (s, 3H, OCH₃); 5,14-5,16 (dd, 1H, J=5,0; 7,0 Hz, CH-OH); 5,27 (d, 1H, J=5Hz, CH-Ph); 6,07 (d, 1H, J=7 Hz, -OH); 6,86-7,36 (m, 9H, H-aromatic). HRMS (ESI) C₁₆H₁₅NO₃ [M+Na]⁺: dự kiến 229,0949; tìm thấy 229,0959.

Cis-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-on **6**: 20 g (64 mmol) *cis-1-p-methoxyphenyl-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-on* hòa tan trong 500 ml CH₃CN, làm lạnh bình 0-5°C. Cho từ từ dung dịch Ceri ammonium nitrate (140 g hòa tan trong 450 ml H₂O) vào trong vòng 1 h. Hệ phản ứng khuấy trong vòng 30 phút, sau đó chiết với 300 ml x 3 diethyleter. Pha hữu cơ gộp

lại, đem rửa với 100 ml H₂O, 2 x 100 ml dung dịch NaHSO₃ bão hòa, 2 x 100 ml NaHCO₃ bão hòa. Pha hữu cơ sau đó tách ra, làm khan với Na₂SO₄. Lọc, cô cạn, kết tinh trong acetone/hexan thu được 11 g sản phẩm *cis-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-on* (53 mmol, 82%). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ ppm 1,68 (s, 3H, OAc); 3,76 (s, 3H, OCH₃); 5,04 (d, 1H, J=4.7 Hz, H-3); 5,87 (dd, 1H, J=2,7; 4,7 Hz, H-4); 6,50 (bs, 1H, NH); 7,30-7,38 (m, 5H, H-aromatic). HR-MS (ESI) C₁₁H₁₁NO₃Na [M+Na]⁺: dự kiến: 228,0631; tìm thấy 228,0668.

Cis-3-hydroxy-4-phenylazetidin-2-on **7**: cho từ từ dung dịch 10 g *cis-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-on* (48 mmol) hòa tan trong 500 ml THF vào bình phản ứng có chứa dung dịch KOH trong THF (400 ml THF và 560 ml dung dịch KOH 1M) ở 0-5°C. Hệ được khuấy 1 h. Sau đó thêm vào 200 ml dung dịch NaHCO₃ bão hòa và chiết với ethyl acetat (300 ml x 3). Pha hữu cơ tách ra, làm khan với Na₂SO₄, lọc, cô cạn thu được 7,2 g của **7** (44 mmol, 92%). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ ppm 4,96 (d, 1H, J=5,0 Hz, H-3); 5,13 (dd, 1H, J=2,3, 5,0 Hz, H-4); 6,36 (bs, 1H, NH); 7,29-7,46 (m, 5H, H-aromatic). HR-MS (ESI) C₉H₉NO₂Na [M+Na]⁺: dự kiến 186,0525; tìm thấy 186,0529.

Cis-3-(1-ethoxyethoxy)-4-phenylazetidin-2-on **8**: hòa tan 3 g (18,4 mmol) *cis-3-hydroxy-4-phenylazetidin-2-one* trong 15 ml THF ở 0°C. Cho thêm vào 5,3 ml ethyl vinyl ether (55 mmol, 3eq) và 20 mg (1% mol, 0,2 mmol) methane-sulfonic acid. Hỗn hợp khuấy ở 0°C khoảng 20 phút, sau đó cho vào 20 ml NaHCO₃ bão hòa, chiết 3 x 40 ml ethyl acetat. Pha hữu cơ gộp lại, làm khan với Na₂SO₄, lọc, cô cạn thu được 4,87 g **8** (99%). ¹H-NMR (CDCl₃, Bruker 500 MHz): δ ppm 0,9-1,45 (m, 4H, CH₂-5' & CH₂-6') 1,16 (t, 3H, J=7,0 Hz, CH₃-7'); 1,4 (d, 3H, J=6,1 Hz, CH₃-3'); 3,72 (m, 2H, CH₂-4'); 5,08 (d, 1H, J=6,1 Hz, H-2'); 5,11 (d, 1H, J=5,0 Hz, H-3); 7,2-7,5 (m, 5H, H-aromatic). HR-MS (ESI) C₁₃H₁₇NO₃Na [M+Na]⁺: dự kiến 258,1106; tìm thấy 258,1119.

Cis-1-benzoyl-3-(1-ethoxyethoxy)-4-phenylazetidin-2-on **9**: hòa tan 3 g (*cis-3-(1-ethoxyethoxy)-4-phenylazetidin-2-on* **8** (12,7 mmol) trong 20 ml pyridin, cho vào 15 mmol BzCl và 0,2 mmol DMAP. Hỗn hợp khuấy cho đến khi hết các chất (24 h, TLC). Hỗn hợp đem chiết với ethyl acetate và nước. Pha hữu cơ đem làm khan với Na₂SO₄, lọc, cô cạn và phân lập trên cột sắc ký thu được **9** (hiệu suất 90%). ¹H-NMR (CDCl₃, Bruker 500MHz): δ ppm 0,9-1,45 (m, 4H, CH₂-5' & CH₂-6') 1,16 (t, 3H, J=7,0 Hz,

CH₃-7'); 1,44 (d, 3H, J=6,1 Hz, CH₃-3'), 3,72 (m, 2H, CH₂-4'); 5,08 (d, 1H, J=6,1 Hz, H-2'); 5,11 (d, 1H, J=5,0 Hz, H-4), 6,11 (d, 1H, J=5,0 Hz, H-4); 7,2-7,8 (m, 10 H, H-aromatic). HR-MS (ESI) C₂₀H₂₁NO₄Na [M+Na]⁺: dự kiến 362,1368; tìm thấy 362,1358.

7-TES-10-DAB 10: 5,4 g (1 mmol) 10-DAB (thu được từ cây Thông đỏ Lâm Đồng) hòa tan trong 50 ml pyridin, làm lạnh bình 0-5°C. Cho từ từ triethylsilan chlorid vào (10 mmol). Hệ phản ứng khuấy trong 48 h, sau đó chiết với nước và ethyl acetat (200 ml x 3). Pha hữu cơ gộp ethyl acetat lại, làm khan với Na₂SO₄. Lọc, cô cạn, phân lập bằng sắc ký cột thu được 5,3 g 7-TES-10-DAB (hiệu suất 80%). ¹H-NMR (DMSO-d₆, Bruker 500 MHz): δ ppm 0,50 (m, 6H, 3xCH₂-Si), 0,86 (m, 9H, 3xCH₃), 0,93 (s, 6H, CH₃-17, CH₃-16); 1,54 (s, 3H, CH₃-19); 1,65 (m, 1H, H-6a); 1,90 (s, 3H, CH₃-18); 2,16 (m, 2H, CH₂-14); 2,18 (s, 3H, OAc-29), 4,60 (m, 1H, CH-3), 2,40 (m, 1H, H-6b); 3,80 (d, 1H, J=7,0 Hz, CH-3); 4,03 (s, 2H, CH₂-20); 4,35 (m, 1H, CH-7); 4,36 (s, 1H, OH-1), 4,69 (d, 1H, J=3,0 Hz, OH-10); 4,91 (d, 1H, J=8,0 Hz, CH-5); 5,05 (d, 1H, J=3,0 Hz, CH-10); 5,30 (d, 1H, J=5,5 Hz, OH-13); 5,40 (1H, d, J=7,0 Hz, H-2); 7,40-8,10 (m, 5H, Ph). HR-MS (ESI) C₃₅H₅₀O₁₀SiNa [M+Na]⁺: dự kiến 681,3065; tìm thấy 681,3035.

7-TES-Baccain 11: 5,0 g (1 mmol) 10-DAB hòa tan trong 50 ml pyridin, làm lạnh bình 0-5°C. Cho từ từ acetyl clorid (5 mmol) và anhydric acetic (5 mmol). Hệ phản ứng khuấy trong 24 h, sau đó chiết với nước và ethyl acetat (200 ml x 3). Pha hữu cơ gộp lại, làm khan với Na₂SO₄. Lọc, cô cạn, phân lập bằng sắc ký cột thu được 6,3 g 7-TES-Baccain (hiệu suất 90%). ¹H-NMR (DMSO-d₆, Bruker 500 MHz): δ ppm 0,50 (m, 6H, 3 x CH₂); 0,85 (t, 9H, J=8Hz, 3 x CH₃); 0,93 (s, 3H, CH₃-16); 1,01 (s, 3H, CH₃-17); 1,52 (s, 3H, CH₃-19); 1,62 (m, 1H, H-6a); 2,01 (s, 3H, CH₃-18); 2,07 (s, 3H, OAc-4); 2,17 (m, 2H, CH₂-14); 2,19 (s, 3H, OAc-10); 2,45 (m, 1H, H-6b); 3,75 (d, 1H, J=7 Hz, CH-3); 4,02 (m, 2H, CH₂-20); 4,4 (dd, 1H, J=7, 10,5 Hz, CH-7); 4,50 (s, 1H, OH-1); 4,60 (m, 1H, CH-13); 4,90 (d, 1H, J=9,5 Hz, CH-5); 5,30 (d, 1H, J=5,5 Hz, OH-13); 5,42 (d, 1H, J=7 Hz, CH-2); 6,33 (s, 1H, CH-10); 7,5-8,0 (m, 5H, Ph). HR-MS (ESI) C₃₇H₅₂O₁₁SiNa [M+Na]⁺: dự kiến 723,3176; tìm thấy 723,3172.

Paclitaxel 12: hòa tan 1 g (3,2 mmol) 9, 0,5g (0,6 mmol) 11 và 80 mg (0,6 mmol) 4-DMAP trong 3 ml pyridin. Hỗn hợp khuấy ở nhiệt độ phòng 24 h. Hỗn hợp sau phản ứng chiết với ethyl acetat (3 x 20 ml) và dung dịch NaCl bão hòa. Pha hữu cơ tách ra, làm

khan với Na₂SO₄, lọc, cô cạn. Hỗn hợp thô hòa tan trong 20 ml ethanol. Cho vào 5 ml ethanol 0,5% HCl ở 0°C, khuấy cho đến khi phản ứng xảy ra hoàn toàn (TLC, 24h). Chiết hỗn hợp với dung dịch NaHCO₃ và ethyl acetat (3x30 ml). Pha hữu cơ tách ra, làm khan với Na₂SO₄, lọc, cô cạn. Phần thô thu được phân lập sử dụng sắc ký cột thu được Paclitaxel 12 (hiệu suất 90%). ¹H-NMR (DMSO-d₆, Bruker 500 MHz): δ ppm 1,04 (s, 3H, CH₃-17); 1,04 (s, 3H, CH₃-16); 1,53 (s, 3H, CH₃-19); 1,65 (m, 1H, H-6a); 1,75 (dd, 1H, J=9,0, 15,0 Hz, CH-14a); 1,81 (s, 3H, CH₃-18); 1,92 (dd, 1H, J=9,3, 15,0 Hz, CH-14b); 2,13 (s, 3H, OAc-10); 2,25 (s, 3H, OAc-4); 2,35 (m, 1H, H-6b); 3,64 (d, 1H, J=7,2 Hz, CH-3); 4,02 (d, 1H, J=8,2 Hz, CH-20a); 4,05 (d, 1H, J=8,2 Hz, CH-20b); 4,14 (dt, 1H, J=7,0, 11,0 Hz, CH-7); 4,61 (t, 1H, J=7,6 Hz, CH-2'); 4,71 (s, 1H, OH-1); 4,90 (d, 1H, J=7,0 Hz, OH-7); 4,93 (dd, 1H, J=1,7, 10 Hz, CH-5); 5,42 (m, 1H, CH-3'); 5,46 (d, 1H, J=7,0 Hz, CH-2); 5,90 (m, 1H, CH-13); 6,16 (d, 1H, J=7,6 Hz, OH-2'); 6,31 (s, 1H, OH-1); 7,22-8,00 (m, 15H, 3xPh); 8,9 (d, 1H, J=8,6 Hz, NH). HR-MS (ESI) C₄₇H₅₁NO₁₄SiNa [M+Na]⁺: dự kiến 876,3207; tìm thấy 876,3202.

Kết luận

Paclitaxel đã được tổng hợp thông qua sử dụng 10-DAB phân lập từ cây Thông đỏ lá dài trồng ở Lâm Đồng. Phản ứng thủy phân β-lactam sử dụng enzym đã giúp làm giảm số lượng các đồng phân tham gia các phản ứng khi tổng hợp nên mạch nhánh “side chain” của Paclitaxel. Việc nghiên cứu tiếp tục các phương pháp sinh học hoặc bán tổng hợp Paclitaxel từ 10-DAB là cần thiết để nâng cao hiệu suất của quy trình này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Wani M.C, Taylor H.L, Wall M.E (1971), *J Am Chem Soc.*, **93** (9), pp.2325-2327.
- [2] Robert A Holton (1984), *J. Am. Chem. Soc.* **106**, **19**, pp.5731-5732.
- [3] Danheiser L.R, Okamoto I, Lawlor D.M, Lee W.T (2003), *Org. Synth.*, **80**, pp.160-171.
- [4] Robert A Holton (1992), *US patent* 5175315.
- [5] Lei J, Yong Liang, and Jiaxi Xu (2006), *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, pp.6060-6069.
- [6] Bartłomiej Furman (1999), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, pp.217-224.
- [7] Ramesh N Patel (1999), *US patent* 5879929.
- [8] Sih Charles J (1993), *EP Patent* 0582469 A2.

Nghiên cứu định lượng Wedelolacton trong cao khô dược liệu Cỏ nhọ nổi bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Minh Túy*, Phan Hiền Lương, Ngô Thanh Hòa

Công ty cổ phần dược Danapha

Ngày nhận bài 7.5.2015, ngày chuyển phản biện 11.5.2015, ngày nhận phản biện 8.6.2015, ngày chấp nhận đăng 12.6.2015

Cỏ nhọ nổi có tên khoa học là *Eclipta alba* Hassk (hoặc *Eclipta prostrata* L.) thuộc họ cúc *Asteraceae*, có tác dụng bổ máu, cầm máu, bổ thận, giải độc gan... Trong đó, Wedelolacton là một dược chất sinh học quan trọng có tác dụng chữa bệnh của Cỏ nhọ nổi. Bài báo trình bày phương pháp nghiên cứu định lượng Wedelolacton trong cao khô dược liệu Cỏ nhọ nổi bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các điều kiện sắc ký: cột Acclaim 120 A°, C18 (100x4,6 mm, 3 µm); bước sóng phát hiện: 350 nm; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm: 20 µl; pha động: Acetonitrin - nước cất (ACN-H₂O) (23:77). Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp này đáp ứng các tiêu chí về: tính thích hợp, tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện. Do đó, có thể áp dụng để định lượng Wedelolacton trong cao khô Cỏ nhọ nổi, góp phần kiểm soát và nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng nguồn nguyên liệu sản xuất thuốc.

Từ khóa: Cỏ nhọ nổi, sắc ký lỏng hiệu năng cao, Wedelolacton.

Chỉ số phân loại 3.4

QUANTITATIVE RESEARCH OF WEDELOLACTON IN DRIED ECLIPTA PROSTRATA L. BY HPLC

Summary

This article presents a quantitative research of Wedelolacton in dried *Eclipta prostrata* L. by high performance liquid chromatography (HPLC). The method has been carried out by using a column C18 (100x4.6 mm, 3 µm) with the flow rate of mobile phase which is maintained at 1.0 ml per minute, the injection volume: 20 µl, and a mixture of acetonitrile and distilled water with the ratio 23:77 as mobile phase. A detector has been set up at 350 nm for Wedelolacton. The method has been validated in specificity, linear range, accuracy, precision.

Keywords: *Eclipta prostrata* L., high performance liquid chromatography, Wedelolacton.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Cỏ nhọ nổi có tên khoa học là *Eclipta prostrata* L. hoặc *Eclipta alba* (L) Hassk, từ lâu đã được sử dụng trong dân gian làm thuốc bổ máu, cầm máu bên trong và bên ngoài, chữa ho ra máu, có tác dụng bổ thận, giải độc gan, làm khỏe xương cốt [1, 2]... Một trong những thành phần hoạt tính sinh học quan trọng có tác dụng chữa bệnh của Cỏ nhọ nổi chính là Wedelolacton [3, 4]. Chất chuẩn Wedelolacton cũng đã được Viện Công nghệ Hóa học TP Hồ Chí Minh phân lập và cung cấp cho các đơn vị sử dụng.

Hiện nay, Công ty cổ phần dược Danapha đang sử dụng Cỏ nhọ nổi trong sản phẩm VG5 - một trong 3 sản phẩm tiêu biểu của Công ty, là kết quả của Dự án thuộc Chương trình khoa học và công nghệ trọng điểm cấp nhà nước giai đoạn 2011-2015 (KC10/11-15). Sản phẩm này có tác dụng hạ men gan, tăng cường chức năng gan, phục hồi tế bào gan và hỗ trợ điều trị viêm gan cấp và mạn tính.

Để góp phần đảm bảo chất lượng và hiệu quả trị liệu cho sản phẩm VG5, chúng tôi tiến hành “Nghiên cứu định lượng Wedelolacton trong cao khô dược

*Tác giả chính: Email: quangtri@danapha.com

liệu Cỏ nhọ nổi bằng phương pháp HPLC” làm cơ sở để nâng cấp tiêu chuẩn chất lượng cao Cỏ nhọ nổi, góp phần kiểm soát tốt chất lượng nguồn nguyên liệu đưa vào sản xuất sản phẩm VG5.

Thực nghiệm

Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

Thiết bị, dụng cụ: các thiết bị được hiệu chuẩn đạt yêu cầu của phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn GLP; hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Dionex Ultimax RSLC 3000 trang bị detector DAD; hệ thống HPLC Merck Hitachi D7000; cân phân tích ADN có độ chính xác 0,01 mg, các bình định mức và pipet...

Hóa chất, chất chuẩn: chất chuẩn đối chiếu Wedelolacton hàm lượng 98,0% do Viện Công nghệ Hóa học TP Hồ Chí Minh cung cấp; Acetonitrin loại dùng cho HPLC; Ethanol 70%, nước cất...

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: mẫu cao khô Cỏ nhọ nổi được sản xuất bởi Công ty cổ phần dược Danapha.

Phương pháp nghiên cứu:

Điều kiện sắc ký: cột Acclaim 120 A°, C18 (100x4,6 mm, 3 µm); bước sóng phát hiện: 350 nm; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm: 20 µl; pha động: Acetonitrin - nước cất (ACN-H₂O) (23:77).

Phương pháp xử lý mẫu:

- Dung dịch chuẩn: pha dung dịch chuẩn Wedelolacton trong Ethanol 70% để có nồng độ 10 µg/ml, sau đó lọc qua màng lọc 0,45 µm thu được dung dịch chuẩn.

- Dung dịch thử: cân chính xác khoảng 300 mg cao khô Cỏ nhọ nổi, cho vào bình định mức 50 ml, thêm Ethanol 70% đến vạch, lắc siêu âm trong 45 phút cho tan hoàn toàn. Để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc qua màng lọc 0,45 µm thu được dung dịch thử.

- Mẫu trắng: dung dịch Ethanol 70%, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Thẩm định quy trình phân tích với các tiêu chí: tính thích hợp, tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện.

Ứng dụng của phương pháp:

- Định tính: dựa vào 2 tiêu chí: 1. Thời gian lưu: so

sánh thời gian lưu của pic thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn Wedelolacton; 2. Phổ UV-Vis: so sánh phổ UV-Vis của pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn 2 phổ phải tương ứng với nhau.

- Định lượng: dựa trên diện tích pic thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn, tính hàm lượng Wedelolacton có trong cao khô dược liệu Cỏ nhọ nổi.

Kết quả và bàn luận

Kết quả

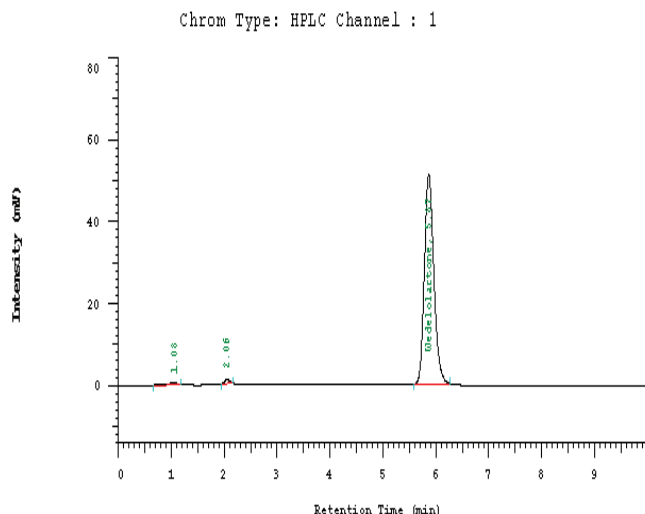
Tính thích hợp của hệ thống: tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch mẫu chuẩn Wedelolacton có nồng độ 10 µg/ml vào hệ thống sắc ký. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1: tính thích hợp của hệ thống sắc ký

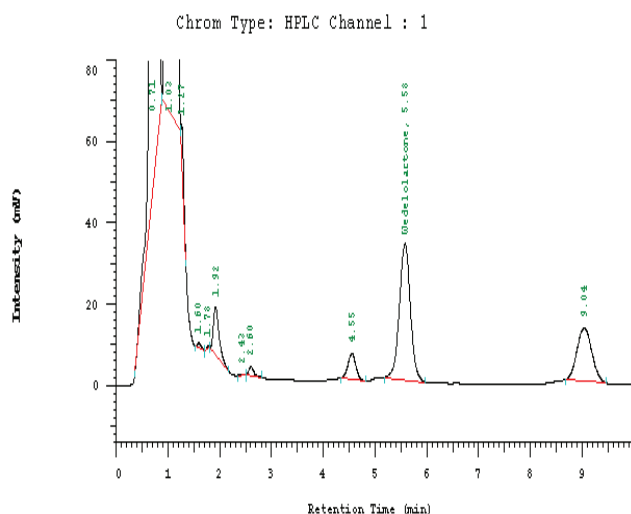
STT	Diện tích pic	Thời gian lưu
1	438790	5,87
2	437131	5,85
3	433983	5,84
4	433355	5,85
5	431009	5,86
6	421781	5,85
Trung bình (TB)	432675	5,85
Độ lệch chuẩn tương đối (RSD)	1,39%	0,18%
Số đĩa lý thuyết (N)	5363	
Hệ số đối xứng (T)	1,2	

Như vậy, hệ thống sắc ký có độ lặp lại tốt với RSD của thời gian lưu là $0,18 < 1\%$ và diện tích là $1,39 < 2\%$, hệ số đối xứng: 1,2 đáp ứng yêu cầu định lượng Wedelolacton.

Tính đặc hiệu: tiến hành tiêm các mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử vào hệ thống sắc ký theo điều kiện đã nêu trên. Kết quả phân tích cho thấy, trên sắc ký đồ, mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của Wedelolacton. Dung dịch thử cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic Wedelolacton thu được từ sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Phổ UV-Vis của dung dịch thử tương ứng với phổ của dung dịch chuẩn và có 1 cực đại hấp thụ ở bước sóng 351 ± 1 nm.



Hình 1: sắc ký đồ mẫu chuẩn Wedololacton

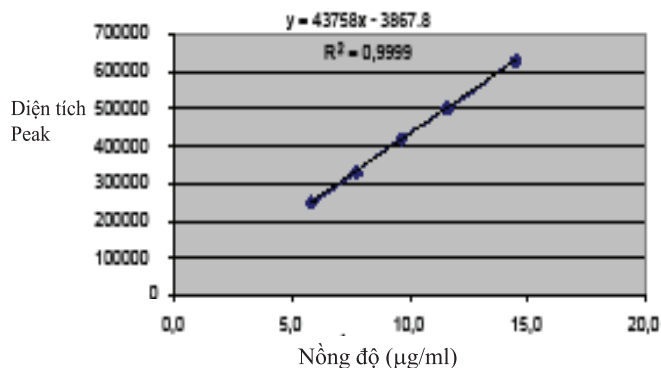


Hình 2: sắc ký đồ mẫu cao khô Có nhọ nôi

Tính tuyến tính: pha một dãy các dung dịch chuẩn trong Ethanol 70% có nồng độ Wedololacton từ 6,0 đến 15,0 µg/ml. Tiến hành sắc ký các dung dịch theo các điều kiện đã nêu. Kết quả thể hiện ở bảng 2 và hình 3.

Bảng 2: kết quả khảo sát tính tuyến tính

Dung dịch	1	2	3	4	5
Nồng độ (µg/ml)	5,8	7,7	9,7	11,6	14,5
Diện tích pic	248966	333196	421357	502086	629269
Phương trình hồi quy: $y = 43758x - 3867,8$ Hệ số tương quan: $r = 0,9999$					



Hình 3: đồ thị khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic Wedololacton

Kết quả cho thấy, trong khoảng nồng độ khảo sát từ 6,0 đến 15,0 µg/ml có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ Wedololacton với diện tích pic với hệ số tương quan $r \approx 1,000$. Khoảng xác định 80-120% của nồng độ định lượng, tương ứng nồng độ trong dung dịch thử là 8,0 đến 12,0 µg/ml Wedololacton: nằm trong khoảng tuyến tính.

Độ lặp lại và độ chính xác trung gian: độ lặp lại của phương pháp được xác định trên 6 mẫu thử khác nhau. Kết quả thu được ở bảng 3 và 4.

Bảng 3: độ lặp lại của phương pháp với hoạt chất Wedololacton - Kiểm nghiệm viên 1

Mẫu	Thử 1	Thử 2	Thử 3	Thử 4	Thử 5	Thử 6
Khối lượng cân (g)	0,29715	0,30128	0,30083	0,30000	0,30279	0,30273
Diện tích pic	477486	498759	505415	497747	502212	488071
Hàm lượng (%)	0,1792	0,1847	0,1874	0,1851	0,1850	0,1798
Số liệu thống kê	Hàm lượng TB = 0,1835%; n = 6; RSD = 1,77%					

Kết quả cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt, RSD = 1,77% (< 2,0%), đáp ứng yêu cầu định lượng.

Bảng 4: độ lặp lại của phương pháp với hoạt chất Wedololacton - Kiểm nghiệm viên 2

Mẫu	Thử 1	Thử 2	Thử 3	Thử 4	Thử 5	Thử 6
Khối lượng cân (g)	0,29715	0,30128	0,30083	0,30000	0,30279	0,30273
Diện tích pic	67130	68191	68245	66162	67805	65453
Hàm lượng (%)	0,1938	0,1942	0,1946	0,1892	0,1921	0,1855
Số liệu thống kê	TB = 0,192%; n = 6; RSD = 1,87%					

Kết quả cho thấy, phương pháp có độ lặp lại tốt, RSD = 1,87% (< 2,0%), đáp ứng yêu cầu định lượng.

Độ chính xác trung gian: tiến hành như phần độ lặp lại nhưng tiến hành trên hệ thống thiết bị khác, ngày làm khác và người làm khác. So sánh kết quả giữa 2 lần thí nghiệm. Kết quả được nêu ở bảng 5.

Bảng 5: độ chính xác trung gian

Mẫu	Hàm lượng Wedelolacton (%)	
	Kiểm nghiệm viên 1	Kiểm nghiệm viên 2
1	0,1792	0,1938
2	0,1847	0,1942
3	0,1874	0,1946
4	0,1851	0,1892
5	0,1850	0,1921
6	0,1798	0,1855
Trung bình	0,1835	0,1916
RSD (n = 6)	1,77%	1,87%
TB (KNV 1+2)	0,1876	
RSD (n = 12)	0,82%	

Kết quả cho thấy, RSD (n = 6) < 2,0% và RSD (n = 12) < 3,0% xác nhận độ chính xác của phương pháp đáp ứng yêu cầu.

Khảo sát độ đúng của phương pháp: sử dụng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử, chuẩn bị các mẫu giả định có nồng độ khoảng 80, 100, 120% so với lượng lý thuyết của Wedelolacton cần định lượng (10 µg/ml). Mỗi mức có 3 thí nghiệm, tiến hành phân tích theo phương pháp đã nêu trên. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6: độ đúng của phương pháp

Mẫu	Thể tích dung dịch A (ml)	Diện tích pic	Lượng tìm thấy thêm vào thu được (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Tỷ lệ phục hồi TB (%)
Thử 80%	3	337101	0,0586	0,0579	101,2	100,3
Thử 80%	3	336778	0,0585	0,0579	100,9	
Thử 80%	3	334024	0,0572	0,0579	98,8	
Thử 100%	5	425346	0,0980	0,0965	101,5	99,3
Thử 100%	5	418419	0,0949	0,0965	98,3	
Thử 100%	5	417929	0,0947	0,0965	98,1	
Thử 120%	7	508428	0,1351	0,1351	99,9	99,6
Thử 120%	7	502483	0,1324	0,1351	98,0	
Thử 120%	7	510965	0,1362	0,1351	100,8	

Kết quả cho thấy, hoạt chất Wedelolacton có khả năng thu hồi từ 98,0 đến 101,5%, nằm trong giới hạn cho phép trong thẩm định độ đúng của phương pháp (98-102%).

Xác định giới hạn phát hiện: giới hạn phát hiện là nồng độ nhỏ nhất mà thiết bị có thể phát hiện được.

Từ phương trình hồi quy khi khảo sát tính tuyến tính: $y = 43758x - 3867,8$ với $S = 2809,2$ suy ra giới hạn phát hiện (LOD) là: $3,3$. $S/a = 3,3$. $2809,2/43758 = 0,2$ (ppm).

Kết quả: giới hạn phát hiện Wedelolacton là 0,2 ppm.

Giới hạn định lượng: từ phương trình hồi quy khi khảo sát tính tuyến tính: $y = 43758x - 3867,8$ với $S = 2809,2$ suy ra giới hạn định lượng (LOQ) là: 10 . $S/a = 10$. $2809,2/43758 = 0,6$ (ppm).

Kết quả: giới hạn định lượng Wedelolacton là 0,6 ppm.

Kết luận

Kết quả khảo sát cho thấy, phương pháp nghiên cứu định lượng Wedelolacton trong cao khô dược liệu Cỏ nhọ nổi bằng HPLC đã đáp ứng các tiêu chí về: tính thích hợp, tính đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian, giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện. Do đó, có thể áp dụng phương pháp này để định lượng Wedelolacton trong cao khô Cỏ nhọ nổi.

Tài liệu tham khảo

- [1] Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, NXB Y học.
- [2] Đỗ Tất Lợi (2009), *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học.
- [3] Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tập 2.
- [4] Murali B, Amit A, Anand M.S, Samiulla D.S (2002), "Estimation of Wedelolactone and demethylWedelolactone in Eclipta alba Hassk by improved chromatographic analysis", *Journal of Natural Remedie*, **2(1)**, pp.99-101.

Các hợp chất anthraquinone phân lập từ rễ cây Nhó đông ở Việt Nam

Nguyễn Mạnh Cường*, Phạm Ngọc Khanh, Nguyễn Văn Tài, Đoàn Thị Vân
Vũ Thị Hà, Ngô Thị Phương, Lê Minh Hà, Phạm Quốc Long, Trần Thu Hương

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

Ngày nhận bài 14.4.2015, ngày chuyển phản biện 18.4.2015, ngày nhận phản biện 15.5.2015, ngày chấp nhận đăng 20.5.2015

Cây Nhó đông (*Morinda longissima* Y.Z Ruan, *Rubiaceae*) là một loại dược liệu rất có giá trị và đã được người dân tộc Thái ở Sơn La sử dụng trong điều trị các bệnh về gan và viêm đại tràng từ lâu đời. Việc phân lập và xác định được cấu trúc của các hợp chất anthraquinone từ cây Nhó đông là rất cần thiết, giúp các nhà khoa học hiểu thêm về cơ chế, tác dụng chữa bệnh của cây thuốc này. Trong nghiên cứu dưới đây, các nhà khoa học đã phân lập và xác định được cấu trúc của 7 hợp chất anthraquinone từ các phân tử rễ Nhó đông, bao gồm: (1) soranjidiol, (2) rubiadin, (3) rubiadin-3-methyl ether, (4) morindon, (5) lucidin- ω -methyl ether, (6) damnacanthol và (7) damnacanthol.

Từ khóa: cây Nhó đông, hợp chất anthraquinone, rễ.

Chỉ số phân loại 3.4

THE ANTHRAQUINONE COMPOUNDS FROM THE ROOTS OF MORINDA LONGISSIMA

Summary

Nho dong (*Morinda longissima* Y.Z Ruan, *Rubiaceae*) is a valuable medicinal plant and has been used to treat liver diseases and colitis by Thai's ethnic people in Son La for a long time. From the ethyl acetate fraction of roots of *Morinda longissima*, seven anthraquinones, including soranjidiol (1), rubiadin (2), rubiadin-3-methyl ether (3), morindon (4), lucidin- ω -methyl ether (5), damnacanthol (6) and damnacanthol (7) have been isolated. Their structures have been determined by using IR, ESI-MS and NMR (1D and 2D) spectroscopic methods.

Keywords: anthraquinone compounds, *morinda longissima*, roots.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Trong số 10 bệnh nguy hiểm nhất trên thế giới thì các bệnh về gan gây tỷ lệ tử vong cho con người đứng thứ 3, sau các bệnh về tim mạch và ung thư. Các bệnh về gan (liver diseases) bao gồm: viêm gan cấp, viêm gan mạn, viêm gan do virus, gan nhiễm mỡ, xơ gan, xơ gan cổ trướng, ung thư gan. Viêm gan virus là hiện tượng tế bào mô gan bị viêm và hủy hoại do sự đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với 1 trong 5 tác nhân virus viêm gan như: HAV, HBV, HCV, HDV và HEV [1]. Trong đó, viêm gan virus B (HBV) và C (HCV) là 2 bệnh hay gặp nhất, có thể dẫn tới xơ gan và ung thư gan. Theo ước tính của Tổ chức y tế thế giới, hơn 1/3 dân số thế giới đã từng bị nhiễm HBV, trong đó khoảng 400 triệu người mang HBV mạn tính (HBsAg dương tính). Hàng năm, trên thế giới có khoảng hơn một triệu người tử vong do biến chứng của viêm gan B mạn tính, xơ gan, ung thư gan và bệnh gan giai đoạn cuối [1]. Vì vậy, việc tìm kiếm và phát hiện các tác nhân chống viêm gan virus B nói chung, từ các nguồn cây thuốc cổ truyền nói riêng đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu.

Kiran & cs trong nghiên cứu gần đây đã phát hiện, dịch chiết methanol của lá cây *Cyathea gigantea* ở liều 100 và 200 mg/kg thể trọng có tác dụng bảo vệ gan đáng kể trên mô hình sử dụng paracetamol [2]. Dịch chiết methanol của cây *Halenia elliptica* (họ Gentianaceae) và cây *Gentiana aslepiadea* được phát hiện có tác dụng bảo vệ gan trên chuột bị gây tổn thương thực nghiệm bằng CCl₄ [3, 4].

*Tác giả chính: Email: nmcuong@inpc.vast.vn

Cho đến nay, các nghiên cứu đã cho thấy, nhóm các hợp chất anthraquinone có tác dụng kháng virus viêm gan. Cơ chế kháng virus của các tác nhân này đã được nghiên cứu giải thích trên cơ sở tác dụng chống oxy hóa, khả năng quét gốc tự do, ức chế tổng hợp ADN, ARN, ức chế virus xâm nhập, ức chế virus sao chép... Các hợp chất anthraquinone (emodin, damnacanthol, adriamycin...) có tác dụng ức chế tyrosin kinase đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của bệnh [5].

Ở Việt Nam, có khoảng 11 loài thuộc chi *Morinda*, trong đó có 6 loài được nhân dân hay dùng nhất để làm thuốc chữa các bệnh mụn nhọt, mẩn ngứa, ho hen, huyết áp, bệnh phụ nữ... gồm *Morinda citrifolia* L. (Nhàu), *Morinda cochinchinensis* D.C. (Nhàu Nam Bộ), *Morinda officinalis* How. (Ba kích), *Morinda persicaefolia* Buch. Ham. (Nhàu nước), *Morinda vilosa* Hook. (Nhàu lông) và *M. longissima* Y.Z Ruan (Nhó đông).

Cây Nhó đông (*Morinda longissima*) đã được đồng bào các vùng Sơn La, Lai Châu sử dụng, dưới dạng nước sắc hoặc cao mềm để chữa bệnh vàng da, viêm gan, xơ gan. Bộ phận dùng làm thuốc của cây Nhó đông là rễ, thu hái quanh năm, tốt nhất vào mùa thu. Rễ cây được đào về, rửa sạch, phơi hoặc sấy khô. Dược liệu có vị đắng, màu vàng, tính bình, không độc, có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, kiện tỳ, hoạt huyết, tiêu viêm, tán ứ, chữa viêm gan, vàng da, xơ gan. Đồng bào ở xã Chiềng An, thị xã Sơn La còn dùng rễ hoặc thân già (phần sát gốc rễ của cây Nhó đông phối hợp với rễ cây Hè mọ (*Psychotria*) để chữa bệnh viêm đại tràng và gan cho kết quả tốt [6]. Thuốc giúp người bệnh ăn ngủ được, hết vàng da, vàng mắt, đầy bụng.

Cao chiết ethanol của rễ cây Nhó đông có tác dụng tốt với bệnh nhân viêm gan mạn và các trường hợp suy giảm chức năng gan [7]. Cao chiết nước, cao chiết methanol của rễ cây Nhó đông có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây độc bằng CCl_4 hoặc paracetamol, chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt bằng amian, tăng lợi niệu trên chuột cống trắng [8-10].

Trong công bố trước đây, chúng tôi đã phân lập 4 hợp chất anthraquinone từ rễ cây Nhó đông bao gồm morindon, lucidin- ω -methyl ether, damnacanthol và damnacanthol [11]. Bài báo này công bố việc phân lập và xác định cấu trúc của 3 hợp chất anthraquinone khác bao gồm soranjidiol, rubiadin, rubiadin-3-methyl ether từ rễ cây Nhó đông.

Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

Thiết bị và nguyên liệu

Phổ khối ion hóa bụi điện tử ESI-MS được ghi trên máy LC-MSD-Trap-SL Agilent 1100 của Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sắc ký lớp mỏng TLC được thực hiện trên bản mỏng silicagel Merck 60 F₂₅₄, RP₁₈ F_{254s}. Sắc ký cột được thực hiện trên chất hấp phụ là silicagel Merck và cột sắc ký pha đảo RP-18 Merck.

Rễ cây Nhó đông được thu hái vào tháng 5.2012 tại Sơn La. Mẫu tiêu bản số C-501 được lưu giữ tại Phòng Hoạt chất sinh học, Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên.

Xử lý mẫu thực vật và chiết tách

Rễ khô cây Nhó đông (4,5 kg) được nghiền thành bột mịn, ngâm chiết với methanol ở nhiệt độ phòng, 3 lần, mỗi lần 1 ngày. Dịch chiết được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết tổng. Cặn chiết này được thêm nước cất và chiết phân bố lần lượt bằng n-hexan, ethyl acetat, sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết tương ứng: n-hexan (8 g), ethyl acetat (31,5 g) và cặn nước (38 g).

Cặn ethyl acetat được phân tách bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải với hệ dung môi gradient CH_2Cl_2 -MeOH (99:1-1:1) thu được 9 phân đoạn (F1-F9).

Phân đoạn F5 phân tách trên sắc ký cột silicagel với hệ dung môi EtOAc-MeOH (15:1) thu được 3 phân đoạn (F5.1-F5.3). Phân đoạn F5.2 tiếp tục cho chạy qua sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi MeOH-H₂O (5:1) thu được hợp chất **1** (5,1 mg).

Phân đoạn F7 được tiến hành phân tách trên sắc ký cột silicagel với hệ dung môi CH_2Cl_2 -EtOAc (7:1) thu được 4 phân đoạn (F7.1-F7.4). Phân đoạn F7.3 được phân tách trên sắc ký cột silicagel với hệ dung môi EtOAc-MeOH (12:1) thu được hợp chất **2** (8,1 mg).

Phân đoạn F8 được tiến hành phân tách trên sắc ký cột silicagel với hệ dung môi CH_2Cl_2 -MeOH-H₂O (25:1:0,05) thu được 3 phân đoạn (F8.1-F8.3). Phân đoạn F8.1 cho chạy qua sắc ký cột silicagel với hệ dung môi Hexan-EtOAc (5:1) thu được hợp chất **3** (8,0 mg).

Phân đoạn F7.2 được tinh chế bằng sắc ký cột

silicagel sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi MeOH-H₂O (4:1) thu được hợp chất **4** (7,0 mg).

Phân đoạn F2 phân tách trên sắc ký cột silicagel với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH (25:1) và thu được 4 phân đoạn (F2.1-F2.4). Phân đoạn F2.3 trên sắc ký cột silicagel với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH (20:1) thu được hợp chất **5** (6,5 mg). Phân tách tiếp phân đoạn F2.1 được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi hexan-EtOAc (8:1) thu được hợp chất **6** (19,8 mg).

Phân đoạn F8.3 được tinh chế bởi sắc ký cột silicagel với hệ dung môi CH₂Cl₂-EtOAc (9:1) thu được hợp chất **7** (5,6 mg).

Soranjidiol (1): chất bột màu vàng cam (C₁₅H₁₀O₄). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ 2,36 (s, H-11), 7,18 (dd, 8,5; 2,5 Hz, H-7), 7,54 (d, 2,5 Hz, H-5), 7,57 (d, 8 Hz, H-3), 7,68 (d, 7,5 Hz, H-4), 8,2 (d, 8,5 Hz, H-8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ 16,02 (q, C-11), 114,13 (d, C-5), 116,36 (s, C-9a), 119,80 (d, C-4), 122,62 (d, C-7), 126,07 (s, C-8a), 130,90 (d, C-8), 133,03 (s, C-4a), 135,95 (s, C-2), 137,44 (s, C-10a), 137,56 (d, C-3), 161,86 (s, C-1), 166,53 (s, C-6), 184,04 (s, C-10), 189,32 (s, C-9).

Rubiadin (2): chất bột vô định hình, màu vàng (C₁₅H₁₀O₄). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ 2,18 (s, H-11), 7,28 (s, H-4), 7,82 (m, H-6), 7,86 (m, H-7), 8,21 (dd, 7,0; 1,5 Hz, H-5), 8,30 (dd, 7,0; 1,5 Hz, H-8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ 8,04 (q, C-11), 107,40 (d, C-4), 108,97 (s, C-9a), 117,4 (s, C-2), 126,38 (d, C-8), 126,70 (d, C-5), 131,76 (s, C-4a), 132,91 (s, C-10a), 133,03 (s, C-8a), 134,44 (d, C-6), 134,55 (d, C-7), 162,46 (s, C-1), 162,90 (s, C-3), 181,87 (s, C-10), 186,25 (s, C-9).

Rubiadin-3-methyl ether (3): tinh thể hình kim, màu vàng cam. ESI-MS: *m/z* 269 [M+H]⁺ (C₁₆H₁₂O₄). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ 2,26 (s, H-11), 3,89 (s, 3-OCH₃), 7,55 (s, H-4), 7,80 (dt, 7,5; 1,0 Hz, H-6), 7,84 (dt, 8,0; 1,5 Hz, H-7), 8,20 (d, 8 Hz, H-5), 8,25 (d, 8 Hz, H-8). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ 8,99 (q, C-11), 60,59 (q, 3-OCH₃), 109,02 (d, C-4), 117,90 (s, C-2), 126,01 (d, C-5), 126,16 (s, C-9a), 126,61 (d, C-8), 132,06 (s, C-10a), 133,32 (d, C-6), 133,73 (s, C-4a), 134,51 (d, C-7), 134,55 (s, C-8a), 160,62 (s, C-3), 161,65 (s, C-1), 180,16 (s, C-9), 182,61 (s, C-10).

Morindon (4): chất bột màu vàng chanh. ESI-MS: *m/z* 270,7 [M+H]⁺ (C₁₅H₁₀O₅) [11].

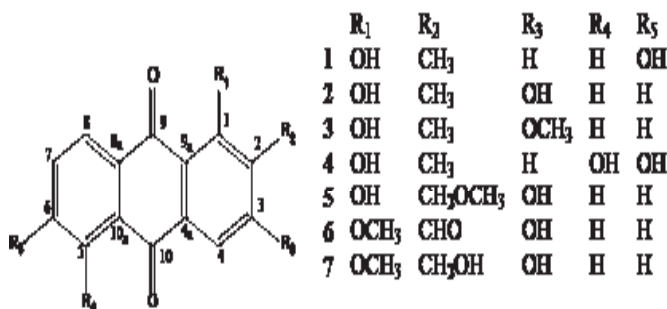
Lucidin-ω-methyl ether (5): chất bột màu vàng cam. ESI-MS: *m/z* 282,9 [M-H]⁻ (C₁₆H₁₂O₅) [11].

Damnacanthal (6): chất bột màu vàng nhạt, đ.n.c 195-196°C. ESI-MS: *m/z* 281 [M-H]⁻ (C₁₆H₁₀O₅) [11].

Damnacanthol (7): tinh thể màu vàng. ESI-MS: *m/z* 283 [M-H]⁻ (C₁₆H₁₂O₅) [11].

Kết quả

Cận chiết methanol của rễ cây Nhỏ đông được phân bố lần lượt bằng các dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần: n-hexan, ethyl acetat. Phân lập các phân chiết bằng sắc ký cột pha thường và pha đảo thu được 7 hợp chất anthraquinone gồm có soranjidiol (**1**), rubiadin (**2**), rubiadin-3-methyl ether (**3**), morindon (**4**), lucidin-ω-methyl ether (**5**), damnacanthal (**6**) và damnacanthol (**7**).



Hợp chất **4**, **5**, **6** và **7** có phổ ¹³C-NMR đều xuất hiện tín hiệu của 15-16 tín hiệu carbon trong đó có 12 carbon vòng thơm, đặc trưng cho nhóm hợp chất khung 9,10-anthraquinone. Phổ ¹H-NMR cũng cho thấy sự xuất hiện của 5 proton vòng thơm. Dựa vào các dữ liệu phổ MS, ¹H-NMR, DEPT, ¹³C-NMR, 2D và tài liệu tham khảo, xác định được 4 hợp chất **4**, **5**, **6** và **7** tương ứng là morindon [12, 13], lucidin-ω-methyl ether, damnacanthal và damnacanthol [11-13].

Hợp chất **1-3** có phổ NMR tương tự như các hợp chất **4-7**, do vậy các hợp chất **1-3** được xác định cũng là các dẫn chất khung anthraquinone. Hợp chất **1** được phân lập dưới dạng bột màu vàng cam, có công thức phân tử là C₁₅H₁₀O₄ (M = 254). Phổ ¹³C-NMR cho tín hiệu của 15 carbon, trong đó có 12 carbon vòng thơm trong khoảng δ_C 114,1 đến 166,5, 2 nhóm carbonyl đặc trưng của hợp chất 9,10-anthraquinone ở δ_C 184,0 và 189,3, 1 nhóm methyl ở δ_C 16,0. Phổ ¹H-NMR cho tín hiệu đặc trưng của nhóm methyl ở δ_H 2,36 (s, H-11) và 5 proton vòng thơm nằm trong khoảng δ_H 7,18-8,20. Kết hợp với các dữ liệu phổ 2D (HSQC, HMBC) và tài liệu tham khảo, xác định được chất **1** là soranjidiol [12].

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng bột vô định hình, có màu vàng với công thức phân tử là $C_{15}H_{10}O_4$ ($M = 254$). Phổ ^{13}C -NMR cho tín hiệu của 15 carbon, trong đó có 12 carbon vòng thơm trong khoảng δ_C 107,40 đến 162,90, 2 nhóm carbonyl đặc trưng của hợp chất 9,10-anthraquinone ở δ_C 181,9 và 186,3, 1 nhóm methyl ở δ_C 8,0. Phổ 1H -NMR cho tín hiệu đặc trưng của nhóm methyl ở δ_H 2,2 (s, H-11) và 5 proton vòng thơm nằm trong khoảng δ_H 7,3-8,3. Kết hợp với các dữ liệu phổ 2D (HSQC, HMBC) và tài liệu tham khảo, xác định được hợp chất **2** là rubiadin [12].

Hợp chất **3** được phân lập dưới dạng tinh thể kim màu vàng cam. Phổ khối ESI-MS của **3** cho pic ion dương $[M+H]^+$ ở m/z 269, tương ứng với công thức phân tử là $C_{16}H_{12}O_4$. Phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT của hợp chất **3** cho tín hiệu của 16 carbon bao gồm 1 nhóm methoxy, 1 nhóm methyl, 5 nhóm methyl vòng thơm, 7 carbon bậc 4, 2 nhóm carbonyl ở δ_C 180,2 và 182,6 đặc trưng cho hợp chất 9,10-anthraquinone. Trên phổ 1H -NMR thấy xuất hiện tín hiệu của 1 nhóm methoxy dạng singlet ở δ_H 3,89 (3H, 3-OCH₃), 1 nhóm methyl ở δ_H 2,26 (s, H-11) và 5 proton vòng thơm nằm trong khoảng δ_H 7,55-8,25. Kết hợp với các dữ liệu phổ 2D (HSQC, HMBC) và tài liệu tham khảo, xác định được hợp chất **7** là rubiadin-3-methyl ether [14].

Bàn luận

Như vậy, tương tự như một số loài thuộc chi *Morinda* như *Morinda citrifolia* L. (Nhàu, noni), *Morinda cochinchinensis* D.C (Nhàu Nam Bộ) và *Morinda officinalis* How. (Ba kích) thì thành phần hóa học chính của cây *Morinda longissima* (Nhó đông) là các hợp chất anthraquinone [15].

Từ cây *Morinda citrifolia* (cây Nhàu) đã có tới 18 anthraquinone được phân lập (có 3 chất mới), trong khi đó từ cây Nhó đông cũng phân lập được các hợp chất anthraquinone với hợp chất morindon có hàm lượng lớn nhất.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy, dịch chiết các loài *Morinda* có các tác dụng sinh học như hạ huyết áp, chống tiểu đường và bảo vệ gan. Một số loài chứa anthraquinone và các hợp chất anthraquinone đã được phát hiện có tác dụng bảo vệ gan và kháng virus viêm gan. Đặc biệt, trong nhiều nghiên cứu của Trung Quốc đã cho thấy tác dụng trị bệnh viêm gan B của rễ cây nhàu (*Morinda citrifolia*).

Bên cạnh đó, các nghiên cứu đã cho thấy, dịch chiết

methanol từ lá cây Nhàu có tác dụng ức chế virus viêm gan C với nồng độ 50% IC₅₀ ở 20,6; 6,1 và 6,6 µg/ml. Hợp chất pheophorbide và pyropheophorbide được tìm thấy trong lá cây Nhàu được xác định là những chất ức chế virus viêm gan C với IC₅₀ = 0,3 µg/ml và 0,2 µg/ml tương ứng [16]. Dịch nước của lá cây *Morinda lucida*, khi được thử nghiệm để xác định hoạt tính bảo vệ gan bị tổn thương do CCl₄, đã làm giảm đáng kể các chỉ số sinh hóa ALT, AST, GGT ở liều 300 mg/kg thể trọng trên thỏ [17].

Dịch chiết ethanol cây Đại hoàng *Rheum palmatum* L. đã được xác định là có tác dụng chống virus viêm gan B, cụ thể là ức chế HBV-DNA và HBsAg theo nồng độ với giá trị IC₅₀ ~ 212,36±11 µg/ml. Trong số các hợp chất anthraquinone phân lập từ cây Đại hoàng, hợp chất chrysophanol 8-O-beta-D-glucosid đã ức chế sự sinh sản của HBV-DNA với giá trị IC₅₀ ~ 36,98±2,28 µg/ml [18]. Có thể thấy, các hợp chất anthraquinone và chrysophanol 8-O-beta-D-glucosid là những chất tiềm năng để chống lại virus viêm gan B [18].

Chính vì vậy, các hợp chất anthraquinone đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Hợp chất anthraquinone rubiadin là chất được phân lập từ các loài thuộc chi *Rubia*, *Morinda* (họ Cà phê Rubiaceae) có hoạt tính bảo vệ gan bị tổn thương do CCl₄. Ở các liều 50, 100 và 200 mg/kg thể trọng, rubiadin có tác dụng làm giảm các chỉ số sinh hóa ALT, AST, SALP và γ -GT bị tăng cao do tác dụng của CCl₄. Hơn nữa, ở chuột được uống rubiadin, các chỉ số glutathion S-transferase và glutathion reductase cũng trở lại mức độ bình thường [19]. Rubiadin còn có tác dụng ngăn chặn sự tạo thành melondialdehyd trong tế bào gan và ngăn sự sụt giảm lượng glutathion trong gan. Emodin, một hợp chất anthraquinone khác, được quan tâm nghiên cứu được lý nhiều và chất này có tác dụng bảo vệ gan bị gây tổn thương trên cả hai mô hình paracetamol và CCl₄ cả cấp tính và mạn tính (xơ gan). Emodin được tìm thấy trong nhiều loài thực vật, đặc biệt nhiều từ loài *Morinda* như *M. officinalis* (Ba kích), *M. citrifolia* (Nhàu). Emodin ở liều từ 30 mg/kg thể trọng có khả năng bảo vệ tế bào gan khỏi tổn thương gây ra do paracetamol và CCl₄ [20, 21]. Emodin từ liều 80 mg/kg thể trọng có khả năng chống xơ gan ở chuột bị nhiễm độc mạn tính CCl₄ trên cơ sở ức chế các tế bào sao của gan [22, 23].

Về mặt cơ chế, các hoạt chất gốc anthraquinone như emodin, rubiadin... là các hoạt chất tiềm năng bảo

vệ gan khỏi các tác nhân tạo gốc tự do như CCl_4 . Hợp chất damnacanthal ức chế sự tự phosphoryl hóa với IC_{50} 17 nm, ức chế enzym xúc tác sự phosphoryl hóa với IC_{50} ~620 nM. Damnacanthal thể hiện là một chất ức chế thuận nghịch hoặc ức chế cạnh tranh với cơ chất peptid [5].

Như vậy, có thể thấy các cây thuốc thuộc chi *Morinda* nói chung và các hợp chất anthraquinone nói riêng cần được nghiên cứu sâu hơn theo định hướng đánh giá tác dụng bảo vệ gan, trị xơ gan và viêm gan virus.

Kết luận

Từ rễ cây Nhó đông, 7 hợp chất anthraquinone, bao gồm soranjidiol (1), rubiadin (2), rubiadin-3-methyl ether (3), morindon (4), lucidin- ω -methyl ether (5), damnacanthal (6) và damnacanthol (7) đã được phân lập và xác định cấu trúc. Đây là các hợp chất có tác dụng bảo vệ gan và kháng virus viêm gan.

Tài liệu tham khảo

- [1] World Health Organization (2012), *Prevention & Control of Viral Hepatitis Infection*, http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/GHP_framework.pdf?ua=1.
- [2] Kiran P.M, Raju A.V, Rao B.G (2012), "Investigation of hepatoprotective activity of *Cyathea gigantea* (Wall. Ex. Hook.) leaves against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats Asian Pacific", *J. Tropical Med.*, pp.352-356.
- [3] Huang B, Ban X, He J, Zeng H, Zhang P, Wang Y (2010), "Hepatoprotective and antioxidant effects of the methanolic extract from *Halenia elliptica*", *J. ethnopharmacol*, **131**, pp.276-281.
- [4] Mihailovic V, Mihailovic M, Uskokovic A, Arambasic J, Mistic D (2013), "Hepatoprotective effects of *Gentiana asclepiadea* L. extracts against CCl_4 -induced liver injury in rats", *Food Chem. Toxicol*, **52**, pp.83-90.
- [5] Lawrence D.S, Niu J (1998), "Protein Kinase Inhibitors The Tyrosine-Specific Protein Kinases", *Pharmacol. Therapeut*, **77**(2), pp.81-114.
- [6] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [7] Nguyễn Xuân Khu (2003), *Điều tra đánh giá hiệu quả bài thuốc nam của dân tộc Thái tỉnh Sơn La, chữa bệnh viêm gan mạn*, Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học, tỉnh Sơn La.
- [8] Đào Văn Phan, Lại Thị Vân (2003), "Tác dụng chống viêm, lợi niệu và độc tính cấp tính của cây Nhó đông trên thực nghiệm", *Tạp chí Nghiên cứu y học*, **25**(5), pp.3-7.
- [9] Đào Văn Phan, Lại Thị Vân, Nguyễn Duy Thuần (2008), "Tác dụng của cây Nhó đông trên tổn thương gan do paracetamol ở chuột cống trắng", *Tạp chí Dược liệu*, **8**(5), pp.139-142.
- [10] Phạm Minh Hưng, Nguyễn Duy Thuần, Đỗ Trung Đàm, Nguyễn Kim Phượng (2004), "Tác dụng bảo vệ gan của rễ cây Nhó đông trên tổn thương gan thực nghiệm", *Tạp chí Dược liệu*, **9**(3), pp.95-98.
- [11] Nguyễn Mạnh Cường, Nguyễn Văn Tài, Trần Thu Hương, Phạm Ngọc Khanh, Vũ Thị Hà, Ngô Thị Phương, Lê Minh Hà (2013), "Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học cây Nhó Đông (*Morinda longissima*)", *Tạp chí Hóa học*, **51**(2AB), pp.230-233.
- [12] Kamiya K, Hamabe W, Tokuyama S, Hirano K, Satake T, Yonezawa Y.K, Yoshida H, Mizushima Y (2010), "Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y- families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation", *Food Chemistry*, **118**, pp.725-730.
- [13] Banthorpe D.V, White J.J (1995), "Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of *Galium verum*", *Phytochemistry*, **38**(1), pp.107-111.
- [14] Ziming L.V, Shang Q, Chen R, Yu D (2011), "Alkaloids and anthraquinones from branches and leaves of *Uvaria kurzii*", *China Journal of Chinese Materia Medica*, **36**(9).
- [15] Lv L, Chen H, Ho C.T, Sang S (2011), "Chemical components of the roots of Noni (*Morinda citrifolia*) and their cytotoxic effects", *Fitoterapia*, **82**, pp.704-708.
- [16] Ratnoglik S.L, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H (2014), "Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites, pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus", *Microbiol Immunol*, **58**(3), pp.188-94.
- [17] Olubunmi B.O, Adewumi T.A, Oladayo A.J (2011), "Antihepatotoxic effects of aqueous extract of the leaves of *Morinda lucida*, Benth on ethanol-induced hepatotoxicity in rabbit", *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **5**(8), pp.285-291.
- [18] Li Z, Li L.J, Sun Y, Li J (2007), "Identification of natural compounds with anti-hepatitis B virus activity from *Rheum palmatum* L. ethanol extract", *Chemotherapy*, **53**(5), pp.320-326.
- [19] Rao G.M.M, Rao C.V, Pushpangadan P, Shirwaikar A (2006), "Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn", *J. Ethnopharmacol*, **103**, pp.484-490.
- [20] Bhadauria M (2010), "Dose-dependent hepatoprotective effect of emodin against acetaminophen-induced acute damage in rats", *Exp. Toxicol. Pathol.*, **62**, pp.627-635.
- [21] Lee B.H, Huang Y.Y, Duh P.D, Wu S.C (2012), "Hepatoprotection of emodin and *Polygonum multiflorum* against CCl_4 -induced liver injury", *Pharm. Biol.*, **50**(3), pp.351-359.
- [22] Zhan Y, Li D, Wei H, Wang Z, Huang X, Xu Q & Lu H (2000), "Emodin on hepatic fibrosis in rats", *Chin. Med. J. (Engl.)*, **113**(7), pp.599-601.
- [23] Dong M.X, Jia Y, Zhang Y.B, Li C.C, Geng Y.T, Zhou L, Li X.Y, Liu J.C, Niu Y.C (2009), "Emodin protects rat liver from CCl_4 -induced fibrogenesis via inhibition of hepatic stellate cells activation", *World J. Gastroentero.*, **15**(38), pp.4753-4762.

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

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 57 - Number 8 - August 2015

- 1** Applying autologous bone marrow stem cell in treatment of long bone nonunions, aseptic femoral head osteonecrosis and limb lengthening.
Nguyen Thi Thu Ha, Nguyen Manh Khanh...
- 7** Arthroscopic glenoid labrum suture combined with bone block in the anterior glenoid rim of the scapular for treating anterior instability of shoulder.
Nguyen Tien Binh, Vu Nhat Dinh
- 13** Investigating the clinical, subclinical features and the initial results on treatment in tracheal stenosis patients by performing endoscopic interventions.
Do Quyet, Nguyen Xuan Khai...
- 20** Results of treatment of liver trauma by laparoscopic surgery at Viet Duc Hospital.
Nguyen Tien Quyet, Hoang Long...
- 26** Study on embryo morphological changes after embryo biopsy for genetic diagnosis prior to embryo transfer.
Nguyen Dinh Tao, Quan Hoang Lam...
- 32** Research into producing a standard vaccine for Rotavin-M1 quality control.
Le Thi Luan, Nguyen Thi Yen...
- 36** The effects of cultivation time and number of transplantations in 30-liter bioreactor system on the growth and bioactive content of *Panax vietnamensis* cellmass.
Vu Tuan Anh, Chu Van Men
- 39** Differential scanning calorimetry of Paclitaxel with lipid excipients.
Truong Cong Tri, Duong Chi Toan...
- 43** Study on preparation of Liposome Amphotericin B.
Nguyen Tuan Quang, Pham Thi Minh Hue
- 47** Study on synthesis of tenofovir disoproxil fumarate.
Nguyen Van Tai, Nguyen Thi Ha...
- 51** Semi-synthetic Paclitaxel from 10-DAB isolated from *Taxus wallichiana* Zucc.
Tran Cong Luan, Vuong Chi Hung...
- 56** Quantitative research of Wedelolacton in dried *Eclipta prostrata* L. by HPLC.
Nguyen Minh Tuy, Ngo Thanh Hoa...
- 60** The Anthraquinone compounds from the roots of *Morinda longissima*.
Nguyen Manh Cuong, Tran Thu Huong...