



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 58 - Số 4 - Tháng 4 năm 2016

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 ứng dụng PET/CT sử dụng ^{18}F -FDG trong nhồi máu cơ tim, ung thư hạch và ung thư đại - trực tràng

Lê Ngọc Hà*, Mai Hồng Sơn, Phạm Nguyên Sơn
Nguyễn Cường Thịnh, Nguyễn Thị Minh Phương và cộng sự

Bệnh viện Trung ương quân đội 108

Ngày nhận bài 18.1.2016, ngày chuyển phản biện 21.1.2016, ngày nhận phản biện 22.2.2016, ngày chấp nhận đăng 26.2.2016

Mục tiêu của nghiên cứu gồm 3 nội dung: (1) tìm hiểu giá trị của PET/CT sử dụng ^{18}F -FDG trong đánh giá khả năng sống của cơ tim ở bệnh nhân (BN) sau nhồi máu cơ tim (NMCT); (2) đánh giá giai đoạn và đáp ứng điều trị hóa chất ở BN lymphoma; (3) chẩn đoán giai đoạn ở BN ung thư đại - trực tràng (UTĐTT) trước phẫu thuật và phát hiện tái phát ở BN UTĐTT sau phẫu thuật. 69 BN sau NMCT được đánh giá khả năng sống cơ tim bằng xạ hình SPECT tưới máu cơ tim và ^{18}F -FDG PET. Các BN cơ tim đồng miên được theo dõi chức năng thất trái bằng siêu âm sau 6 và 12 tháng tái tưới máu động mạch vành. 60 BN mắc bệnh hạch ác tính được lựa chọn vào nghiên cứu. Tất cả BN được chụp ^{18}F -FDG PET/CT toàn thân để đánh giá giai đoạn trước điều trị và theo dõi kết quả điều trị sau 3 chu kỳ và 6 chu kỳ hoá chất. 70 BN nghi ngờ UTĐTT nguyên phát và 40 BN UTĐTT nghi ngờ tái phát được chụp ^{18}F -FDG PET/CT để chẩn đoán giai đoạn và chẩn đoán tái phát, di căn. Hình ảnh PET/CT được so sánh với CT và kết quả mô bệnh học sau phẫu thuật. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 29% số BN có hình ảnh cơ tim đồng miên (hibernating). Nhóm BN cơ tim đồng miên với diện tích trên 10-20% thất trái được can thiệp tái tưới máu cải thiện chức năng tâm thu thất trái rõ rệt từ $40,5 \pm 5,18\%$ đến $48,3 \pm 4,05\%$. ^{18}F -FDG PET/CT phát hiện thêm nhiều tổn thương hạch và ngoài hạch làm tăng số BN lymphoma giai đoạn III, IV. Sau 3 chu kỳ hóa trị, 53,5% số BN lymphoma đáp ứng hoàn toàn, 33,3% đáp ứng một phần và tiếp tục được điều trị với phác đồ hoá chất. 11,8% số BN có dấu hiệu tiến triển và được thay đổi phác đồ điều trị hóa chất khác. Có mối liên quan chặt chẽ và sự phù hợp cao giữa hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT sau 3 chu kỳ và 6 chu kỳ điều trị hoá chất ở BN lymphoma. Đối với BN UTĐTT nguyên phát, ^{18}F -FDG PET/CT có độ nhạy 78% và độ đặc hiệu 84%, cao hơn so với CT (61 và 69%) trong chẩn đoán di căn hạch vùng. Hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT làm thay đổi giai đoạn bệnh ở 36,9%, đa số BN tăng giai đoạn. So với chụp CT, PET làm tăng số BN ở giai đoạn III từ 26,2 lên 32,3% và tăng số BN giai đoạn IV từ 18,4 lên 29,2% khi đánh giá bằng PET/CT. Trong chẩn đoán phát hiện tái phát, ^{18}F -FDG PET/CT có độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 67%, giá trị dự đoán dương tính 88%, giá trị dự báo âm tính 100% so với các giá trị tương ứng của CT là 43%, 100%, 100%, 43% và của CEA là 64%, 67%, 44%, 81%. Có thể kết luận, ^{18}F -FDG PET/CT là phương pháp có giá trị trong đánh giá khả năng sống của cơ tim và giúp định hướng cho điều trị tái tưới máu động mạch vành ở BN sau NMCT. ^{18}F -FDG PET/CT đánh giá giai đoạn tốt hơn CT ở BN lymphoma, đồng thời có khả năng đánh giá sớm kết quả điều trị hoá chất, định hướng chọn lựa phác đồ hoá chất phù hợp. ^{18}F -FDG PET/CT có giá trị trong chẩn đoán giai đoạn ở BN UTĐTT trước phẫu thuật và phát hiện di căn ở BN UTĐTT nghi ngờ tái phát sau phẫu thuật.

Từ khóa: nhồi máu cơ tim, PET/CT, ung thư đại trực tràng, ung thư hạch, ^{18}F -FDG.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

PET/CT là một kỹ thuật y học hạt nhân hiện đại được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực lâm sàng, đặc biệt là tim mạch, ung thư... PET ghi lại hình ảnh định tính và định lượng quá trình sinh bệnh lý và chuyển hóa của các bệnh lý thông qua được chất phóng xạ (DCPX) được đánh dấu. Sự kết hợp giữa PET và CT trong cùng

một hệ thống PET/CT cho phép khai thác tối ưu các lợi thế của PET là xác định hoạt tính chuyển hóa của tổ chức kết hợp với các thông tin xác định vị trí, biến đổi cấu trúc của tổn thương trên hình ảnh CT. Nhờ các tiến bộ không ngừng về công nghệ đã sản sinh ra các thế hệ PET/CT mới, sự phát triển liên tục các DCPX được nghiên cứu và sử dụng trong lâm sàng đã ngày càng

*Tác giả liên hệ: Email: bvtuqd108@benhvien108.com

Application of PET/CT using ^{18}F -FDG in myocardial infarction, lymphoma and colorectal cancer patients

Summary

This paper aimed (1) to demonstrate the benefit of ^{18}F -FDG PET/CT in myocardial viability assessment for post-myocardial infarction patients; (2) to evaluate the role of ^{18}F -FDG PET/CT in staging and distinguishing between responders and non-responders of lymphoma patients to standard treatment; and (3) to determine the value of ^{18}F -FDG PET/CT in staging of patients with preoperative and post-surgical colorectal cancer. Materials and methods: myocardial viability assessment was underwent in 69 post-myocardial infarction patients with left ventricular dysfunction by SPECT myocardial perfusion and ^{18}F -FDG PET/CT scan to assess myocardial viability. Left ventricular functions by echocardiography in 30 patients with myocardial hibernating were monitored at 6 and 12 months after coronary revascularization. A total of 60 consecutive lymphoma patients were newly diagnosed, and all these patients were undergone ^{18}F -FDG PET/CT scan before chemotherapy, after 3-cycle and 6-cycle treatment. A total of 70 patients who was diagnosed colorectal tumor by endoscopy with histology. The patients were scanned with ^{18}F -FDG PET/CT and conventional diagnostic imaging. The reference method selected was pathological histology when possible. 40 patients suspicious for colorectal cancer recurrences based on clinical symptoms or serum carcinoembryonic antigen (CEA) level were recruited to the study. All patients underwent conventional imaging and ^{18}F -FDG PET/CT. Sensitivity (SEN), specificity (SPE), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated using either histopathology or follow-up imaging as the standard of reference. The results showed that, myocardial hibernating was detected on ^{18}F -FDG PET imaging in 29% of 69 patients with post-myocardial infarction. EF% was improved significantly in groups of patients with large hibernating defect who was revascularized from $40.5 \pm 5.18\%$ to 48.3 ± 4.05 after 12 months. ^{18}F -FDG PET/CT could detect more nodal and extranodal lymphomas compared to CT imaging. After 3-cycle chemotherapy, the results showed that 53.5% patients with complete response (CR), 33.3% with partial response who was continuing the previous regime of chemotherapy (PR). Meanwhile, 11.8% who had PET-positive received an alternative chemotherapy regime. There were significant relationships between ^{18}F -FDG PET/CT imaging after 3-cycle and 6-cycle chemotherapy in lymphoma patients. Regarding to detection of regional lymph node metastases in pre-surgical colorectal cancer patients, ^{18}F -FDG PET/CT showed higher sensitivity (78%) and specificity (84%) than CT alone (61% and 69%, respectively). For distant metastase assessment, the sensitivity and specificity of ^{18}F -FDG PET/CT were 100% in all patients who had liver lesions. Regarding to detection of local recurrences, ^{18}F -FDG PET/CT showed sensitivity of 100%; specificity 67%; PPV 88%; NPV 100%. The SEN, SPE, PPV, NPV of conventional imaging was 43%, 100%, 100%, 43%, respectively. The value of CEA level was 64%, 67%, 44%, 81% in SEN, SPE, PPV and NPV respectively. The SEN, SPE, PPV, NPV of ^{18}F -FDG PET/CT in detecting lymph node metastases were 100%, 88%, 80% and 100% which are higher than those values of CT. The results suggest that outcome may be benefited using ^{18}F -FDG PET in an experienced center with ready access to ^{18}F -FDG and integration with imaging and revascularization teams. ^{18}F -FDG PET/CT has high potential to help clinicians make decision for further treatment of lymphoma patients. ^{18}F -FDG PET/CT is superior to conventional imaging in pre-surgical colorectal cancer, and ^{18}F -FDG PET/CT has high accuracy in the assessment of local recurrences and metastases impacting significantly in colorectal cancer patient management.

Keywords: colorectal cancer, consecutive lymphoma patients, myocardial infarction patients, PET/CT, ^{18}F -FDG.

Classification number 3.2

góp phần khẳng định vai trò quan trọng của phương pháp này trong y học hiện đại. Các nghiên cứu trên thế giới về vai trò của PET/CT đã cho thấy tầm quan trọng của phương pháp này trong nghiên cứu, chẩn đoán và định hướng điều trị [1-4]. Trong các ứng dụng của tim mạch hạt nhân, ^{18}F -FDG PET được coi là phương pháp chuẩn trong đánh giá khả năng sống còn của cơ tim ở BN mắc bệnh động mạch vành. Trong ung thư, PET/CT có vai trò chẩn đoán sớm, đánh giá giai đoạn, tiên lượng bệnh, đánh giá đáp ứng với điều trị, phát hiện tái phát... Sử dụng ^{18}F -FDG PET/CT giúp bác sỹ lâm sàng thay đổi chiến thuật điều trị khoảng 30-40% đối với BN ung thư và góp phần quyết định việc lựa chọn chiến thuật điều trị thích hợp. ^{18}F -FDG PET/CT mới được ứng dụng trong lâm sàng ở nước ta từ năm 2009 nên việc triển khai đề tài nghiên cứu có ý nghĩa lớn trong chẩn đoán và điều trị BN ung thư và tim mạch, đồng thời góp phần thúc đẩy sự phát triển, sản xuất DCPX của các trung tâm cyclotron và y học hạt nhân ở nước ta. Chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu ứng dụng PET/CT sử dụng ^{18}F -FDG trong NMCT, ung thư hạch và UTĐTT” nhằm các mục tiêu: 1. Ứng dụng ^{18}F -FDG PET/CT đánh giá khả năng sống của cơ tim ở BN sau NMCT; 2. Nghiên cứu ứng dụng ^{18}F -FDG PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn và đánh giá hiệu quả điều trị ở BN bệnh hạch ác tính; 3. Đánh giá hiệu quả của ^{18}F -FDG PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn trước phẫu thuật và phát hiện tái phát, di căn ở BN UTĐTT.

Đối tượng và phương pháp

Ứng dụng ^{18}F -FDG PET/CT đánh giá khả năng sống của cơ tim ở BN sau NMCT

Đối tượng nghiên cứu: 69 BN NMCT điều trị tại Viện Tim mạch, Bệnh viện Trung ương quân đội 108 từ tháng 10.2012 đến tháng 3.2015. Tiêu chuẩn lựa chọn: BN sau NMCT cấp hoặc bệnh thiếu máu cơ tim mạn tính; khuyết xạ cố định, mức độ nặng, không hồi phục trên xạ hình Tc99m-sestamibi hoặc khuyết xạ diện vừa - rộng, mức độ nặng, giảm nặng/mất vận động thành trên xạ hình tưới máu cơ tim Tc99m-sestamibi pha nghi; giảm chức năng tâm thu thất trái (EF% giảm < 50% trên siêu âm hoặc $\leq 40\%$ trên xạ hình SPECT).

Phương pháp nghiên cứu:

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu tiền cứu, theo dõi dọc.

Các bước tiến hành:

- Khám lâm sàng, siêu âm tim đánh giá chức năng thất trái.

- BN chụp xạ hình SPECT tưới máu cơ tim Tc99m-sestamibi và ^{18}F -FDG PET/CT đánh giá khả năng sống của cơ tim theo hướng dẫn của Hội y học hạt nhân Hoa Kỳ 2009 [5]. Đánh giá độ rộng tổn thương trên xạ hình tưới máu cơ tim được chia theo diện hẹp (5-10% cơ tim thất trái), trung bình (10-20% cơ tim thất trái), rộng (> 20% cơ tim thất trái) và mức độ nhẹ, vừa, nặng theo hướng dẫn của Hội y học hạt nhân Hoa Kỳ [5]. Đánh giá tổn thương dạng tương đồng tưới máu - chuyển hóa dạng “match” hoặc “mismatch” trên hình ảnh FDG PET và xạ hình tưới máu cơ tim với Tc99m-MIBI để xác định vùng cơ tim do nhồi máu hoặc cơ tim đông miên.

- Siêu âm dobutamine: được chỉ định với các BN có hình ảnh xạ hình không điển hình.

- Chụp động mạch vành: khi BN có chỉ định xem xét khả năng tái tưới máu động mạch vành.

- Điều trị: các BN được chỉ định điều trị nội khoa hoặc can thiệp tái tưới máu theo chỉ định của bác sỹ tim mạch lâm sàng (điều trị nội khoa; nong, đặt stent động mạch vành kết hợp nội khoa hoặc phẫu thuật + nội khoa).

- Theo dõi: tại thời điểm 6-12 tháng bao gồm cơn đau thắt ngực theo Hội tim mạch Canada, suy tim (NYHA)... Siêu âm tim trong 3-6 tháng/lần, đánh giá các thông số thể tích và chức năng thất trái (đánh giá EF% theo phương pháp Simpson). Theo dõi các biến cố tim mạch: tử vong do tim, NMCT, cơn đau thắt ngực không ổn định, suy tim.

Ứng dụng ^{18}F -FDG PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn và đánh giá hiệu quả điều trị ở BN bệnh hạch ác tính

Đối tượng nghiên cứu: 60 BN được chẩn đoán ULPAT được điều trị và theo dõi tại Khoa Huyết học lâm sàng, Bệnh viện Trung ương quân đội 108 từ tháng 11.2012 đến tháng 8.2015. Tiêu chuẩn lựa chọn: BN ULPAT mới được chẩn đoán và điều trị lần đầu, thể bệnh được khuyến cáo chụp PET để chẩn đoán giai đoạn ban đầu và đánh giá đáp ứng với điều trị theo Hướng dẫn thực hành lâm sàng của Mạng lưới ung thư toàn diện quốc gia Mỹ năm 2011; toàn trạng tốt

(ECOG 0-2); không có bệnh lý nặng kết hợp; BN đồng ý tham gia vào nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu:

Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang và theo dõi dọc.

Các bước tiến hành: chẩn đoán và đánh giá BN ULPAT theo hướng dẫn thực hành lâm sàng ung thư của Mạng lưới ung thư toàn diện quốc gia Mỹ năm 2011 (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Version 2.2011).

- BN được khai thác tiền sử bệnh, khám lâm sàng, cận lâm sàng đánh giá toàn trạng và các bệnh lý kết hợp.

- Sinh thiết hạch làm giải phẫu bệnh, hóa mô miễn dịch, các dấu ấn miễn dịch để chẩn đoán bệnh, thể bệnh và độ mô học.

- Chụp PET/CT chẩn đoán giai đoạn ban đầu.

- Chẩn đoán giai đoạn bệnh theo hệ thống Ann Arbor và Liên ủy ban ung thư Mỹ (American Joint Committee on Cancer-AJCC) phiên bản 7, năm 2010.

- Đánh giá yếu tố tiên lượng: theo chỉ số tiên lượng quốc tế (International Prognostic Index) năm 1993.

- Chụp PET/CT theo hướng dẫn của Hội y học hạt nhân châu Âu năm 2010 [2] đánh giá đáp ứng điều trị sớm và tiên lượng sau 2-3 chu kỳ điều trị hóa chất ban đầu (ABVD) cho bệnh Hodgkin và sau điều trị hóa chất (CHOP hoặc R-CHOP) cho ULPAT không Hodgkin. Nếu kết quả PET/CT dương tính (bệnh tiến triển) cần tiến hành thay đổi phác đồ điều trị.

- Theo dõi BN sau điều trị: BN được theo dõi định kỳ 2-4 tháng trong 12 tháng đầu gồm khám lâm sàng, các xét nghiệm huyết học và sinh hóa máu, chụp XQ phổi và CT định kỳ 6-12 tháng trong 2 năm đầu. Chụp PET/CT sau kết thúc 2-3 chu kỳ và sau 6 chu kỳ điều trị đánh giá đáp ứng với điều trị.

Nghiên cứu hiệu quả ứng dụng của ^{18}F -FDG PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn trước phẫu thuật và phát hiện tái phát, di căn ở BN UTĐTT

Đối tượng nghiên cứu: 70 BN nghi ngờ UTĐTT được chẩn đoán ban đầu và 40 BN UTĐTT tái phát sau phẫu thuật điều trị tại Khoa Nội tiêu hóa và phẫu thuật bụng, Bệnh viện Trung ương quân đội 108 từ tháng

10.2012 đến tháng 10.2014.

Phương pháp nghiên cứu:

Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang và theo dõi dọc.

Các bước tiến hành:

- BN lựa chọn theo tiêu chuẩn nghiên cứu được làm đầy đủ các xét nghiệm cận lâm sàng trước phẫu thuật: công thức máu, sinh hóa toàn bộ, các xét nghiệm CEA, siêu âm bụng tổng quát, chụp XQ tim phổi và CT vùng bụng - chậu.

- Chụp ^{18}F -FDG PET/CT toàn thân đánh giá giai đoạn. Chụp PET/CT chuyên biệt vùng bụng - chậu có thể tiêm thuốc cản quang nếu chưa được chụp CT chẩn đoán trong vòng 1 tháng trước đó. Tiêu chuẩn chẩn đoán UTĐTT ác tính nguyên phát được coi là dương tính với đặc điểm: hình ảnh ngấm thuốc cản quang, tăng chuyển hóa FDG khu trú so với các tổ chức mô mềm xung quanh ($\text{SUV}_{\text{max}} > 2,5$). Hạch vùng di căn kích thước $> 10 \text{ mm}$, tăng chuyển hóa ^{18}F -FDG (ngưỡng $\text{SUV}_{\text{max}} > 2,5$). Tổn thương di căn xa: ngấm thuốc cản quang, tăng chuyển hóa FDG ($\text{SUV}_{\text{max}} > 2,5$ đối với tổn thương ngoài gan và $\text{SUV}_{\text{max}} > 3,5$ đối với tổn thương gan) [6].

Xử lý số liệu: sử dụng phần mềm thống kê SPSS 18.0. So sánh các số trung bình bằng test t-student. So sánh các tỷ lệ bằng test Chi-square. Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê. Đối chiếu sự phù hợp giữa các phương pháp chẩn đoán bằng hệ số kappa. Đánh giá giá trị chẩn đoán bằng cách tính độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo âm và dương tính.

Kết quả nghiên cứu

Ứng dụng ^{18}F -FDG PET/CT đánh giá khả năng sống của cơ tim ở BN sau NMCT

1/3 số BN NMCT có khuyết xạ tương đồng tưới máu - chuyển hóa (perfusion-metabolism match) tương ứng với tổn thương sẹo cơ tim sau NMCT. 29% số BN có tổn thương khuyết xạ dạng không tương đồng giữa xạ hình tưới máu và chuyển hóa (perfusion-metabolism mismatch) tương ứng với vùng cơ tim đông miên (hibernating). 37,7% số BN có tổn thương sẹo NMCT kết hợp với vùng cơ tim đông miên. 66,7% số BN có tổn thương dạng đông miên và 49 BN (71%) có vùng sẹo cơ tim sau NMCT.

Trong số 69 BN chụp ^{18}F -FDG PET, 30 BN được đối chiếu với siêu âm dobutamine, sự phù hợp chẩn đoán giữa 2 phương pháp ở mức trung bình, với hệ số Kappa là 0,3; $p < 0,05$.

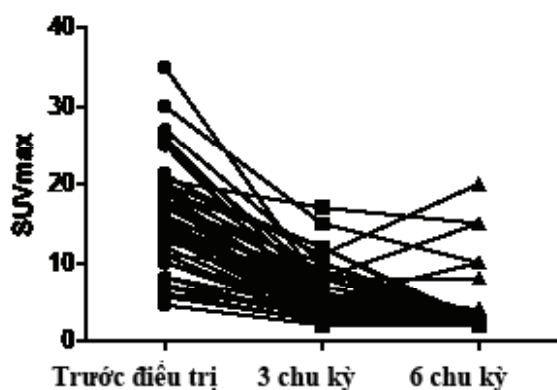
18 BN (39,1%) có diện cơ tim đồng miên mức độ trung bình (10-20% so với cơ tim thất trái) và 20 BN (43,5%) có cơ tim đồng miên diện rộng ($> 20\%$). Sẹo cơ tim sau NMCT mức độ rộng chiếm 51% và diện trung bình 34,7%. Sẹo NMCT diện hẹp ở 7/49 BN (chỉ chiếm 14,3%).

3 BN có tỷ lệ cơ tim đồng miên $< 10\%$ không cải thiện EF% rõ rệt ($> 5\%$) sau 12 tháng. Nhóm BN với tỷ lệ cơ tim đồng miên từ 10-20% diện tích cơ thất trái có tỷ lệ cải thiện EF% là 5/8 BN (62,5%) và nhóm BN tỷ lệ cơ tim đồng miên $> 20\%$ có tỷ lệ cải thiện chức năng tâm thu thất trái là 11/11 BN (100%) sau can thiệp tái tưới máu động mạch vành.

Ứng dụng ^{18}F -FDG PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn và đánh giá hiệu quả điều trị ở BN bệnh hạch ác tính

Hình ảnh PET/CT phát hiện tổn thương và làm thay đổi giai đoạn so với CT ở BN lymphoma. Dựa trên hình ảnh CT, 8% số BN được chẩn đoán ở giai đoạn III, IV. Hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT phát hiện thêm nhiều tổn thương hạch và ngoài hạch làm tăng số BN giai đoạn III, IV lên 30 BN (50%).

Dựa trên hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT sau 3 chu kỳ hoá chất, 32 BN (53,3%) đáp ứng hoàn toàn về mặt chuyển hoá; 33,3% đáp ứng một phần; 1,6% bệnh ổn định và 11,8% bệnh tiến triển. Các tỷ lệ tương ứng khi đánh giá trên CT là 25%, 58,4%, 8,3% và 8,3%.



Biểu đồ 1: sự thay đổi của SUVmax trước điều trị hóa chất, sau 3 và sau 6 chu kỳ hóa chất

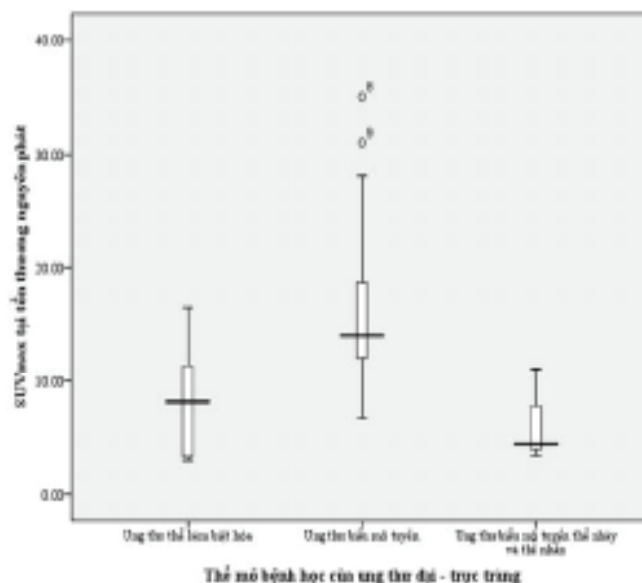
Giá trị SUVmax có xu hướng giảm rõ rệt sau các chu kỳ điều trị hoá chất. Nhóm BN không đáp ứng hoàn toàn sau 6 chu kỳ thường có SUVmax còn cao trên hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT sau 3 chu kỳ hoá chất.

Dựa trên lâm sàng và hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT sau 3 chu kỳ hoá chất, 86,6% số BN tiếp tục điều trị theo phác đồ hoá chất. 8/60 BN (13,4%) được thay đổi phác đồ hoá chất dựa trên lâm sàng và hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT sau 3 chu kỳ điều trị hoá chất.

Sau 3 chu kỳ hoá chất, 52 BN được tiếp tục điều trị phác đồ hoá chất ban đầu. Trong đó, 20 BN có hình ảnh PET/CT dương tính (đáp ứng một phần) và 32 BN có hình ảnh PET âm tính. Sau 6 chu kỳ hóa chất, 37 BN có hình ảnh PET/CT âm tính (đáp ứng hoàn toàn), 15 BN có hình ảnh PET/CT dương tính (đáp ứng một phần về mặt chuyển hoá). Kết quả PET/CT sau 3 chu kỳ hoá chất và 6 chu kỳ có sự phù hợp ở mức cao ($p < 0,05$).

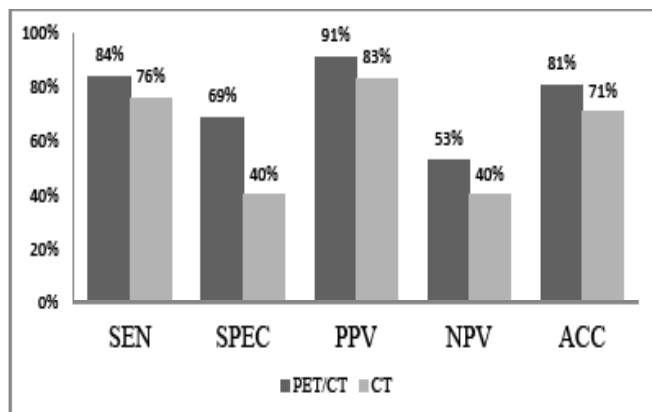
Nghiên cứu hiệu quả của ^{18}F -FDG PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn trước phẫu thuật và phát hiện tái phát, di căn ở BN UTĐTT

65 BN được đánh giá giai đoạn trên hình ảnh PET/CT, 36/65 khối UTĐTT ở giai đoạn T2-T3 trên PET/CT nhưng chỉ có 25 trường hợp ở giai đoạn này khi đối chiếu với kết quả sau phẫu thuật. 29 BN ở giai đoạn T4 trên PET/CT thì chỉ có 20 trường hợp ở giai đoạn T4 khi dựa vào đánh giá sau phẫu thuật. Sự phù hợp chẩn đoán giai đoạn T dựa trên PET/CT và kết quả phẫu thuật ở mức trung bình thấp ($k = 0,39$).



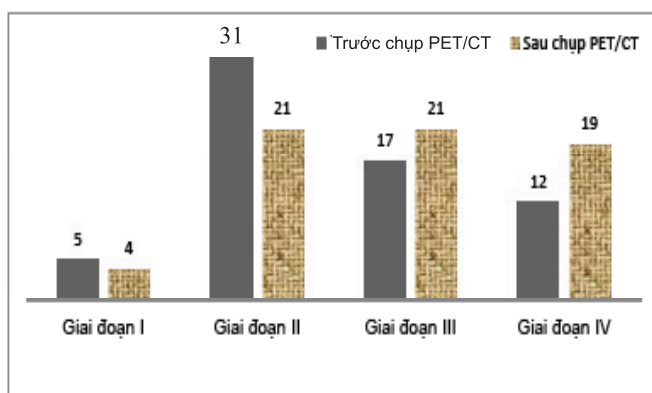
Biểu đồ 2: giá trị SUVmax trung bình giữa các thể mô bệnh học của UTĐTT

SUVmax trung bình của ung thư biểu mô tuyến và thể không biệt hóa cao hơn rõ rệt so với ung thư biểu mô tuyến nhầy ($p < 0,05$). Chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa chỉ số SUVmax trung bình tại tổn thương ung thư biểu mô tuyến và ung thư biểu mô không biệt hóa ($p > 0,05$).



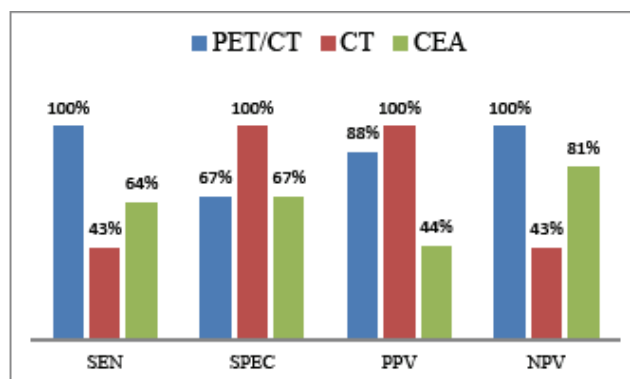
Biểu đồ 3: so sánh giá trị chẩn đoán di căn hạch vùng giữa CT và PET/CT

Độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác của FDG PET/CT trong chẩn đoán di căn hạch vùng là 84%, 69% và 81%, cao hơn các giá trị tương ứng của CT là 76%, 40% và 71% ($p < 0,01$). Di căn gan hay gặp nhất chiếm tỷ lệ 6,15% (4/65 ca), tiếp theo là di căn phổi, di căn phúc mạc, di căn xương với 3% (2/65 ca). Di căn xương thường ở dạng tổn thương đa ổ.



Biểu đồ 4: ^{18}F -FDG PET/CT thay đổi giai đoạn ở BN UTĐTT

Hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT làm thay đổi giai đoạn bệnh ở 24 BN (36,9%), đa số BN tăng giai đoạn. So với chụp CT, PET làm tăng số BN ở giai đoạn III từ 17 BN (26,2%) lên 21 BN (32,3%). Tăng số BN giai đoạn IV từ 12 BN (18,4%) sau khi chụp CT lên 19 BN (29,2%) khi đánh giá bằng PET/CT.



Biểu đồ 5: so sánh giá trị của PET/CT, CT và CEA trong chẩn đoán tổn thương tái phát của UTĐTT

Trong chẩn đoán phát hiện tái phát, ^{18}F -FDG PET/CT có độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 67%, giá trị dự đoán dương tính 88%, giá trị dự báo âm tính 100%. Các giá trị tương ứng của CT là 43%, 100%, 100%, 43% và của CEA là 64%, 67%, 44% và 81%.

Bàn luận

^{18}F -FDG PET/CT trong đánh giá khả năng sống của cơ tim ở BN sau NMCT

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 1/3 số BN NMCT có khuyết xạ tương đồng tưới máu - chuyển hoá (perfusion-metabolism match) tương ứng với tổn thương sẹo cơ tim sau NMCT. 29% số BN có tổn thương khuyết xạ dạng không tương đồng giữa xạ hình tưới máu và chuyển hoá (perfusion-metabolism mismatch) tương ứng với vùng cơ tim đông miên (hibernating). 37,7% số BN có tổn thương sẹo NMCT kết hợp với vùng cơ tim đông miên. Như vậy, 66,7% số BN có tổn thương dạng đông miên và 71% số BN có vùng sẹo cơ tim sau NMCT. Trong số 69 BN chụp ^{18}F -FDG PET, 30 BN được đối chiếu với siêu âm dobutamine, sự phù hợp chẩn đoán giữa 2 phương pháp ở mức trung bình với hệ số Kappa là 0,3 với $p < 0,05$. Tổng hợp 8 nghiên cứu trên 290 BN sử dụng siêu âm dobutamine liều cao đã thấy độ nhạy, đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính (PPV) và giá trị dự báo âm tính (NPV) lần lượt là 83%, 79%, 73% và 85%. Các nghiên cứu đối chứng giữa siêu âm gắng sức bằng dobutamine và FDG PET trong đánh giá khả năng sống còn của cơ tim cho thấy FDG PET có độ nhạy cao nhất, giá trị dự báo âm tính cao hơn. Trái lại, siêu âm dobutamine có độ đặc hiệu và giá trị dự báo dương tính khả năng phục hồi chức năng thất trái sau can thiệp tái tưới máu cao hơn. Trong tim mạch lâm sàng, do những ưu điểm của siêu âm dobutamine

như sẵn có, giá thành không cao, có thể triển khai được ở nhiều cơ sở tim mạch... nên phương pháp này đã được sử dụng rộng rãi và có thể đối chiếu với hình ảnh ^{18}F -FDG PET trong những trường hợp cần thiết. Tuy nhiên, siêu âm dobutamine đòi hỏi phải được tiến hành bởi bác sĩ siêu âm được đào tạo chuyên sâu, có nhiều kinh nghiệm lâm sàng và phân tích kết quả. Nhược điểm của phương pháp này là đánh giá mang tính chủ quan, nhiều trường hợp không đánh giá chính xác do BN không có “cửa sổ siêu âm” do các bệnh lý hô hấp như khí phế thũng, COPD.

Kết quả đánh giá theo dõi 12 tháng ở 22 BN sau can thiệp tái tưới máu cho thấy, có sự cải thiện EF có ý nghĩa thống kê ở các BN được tái tưới máu ở nhóm BN cơ tim đông miên diện trung bình và rộng ($p < 0,05$). Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng, cải thiện chức năng thất trái sau biện pháp can thiệp tái tưới máu có liên quan mật thiết với độ rộng của vùng cơ tim còn khả năng sống. Theo nghiên cứu của Kauffman và cs, những BN sau NMCT có tổn thương khuyết xạ diện rộng ($\geq 20\%$), tổng điểm khuyết xạ thiếu máu cao $\geq 10\%$ thì nên chụp động mạch vành và xét chỉ định can thiệp tái tưới máu [7]. Ngược lại, những BN có vùng khuyết xạ hẹp $< 10\%$ và diện thiếu máu diện hẹp $< 10\%$ diễn tích cơ thất trái thì chỉ nên điều trị nội khoa bảo tồn. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh NMCT trên xạ hình biểu hiện bằng đặc điểm khuyết xạ có hồi phục, điểm chênh lệch giữa pha nghỉ và gắng sức lớn và có vùng cơ tim đông miên có liên quan mật thiết tới biện pháp can thiệp tái tưới máu. Hiện nay, nhiều nghiên cứu đang được tiến hành để xác định và chọn ngưỡng diện rộng của tổn thương cơ tim đông miên để định hướng cho việc điều trị tái tưới máu một cách hiệu quả nhất. Tuy nhiên, do số lượng BN được tái tưới máu còn ít, thời gian theo dõi chưa đủ dài, nên cần có những nghiên cứu lớn hơn, đánh giá diện cơ tim đông miên bằng nhiều phương pháp với số lượng BN được can thiệp tái tưới máu và thời gian dài hơn mới có thể trả lời được vấn đề này.

^{18}F -FDG PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn và đánh giá hiệu quả điều trị ở BN bệnh hạch ác tính

Đánh giá giai đoạn trước điều trị nhằm xác định mức độ lan rộng của bệnh và định hướng điều trị ở BN ULPAT. Hệ thống phân loại Ann Arbor ra đời ban đầu sử dụng để phân biệt các BN có thể xạ trị và BN điều trị hoá chất. Hiện nay, sự ra đời của ^{18}F -FDG PET/

CT còn cho phép cung cấp những thông tin bổ sung cùng với các phương pháp kinh điển nêu trên. Do khả năng phát hiện những biến đổi chuyển hoá thường đến sớm hơn biến đổi về kích thước và cấu trúc nên ^{18}F -FDG PET phát hiện thêm nhiều tổn thương và làm thay đổi giai đoạn so với các phương pháp chẩn đoán hình ảnh thông thường. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nếu chỉ dựa vào khám lâm sàng và các phương pháp chẩn đoán hình ảnh thông thường như CT thì chỉ có 8% được chẩn đoán ở giai đoạn III, IV. Tuy nhiên, ^{18}F -FDG PET/CT phát hiện thêm tổn thương hạch và ngoài hạch làm tăng số BN giai đoạn III, IV lên 50%. So sánh với đánh giá giai đoạn trước khi chụp ^{18}F -FDG PET/CT toàn thân, chúng tôi nhận thấy hầu hết là tăng giai đoạn (upstaging). Bangerter M và cs so sánh giá trị của CT và siêu âm với ^{18}F -FDG PET ở 44 BN mới chẩn đoán bệnh Hodgkin và nhận thấy ^{18}F -FDG PET làm thay đổi giai đoạn và điều trị ở 14% số BN, trong đó chủ yếu là nâng giai đoạn bệnh và chỉ có 1 BN giảm giai đoạn bệnh. Nghiên cứu của Young C.S và cs cũng nhận thấy PET có độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự đoán dương và âm tính đều là 100%, cao hơn hẳn so với của CT tương ứng là 20%, 83%, 50% và 56%. PET làm thay đổi giai đoạn bệnh ở 59% số BN bệnh Hodgkin, trong đó đa số là nâng giai đoạn bệnh. Nghiên cứu của Stumpe K.D và cs cho thấy PET có độ nhạy 87,5% và độ đặc hiệu 100% trong chẩn đoán giai đoạn ban đầu bệnh Hodgkin và độ nhạy 83,3%, độ đặc hiệu 100% trong chẩn đoán giai đoạn ban đầu ULPAT không Hodgkin.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ BN có kết quả PET (+) và PET/CT (-) đánh giá sau 3 chu kỳ với kết quả điều trị đánh giá sau 6 chu kỳ chụp PET/CT ($p < 0,05$). Một nghiên cứu ở Anh với 85 BN được chụp PET nhắc lại sau 2 đến 3 chu kỳ hóa chất và theo dõi trung bình 3,3 năm cho thấy, 63 BN có kết quả PET âm tính, 9 BN còn bắt giữ tối thiểu ở tổ chức tồn dư (MRU) và 13 BN có kết quả PET dương tính [8]. Trong nhóm PET dương tính, có 9 BN tiến triển bệnh và 2 BN tử vong. Phân tích thời gian sống thêm cho thấy, có mối liên quan chặt chẽ giữa kết quả PET đánh giá sớm và thời gian sống bệnh không tiến triển (PFS) ($p < 0,0001$) và thời gian sống thêm toàn thể (OS) ($p < 0,03$). PFS 5 năm là 91,5% và 38,5% tương ứng ở nhóm PET âm tính và PET dương tính. Giá trị dự báo dương tính của

FDG PET độc lập với giai đoạn bệnh. Tất cả BN ở giai đoạn tiến triển có PET dương tính giữa chu kỳ hóa chất đều bị tái phát trong 2 năm. Ở các trung tâm sử dụng PET đánh giá sớm trong quá trình điều trị, chụp PET sau 2 chu kỳ hóa chất thường được chỉ định và là sự lựa chọn tốt nhất hiện nay [9]. Điều đó thể hiện một sự cân bằng giữa liều lượng hóa chất đủ để đánh giá thoái lui hoàn toàn (complete remission: CR) và tiến hành đánh giá đủ sớm thể hiện mức độ nhạy cảm hóa chất và tiên lượng tốt (sự khác biệt giữa PET đánh giá sớm và đánh giá thoái lui muộn thường mang ý nghĩa tiên lượng nhiều hơn).

Nghiên cứu hiệu quả của ^{18}F -FDG PET/CT trong chẩn đoán giai đoạn trước phẫu thuật và phát hiện tái phát, di căn ở BN UTĐTT

Trong nghiên cứu của chúng tôi, đối với các BN UTĐTT đã được chụp CT cản quang tĩnh mạch, khi tiến hành chụp ^{18}F -FDG PET/CT toàn thân chỉ sử dụng CT liều thấp với các thông số chuyên biệt cho vùng bụng và thuốc cản quang đường uống để đánh giá tổn thương lòng đại - trực tràng và tham khảo đối chiếu với hình ảnh CT cản quang sẵn có. Đối với các BN chưa chụp CT cản quang tĩnh mạch, chúng tôi sử dụng quy trình chụp PET/CT toàn thân liều thấp, sau đó chụp ^{18}F -FDG PET/CT chuyên biệt vùng bụng có tiêm thuốc cản quang tĩnh mạch. Áp dụng quy trình này, chúng tôi vừa đánh giá được tình trạng di căn xa trên xạ hình PET toàn thân, đồng thời cũng thăm dò chi tiết tổn thương tại khối u và di căn hạch vùng... Giá trị SUVmax trung bình tại tổn thương u nguyên phát đại - trực tràng là $14,6 \pm 6,38$ với giá trị dao động khá lớn (từ 3-35). Kết quả nghiên cứu cho thấy, không có sự khác biệt về SUVmax giữa các nhóm phân chia theo hình thái tổn thương trên nội soi tiêu hóa ($p > 0,05$) nhưng SUVmax trung bình của tổn thương nguyên phát giai đoạn T3 và T4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với u ác tính nguyên phát ở giai đoạn T2 ($p < 0,05$). Tuy nhiên, khi so sánh độ bắt giữ tại giữa tổn thương u nguyên phát T3 và T4, giá trị SUVmax khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Đặc biệt, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị SUVmax giữa các tuýp mô bệnh học. SUVmax có giá trị cao nhất ở tổn thương ung thư dạng biểu mô tuyến và ung thư dạng không biệt hoá. Đặc biệt, đối với UTĐTT dạng biểu mô tuyến nhày và tế bào nhẵn, giá trị SUVmax thường chỉ tăng

nhẹ ($5,5 \pm 3,23$ và $3,6$) và thấp hơn nhiều so với các thể mô bệnh học khác. SUVmax trung bình tại tổn thương ung thư biểu mô tuyến và thể không biệt hóa cao hơn rõ rệt so với ung thư biểu mô tuyến nhày ($p < 0,01$). Tham khảo y văn ngoài nước, một số nghiên cứu trên thế giới cũng có nhận xét tương tự. Điều này được lý giải là khả năng bắt giữ ^{18}F -FDG phụ thuộc nhiều vào các đặc tính chuyển hoá và mật độ của tế bào ác tính. Trong ung thư biểu mô tuyến nhày và tế bào nhẵn, mật độ tế bào ung thư thấp hơn trong tổn thương ác tính khác thay vì có nhiều chất nhày và các dạng tổ chức không có ái lực bắt giữ và chuyển hoá ^{18}F -FDG. Trong thực hành lâm sàng, đối với các khối u ác tính đại trực tràng dạng biểu mô tuyến nhày, khi phân tích hình ảnh ^{18}F -FDG PET, cần lưu ý đến đặc tính bắt giữ ^{18}F -FDG không cao tại khối u nguyên phát cũng như hạch di căn khu vực và di căn xa là nguyên nhân dẫn đến khả năng có thể bỏ sót tổn thương (âm tính giả). Trong nghiên cứu của chúng tôi, một số BN ung thư biểu mô tuyến nhày và thể tế bào nhẵn có di căn nhưng mức độ bắt giữ ^{18}F -FDG không cao. Một BN ung thư biểu mô tế bào nhẵn di căn gan và phúc mạc mà không có dấu hiệu bắt giữ ^{18}F -FDG khu trú trên hình ảnh PET nhưng có dấu hiệu ngấm thuốc cản quang khu trú trên CT cản quang. Trong những trường hợp này, đối chiếu với hình ảnh CT cản quang chẩn đoán hoặc quy trình chụp ^{18}F -FDG PET/CT chuyên biệt vùng bụng có tiêm thuốc cản quang sẽ góp phần tăng mức độ tin cậy chẩn đoán và khắc phục nhược điểm nêu trên của ^{18}F -FDG PET/CT toàn thân sử dụng CT liều thấp và không sử dụng thuốc cản quang tĩnh mạch.

Một số nghiên cứu cho thấy, việc phát hiện hạch di căn và điều trị thích hợp ở BN UTĐTT có thể giảm tỷ lệ sống thêm sau 5 năm. Tiêu chuẩn chẩn đoán hạch di căn trên CT dựa vào kích thước, hạch có đường kính thước nhỏ hơn 10 mm có thể bị bỏ qua và cho là hạch sinh lý nếu dựa vào các tiêu chuẩn chẩn đoán của các phương pháp chẩn đoán hình ảnh thông thường. Trên hình ảnh ^{18}F -FDG PET/CT, đối với những hạch có đường kính nhỏ hơn 10 mm nhưng tăng chuyển hóa FDG thì chưa thể loại trừ là hạch di căn. Nghiên cứu của chúng tôi đã thấy ^{18}F -FDG PET/CT có độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính và giá trị dự báo âm tính cao hơn so với CT. Một nghiên cứu khác của Kwak và cs cho kết quả thấp hơn với độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo âm tính, giá trị dự báo dương tính

lần lượt là 60%, 66%, 60% và 63% [10]. Điều này có thể được lý giải do nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới tính các giá trị chẩn đoán dựa vào từng tổn thương, còn nghiên cứu của chúng tôi dựa vào tổn thương trên BN. Hơn nữa, trong nghiên cứu của chúng tôi, quy trình chụp PET/CT chuyên biệt vùng bụng - chậu có tiêm cản quang được sử dụng để nâng cao tính chính xác trong chẩn đoán. Vì vậy, ^{18}F -FDG PET/CT có tiêm cản quang vùng bụng - chậu chỉ ra được nhiều tổn thương hạch vùng hơn, đặc biệt là các hạch cạnh đại trực tràng. Bên cạnh giá trị phát hiện tổn thương, ^{18}F -FDG PET/CT nhờ kết hợp hình ảnh chức năng và hình ảnh giải phẫu còn định vị được vị trí của từng nhóm hạch, định hướng cho các phẫu thuật viên khi mổ vét hạch cho BN.

Bên cạnh chẩn đoán tổn thương tái phát tại chỗ, di căn hạch vùng, ^{18}F -FDG PET/CT còn rất hữu ích trong chẩn đoán di căn xa. Trong UTĐTT, di căn gan có tỷ lệ rất cao. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 2 trường hợp nghi ngờ di căn gan trên hình ảnh CT nhưng không bắt giữ FDG trên PET. BN được chụp xạ hình với Tc-99m gắn hồng cầu, kết quả cho thấy 2 tổn thương gan trên là u mao mạch lành tính. Những trường hợp còn lại, tổn thương gan trên cả CT và PET/CT đều ở dạng đa ổ, bắt giữ FDG, điển hình cho di căn gan. Bên cạnh đó, ^{18}F -FDG PET/CT còn phát hiện thêm tổn thương di căn ở phúc mạc, hạch rốn gan, thượng thận và đặc biệt là phổi. Những tổn thương phát hiện thêm được trên ^{18}F -FDG PET/CT như di căn gan đa ổ và di căn ngoài gan như xương, phổi, phúc mạc tương ứng với tiên lượng xấu cho BN vì không thể phẫu thuật được. Do số lượng BN trong nghiên cứu còn ít, 17/40 (42,5%) BN có di căn xa và chỉ có 7 BN di căn gan, số còn lại là di căn vào các vị trí khác nên chưa có trường hợp nào âm tính giả cũng như dương tính giả trên hình ảnh PET/CT.

Do khả năng chụp cắt lớp toàn thân nên ^{18}F -FDG PET/CT có thể phát hiện thêm những tổn thương di căn xa ở hạch, gan, phổi và xương... mà CT ổ bụng có hạn chế là chỉ phát hiện được tổn thương hạch vùng, di căn gan và phúc mạc. Tuy nhiên, tổn thương ở phúc mạc thường nhỏ và khó phát hiện trên cả hình ảnh CT và PET. Trong nghiên cứu này, ^{18}F -FDG PET/CT phát hiện thêm nhiều tổn thương hơn so với CT đơn thuần, đặc biệt là tổn thương di căn xa. Nhiều trường hợp chỉ có tổn thương gan đơn độc nếu dựa vào tính

chất ngấm thuốc của CT cũng chưa thể khẳng định được chẩn đoán do đặc điểm này có thể gặp ở những loại u gan lành tính khác. Những tổn thương có ngấm thuốc cản quang trên CT đồng thời có tăng chuyển hóa FDG thì khả năng do di căn là rất cao. PET/CT có giá trị chẩn đoán bổ trợ giúp nghi ngờ những tổn thương chưa rõ ràng trên các phương pháp chẩn đoán thông thường khác. Giá trị chẩn đoán di căn xa của ^{18}F -FDG PET/CT trong nghiên cứu này là 100% đối với di căn gan cao hơn so với CT (độ nhạy 50%, độ đặc hiệu 91%). Llamas-Elvira và cs nghiên cứu trên 104 BN cũng cho thấy giá trị chẩn đoán rất cao của PET/CT với độ nhạy là 89%, độ đặc hiệu là 93% [11]. Phần lớn các tổn thương gan phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi ở dạng đa ổ, do vậy, ít trường hợp phải sinh thiết để chẩn đoán. ^{18}F -FDG PET/CT có thể được coi như một tiêu chuẩn để đối chiếu với các phương pháp khác trong chẩn đoán di căn xa. Ngoài ra, UTĐTT cũng có tỷ lệ di căn phổi khá cao. Kết quả sau khi chụp ^{18}F -FDG PET/CT cho thấy 2 BN có di căn phổi dạng nốt mờ, tăng chuyển hóa FDG ở rải rác hai trường phổi. Nghiên cứu của Iva Katorova và cs cũng cho kết quả khá tương đồng với chúng tôi ở 38 BN UTĐTT trong chẩn đoán di căn xa bằng PET/CT [12]. Tương tự như vậy, ^{18}F -FDG PET/CT đã giúp chẩn đoán di căn xương dạng hủy xương, đa ổ, tăng chuyển hóa FDG ở 2 BN. PET/CT có ưu thế đặc biệt trong việc chẩn đoán chính xác di căn hạch hay giai đoạn N và đặc biệt là giai đoạn M. Theo nghiên cứu của Llamas hoặc của Iva và cs, tỷ lệ BN được thay đổi chiến thuật điều trị lần lượt là 19,2% và 8% [11, 12].

Kết luận

- ^{18}F -FDG PET/CT có vai trò quan trọng trong đánh giá khả năng sống của cơ tim. Diện cơ tim sống có ảnh hưởng quan trọng đến khả năng phục hồi sau khi điều trị, giúp các bác sĩ tim mạch lựa chọn phương pháp điều trị phù hợp cho BN NMCT.

- ^{18}F -FDG PET/CT có vai trò trong chẩn đoán giai đoạn bệnh hạch ác tính chính xác, đặc biệt phát hiện những tổn thương ngoài hạch. ^{18}F -FDG PET/CT có khả năng đánh giá sớm kết quả điều trị hoá chất và định hướng giúp các bác sĩ lâm sàng thay đổi chiến thuật điều trị phù hợp đối với BN bệnh hạch ác tính.

- ^{18}F -FDG PET/CT có độ nhạy, độ đặc hiệu và giá trị dự báo âm tính cao hơn so với CT trong đánh giá

di căn hạch vùng ở BN UTĐTT nguyên phát. ^{18}F -FDG PET/CT là phương pháp có giá trị cao phát hiện di căn xa, đánh giá chính xác giai đoạn trước điều trị ở BN UTĐTT nguyên phát. ^{18}F -FDG PET/CT là phương pháp có giá trị trong chẩn đoán phát hiện tổn thương tái phát tại chỗ, di căn hạch vùng và di căn xa ở BN UTĐTT nghi ngờ tái phát trên lâm sàng, CT và/hoặc nồng độ CEA cao.

Tài liệu tham khảo

- [1] Almuhaideb, Ahmad, Papathanasiou, Nikolaos, Bomanji, Jamshed (2011), “ ^{18}F -FDG PET/CT Imaging In Oncology”, *Annals of Saudi Medicine*, **31**(1), pp.3-13.
- [2] Boellaard, Ronald, et al (2010), “FDG PET and PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour PET imaging: version 1.0”, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, **37**(1), pp.181-200.
- [3] Cheson B.D (2015), “Staging and response assessment in lymphomas: the new Lugano classification”, *Chin Clin Oncol*, **4**(1), pp.5-12.
- [4] Flotats, Albert, et al (2011), “Hybrid cardiac imaging: SPECT/CT and PET/CT. A joint position statement by the European Association of Nuclear Medicine (EANM), the European Society of Cardiac Radiology (ESCR) and the European Council of Nuclear Cardiology (ECNC)”, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, **38**(1), pp.201-212.
- [5] Hesse B, et al (2005), “EANM/ESC procedural guidelines for myocardial perfusion imaging in nuclear cardiology”, *European journal of*

nuclear medicine and molecular imaging, **32**(7), pp.855-897.

- [6] Veit-Haibach P, et al (2006), “Diagnostic accuracy of colorectal cancer staging with whole-body PET/CT colonography”, *JAMA*, **296**(21), pp.2590-2600.
- [7] Kauffman, Gregory J, et al (1996), “Comparison of rest thallium-201 imaging and rest technetium-99m sestamibi imaging for assessment of myocardial viability in patients with coronary artery disease and severe left ventricular dysfunction”, *Journal of the American College of Cardiology*, **27**(7), pp.1592-1597.
- [8] Haioun C, et al (2005), “ ^{18}F fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome”, *Blood*, **106**(4), pp.1376-1381.
- [9] Wirth A, et al (2008), “Impact of ^{18}F fluorodeoxyglucose positron emission tomography on staging and management of early-stage follicular non-hodgkin lymphoma”, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **71**(1), pp.213-219.
- [10] Kwak J.Y, et al (2012), “Diagnostic value of FDG-PET/CT for lymph node metastasis of colorectal cancer”, *World J Surg*, **36**(8), pp.1898-1905.
- [11] Llamas-Elvira, JoseManuel, et al (2007), “Fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET in the preoperative staging of colorectal cancer”, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **34**(6), pp.859-867.
- [12] Kantorova Iva, et al (2003), “Routine ^{18}F -FDG PET Preoperative Staging of Colorectal Cancer: Comparison with Conventional Staging and Its Impact on Treatment Decision Making”, *Journal of Nuclear Medicine*, **44**(11), pp.1784-1788.

Phát hiện gen kháng erythromycin và tetracycline ở các chủng *Streptococcus suis* gây bệnh ở người

Lê Văn Duyệt^{1*}, Trần Thị Giáng Hương², Nguyễn Vũ Trung³

¹Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Bộ Y tế

Ngày nhận bài 18.1.2016, ngày chuyển phản biện 20.1.2016, ngày nhận phản biện 22.2.2016, ngày chấp nhận đăng 25.2.2016

Nhiễm khuẩn do *Streptococcus suis* thường dẫn đến các biến chứng nặng như viêm phổi, viêm màng não, nhiễm trùng huyết, viêm nội tâm mạc, viêm khớp. Erythromycin và tetracycline là các kháng sinh được lựa chọn để điều trị và phòng nhiễm trùng do vi khuẩn này ở lợn. Nghiên cứu nhằm phát hiện một số gen liên quan đến kháng erythromycin và tetracycline ở các chủng *S. suis* gây bệnh ở người. 81 chủng *Streptococcus suis* (trong đó có 72 chủng kháng tetracycline và 9 chủng nhạy với tetracycline) và 33 chủng (trong đó có 28 chủng kháng erythromycin và 5 chủng nhạy (CLSI 2013)) được lựa chọn vào nghiên cứu. Kỹ thuật PCR được sử dụng để phát hiện một số gen liên quan đến kháng erythromycin và tetracycline. Không có chủng *S. suis* nào mang gen *erm*(A), *mef*(A/E), *msr*(D) đề kháng erythromycin, chỉ có 1 chủng mang gen *erm*(B). 62 chủng mang gen *tet*(M), 81 chủng mang *tet*(K), 6 chủng mang *tet*(L), 13 chủng mang *tet*(W) và 19 chủng mang *tet*(40). Trong khi đó không có chủng nào mang gen *tet*(O) và *tet*(S). Như vậy, có thể kết luận: đã phát hiện các chủng *S. suis* phân lập từ bệnh nhân mang gen kháng erythromycin và tetracycline; phần lớn các chủng kháng tetracycline là các chủng mang gen kháng thuốc.

Từ khóa: gen kháng erythromycin và tetracycline, kỹ thuật PCR, *Streptococcus suis*.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

Streptococcus suis (liên cầu lợn) là một căn nguyên thường gặp gây viêm màng não và nhiễm khuẩn huyết ở người. Đây là một bệnh truyền từ động vật sang người. Trong khi viêm màng não do *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) ở trẻ dưới 2 tuổi chiếm 88-94% các trường hợp viêm màng não do vi khuẩn ở trẻ dưới 5 tuổi [1]. Một nghiên cứu khác tiến hành trên các bệnh phẩm dịch não tủy thu thập từ bệnh nhân vào Bệnh viện Nhi trung ương từ 2001 đến 2005 cho thấy, 129/529 (24%) các mẫu bệnh phẩm dịch não tủy có kết quả nuôi cấy dương tính với Hib. Trong khi đó, ở người lớn, yếu tố dịch tễ học có sự khác biệt. *S. suis* là nguyên nhân gây viêm màng não do vi khuẩn phổ biến nhất, chiếm 26% các căn nguyên phân lập được. *S. suis* là một vi khuẩn từ lợn truyền nhiễm sang người do giết mổ lợn bị bệnh hoặc ăn tiết canh [2].

Ngoài gây viêm màng não, *S. suis* còn gây nhiễm trùng huyết ở những người nhiễm vi khuẩn này. Nhiễm khuẩn huyết có thể phối hợp với viêm màng não. Tỷ

lệ phân lập các tác nhân gây nhiễm trùng huyết tại một bệnh viện tuyến trung ương là 8% (thống kê tại Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương năm 2009-2010). Các vi khuẩn thường gặp như *Klebsiella pneumoniae* (18,3%), *Escherichia coli* (17,6%), *Staphylococcus aureus* (11,9%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,9%) và *Acinetobacter baumannii* (4,4%). Một thống kê khác cho thấy, các căn nguyên vi khuẩn gây bệnh thường gặp từ 2008 đến 2009 là: *E. coli* (19,3%), *K. pneumoniae* (15,2%), *S. aureus* (13,8%), và *S. suis* (9,7%) (theo báo cáo của Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương, Hà Nội, 2009). Như vậy có thể thấy rằng, *S. suis* cùng với các vi khuẩn khác đang là căn nguyên đóng vai trò quan trọng trong gây viêm màng não và nhiễm khuẩn huyết hiện nay.

Cho tới nay, việc điều trị nhiễm khuẩn do *S. suis* gây ra chủ yếu dùng ampicillin và/hoặc ceftriaxone [3]. Tuy nhiên, erythromycin và tetracycline là các kháng sinh được lựa chọn để điều trị và phòng nhiễm trùng do vi khuẩn này ở lợn. Mặc dù các chủng *S. suis*

*Tác giả liên hệ: Tel: 04.35763491

Detection of erythromycin and tetracycline resistant genes in *Streptococcus suis* causing human infections

Summary

Streptococcus suis infections usually results in severe complications such as pneumoniae, meningitis, septicemia... Tetracycline and erythromycin are two antimicrobials that are extensively used for therapy and prophylaxis of *S. suis* strains isolated from pigs and human beings. This study aimed at detection of resistant genes for erythromycin and tetracycline from *S. suis* strains causing human infections. 81 *S. suis* isolates (72 tetracycline-resistant and 9 tetracycline-susceptible), and 33 isolates (28 erythromycin-resistant and 5 susceptible (CLSI 2013) were selected for the study. PCR was used to detect some resistant genes for erythromycin and tetracycline. No *S. suis* isolate harboured *erm*(A), *mef*(A/E), *msr*(D); only one harboured *erm*(B). 62 isolates harboured *tet*(M), and 81 for *tet*(K), 6 for *tet*(L), 13 for *tet*(W) and 19 for *tet*(40) respectively. No *tet*(O) and *tet*(S) gene was detected.

Keywords: PCR, resistant genes for erythromycin and tetracycline, *Streptococcus suis*.

Classification number 3.2

gây bệnh ở người có nguồn gốc từ lợn, nhưng ở Việt Nam chưa có một nghiên cứu nào khảo sát mức độ và đặc biệt là cơ chế di truyền liên quan đến kháng erythromycin và tetracycline ở các chủng *S. suis* phân lập từ người. Ngay sau khi đưa erythromycin vào sử dụng vào những năm 1950, người ta đã tìm thấy các chủng vi khuẩn đề kháng loại kháng sinh này lần đầu tiên ở staphylococci [4]. Tiếp đó, một lượng lớn vi khuẩn đã được xác định đề kháng với các kháng sinh nhóm macrolid, streptogramin, lincosamid (MSL) do sự xuất hiện của nhiều loại gen khác nhau, chủ yếu là các gen mã hóa cho enzyme methyl hóa phân tử rRNA. Nhóm enzyme methyl hóa phân tử rRNA do các gen *erm* mã hóa, tác động vào vị trí axit amin

adenine, tạo ra sự đề kháng đối với MSL. Hậu quả của methyl hóa adenine dẫn đến ngăn cản sự bám dính của thuốc kháng sinh lên tiểu đơn vị 50S ribosome. Ngoài ra, 2 cơ chế đề kháng khác liên quan đến bơm ngược và gen bất hoạt cũng đã được tìm thấy, các enzyme và protein liên quan đến hai cơ chế này do các gen *msr* và *ere* mã hóa. Cho đến nay, có hơn 60 loại gen đề kháng MSL đã được tìm thấy và đặt tên [5].

3 cơ chế đề kháng tetracycline bao gồm: 1) tăng cường bơm ngược, 2) protein bảo vệ ribosome, 3) enzyme bất hoạt. Cho đến nay, có tới hơn 40 gen đề kháng tetracycline đã được tìm thấy, trong đó có 38 gen *tet* (tetracycline resistance), 3 gen *otr* (oxytetracycline resistance) và 1 gen *tcr*. Trong số đó, có 25 gen *tet*, 2 gen *otr*, và 1 gen *tcr* là mã hóa cho các hệ thống bơm ngược, ngược lại có 10 gen *tet*, 1 gen *otr* mã hóa cho các protein bảo vệ ribosome [6]. Đáng kể là nhóm gen *tet*(M), *tet*(U), *tet*(O/W) là những gen được tìm thấy nhiều ở cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương [7]. Chính vì lý do đó, việc phát hiện một số gen liên quan đến kháng erythromycin và tetracycline ở các chủng *S. suis* gây bệnh ở người có ý nghĩa rất quan trọng.

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

88 chủng *S. suis*, trong đó có 72 chủng kháng tetracycline và 9 chủng nhạy với tetracycline và 33 chủng, trong đó có 28 chủng kháng erythromycin và 5 chủng nhạy (CLSI 2013); các chủng này được phân lập và lưu giữ trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước mã số KC10.18/11-15: “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử xác định mức độ kháng kháng sinh của một số chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp ở Việt Nam”.

Vật liệu

Vật liệu để bảo quản, lưu giữ chủng vi khuẩn: môi trường canh thang BHI có 20% glycerol; ống cryotube vô trùng loại 2 ml; hộp trữ mẫu lạnh (loại 96 lỗ); đầu typ 200 µl, 1000 µl vô trùng; găng tay; khẩu trang.

Vật liệu để tách DNA tổng số của vi khuẩn: ống eppendorf loại 2,0 ml; pippette; cốc thủy tinh; bút ghi kính; giấy thấm; dung dịch sát khuẩn; bộ tách DNA của Hãng Qiagen (QIAmp DNA Mini Kit, Cat.No. 51304); găng tay; khẩu trang.

Vật liệu cho PCR: PCR master mix (Qiagen - Mỹ); Agarose dùng trong điện di (Invitrogen - Mỹ); gel red dùng để nhuộm gel (Nimagen - Mỹ); TAE (Tris Acetate EDTA); PBS (Phosphate buffer saline).

Bảng 1: bộ primer cho các gen liên quan đến đề kháng kháng sinh ở *S. suis*

Tetracycline	<i>tet(M)</i>	<i>tet(M)F</i>	GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG	[8, 9]
		<i>tet(M)R</i>	CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC	
	<i>tet(O)</i>	<i>tet(O)F</i>	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC	
		<i>tet(O)R</i>	TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	
		<i>tet(O)FF2</i>	TTG TTT TGG GGC TAT TGG AG	
		<i>tet(O)FF3</i>	TAT ATG ACT TTT GCA ACG TG	
	<i>tet(K)</i>	<i>tet(K)F</i>	GAT CAA TTG TAG CTT TAG GTG AAG G	
		<i>tet(K)R</i>	TTT TGT TGA TTT ACC AGG TAC CAT T	
	<i>tet(L)</i>	<i>tet(L)F</i>	TGG TGG AAT GAT AGC CCA TT	
		<i>tet(L)R</i>	CAG GAA TGA CAG CAC GCT AA	
	<i>tet(S)</i>	<i>tet(S)F</i>	CAT AGA CAA GCC GTT GAC C	
		<i>tet(S)R</i>	ATG TTT TTG GAA CGC CAG AG	
	<i>tet(W)</i>	<i>tet(W)F</i>	ACA ACG AGG ACG GAC ACC ATG	
		<i>tet(W)R</i>	TTA TCC CGA ACA GAC TGA ACC AC	
	<i>tet(40)</i>	<i>tet(40)F</i>	CGG AGG AAG AGG ACA AAC CC	
		<i>tet(40)R</i>	TAA GCC GCT GCC GAT AAG AC	
Erythromycin	16S <i>rRNA</i>	16S F	GAG TAC GAC CGC AAG GTT GA	
		16S R	CTG GTA AGG TTC TTC GCG TTG	
	<i>Erm(A)</i>	<i>Erm(A)F</i>	CCC GAA AAA TAC GCA AAA TTT CAT	
		<i>Erm(A)R</i>	CCC TGT TTA CCC ATT TAT AAA CG	
	<i>Erm(B)</i>	<i>Erm(B)F</i>	TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG	
		<i>Erm(B)R</i>	CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT	
	<i>Mef(A/E)</i>	<i>Mef(A/E)F</i>	CAA TAT GGG CAG GGC AAG	
		<i>Mef(A/E)R</i>	AAG CTG TTC CAA TGC TAC GG	
	<i>msr(D)</i>	<i>msr(D)F</i>	TTG GAC GAA GTA ACT CTG	
		<i>msr(D)R</i>	GCT TGG CTC TTA CGT TC	

Thiết bị nghiên cứu

- Thiết bị lưu giữ chủng: tủ lạnh -80°C.
- Máy so độ đục Mc Faland.
- Máy điều nhiệt tự động GenAmp PCR System 9700 AB (Applied Biosystems, Mỹ).
- Máy ly tâm lạnh Eppendorf (Mỹ).
- Bộ điện di ngang Horizon 58(Gibco-BRL).

- Soi gel Wealttec Corp Model MD-20 (Mỹ), Máy chụp ảnh gel Geldoc (Biorad, Mỹ).

- Máy sequencing ABI PRISM 3130 (Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Đây là nghiên cứu mô tả, thực nghiệm trong phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật nghiên cứu:

Kỹ thuật tách chiết DNA: sử dụng bộ kit thương mại để tách chiết DNA tổng số theo quy trình của nhà sản xuất (bộ kit QIAamp DNA Mini Kit, Cat No. 51304).

Kỹ thuật PCR:

Thành phần phản ứng:

Thành phần	Thể tích (μl)
2x Master mix	25
MgCl ₂ (25 mM)	4
DMSO	2
Primer F (***) (10 μM)	1
Primer R (***) (10 μM)	1
DNA khuôn	2,5
H ₂ O	14,5
Tổng thể tích phản ứng	50

Chu trình nhiệt:

Các bước	Nhiệt độ	Thời gian	35 chu kỳ
Biến tính giai đoạn 1	94 °C	5 phút	
Biến tính giai đoạn 2	94 °C	30 giây	
Gắn mồi	*** °C	30 giây	
Kéo dài	72 °C	1 phút	
Kéo dài lần cuối	72 °C	5 phút	

• Các cặp mồi và nhiệt độ bắt cặp của gen đề kháng erythromycin của *S. suis*: sử dụng các cặp mồi đặc hiệu: *erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, *msr(D)*.

Mồi	<i>Erm(A)</i>	<i>Erm(B)</i>	<i>Mef(A/E)</i>	<i>Msr(D)</i>
T ^o	62	62	62	62

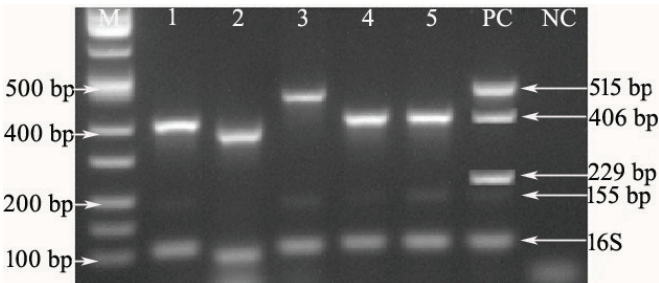
• Các cặp mồi và nhiệt độ bắt cặp của gen kháng tetracycline của *S. suis*: sử dụng các cặp mồi đặc hiệu: *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(40)*.

Mồi	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(S)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>tet(40)</i>
T ^o	55	55	55	55	55	55	55

Thời gian nghiên cứu: từ 9.2012 đến 9.2014.

Địa điểm nghiên cứu: Labo Sinh học phân tử - Khoa Xét nghiệm - Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương và Khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai.

Kết quả



Hình 1: kết quả điện di sản phẩm PCR các gen đề kháng tetracycline của *S. suis*

Giếng M là thang DNA chuẩn, các giếng từ 1 đến 5 là sản phẩm PCR của các chủng *S. suis* có mã số lần lượt là 532, 529, 418, 464, 479. Sản phẩm PCR gen *tet(K)* có kích thước phân tử là 155 bp, gen *tet(L)* 229 bp, gen *tet(M)* 406 bp và gen *tet(O)* là 515 bp. PC là chứng dương (Positive control), NC là chứng âm (Negative control).

Gen	<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>mef(A/E)</i>	<i>msr(D)</i>
Tỷ lệ				
Có (n, %)	0	1(3)	0	0
Không (n, %)	33 (100)	32 (97)	33 (100)	33 (100)
Tổng số (33)	33	33	33	33

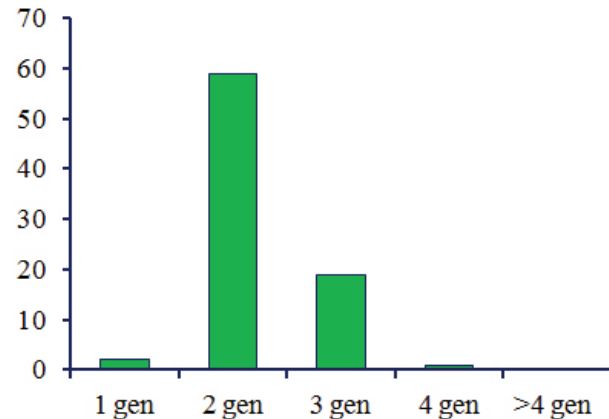
Bảng 2: phân bố các chủng *S. suis* mang gen đề kháng erythromycin

Bảng 2 cho thấy, không có chủng *S. suis* nào mang gen *erm(A)*, *mef(A/E)*, *msr(D)* đề kháng erythromycin, chỉ có 1 chủng mang gen *erm(B)*.

Gen	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(S)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>tet(40)</i>
Tỷ lệ							
Có (n, %)	62 (76,6)	0	81 (100)	6 (7,4)	0	13 (16,1)	19 (23,5)
Không (n, %)	19 (23,4)	81 (100)	0	75 (92,6)	81 (100)	68 (83,9)	62 (76,5)
Tổng số (81)	81	81	81	81	81	81	81

Bảng 3: phân bố các chủng *S. suis* mang gen đề kháng tetracycline

S. suis đề kháng tetracycline có 62 chủng mang gen *tet(M)*, 81 chủng mang *tet(K)*, 6 chủng mang *tet(L)*, 13 chủng mang *tet(W)* và 19 chủng mang *tet(40)*. Trong khi đó không có chủng nào mang gen *tet(O)* và *tet(S)*.



Hình 2: tỷ lệ mang gen liên quan đến kháng tetracycline ở *S. suis*

Hình 2 cho thấy, có 2 chủng *S. suis* mang 1 gen (2,5%), 59 chủng mang 2 gen (72,8%), 19 chủng mang 3 gen (23,5%) và 1 chủng mang 4 gen (1,2%). Không có chủng nào mang nhiều hơn 4 gen.

Bảng 4: mối liên quan giữa các chủng *S. suis* mang gen với mức độ đề kháng erythromycin (n = 33)

Gen	<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>mef(A/E)</i>	<i>msr(D)</i>
Mức độ	(n)	(n)	(n)	(n)
S (MIC < 0,25)	0	0	0	0
I (MIC 0,25 - <1)	0	0	0	0
R (MIC 1-2)	0	0	0	0
R (MIC > 2)	0	1	0	0
Tổng số	0	1	0	0

Chú thích: S: Sensitive - nhạy; I: Intermediate - trung gian, R: resistance - kháng, MIC: nồng độ ức chế tối thiểu (µg/ml)

Theo bảng 4, không có chủng *S. suis* nào có mang gen *erm(A)*, *mef(A/E)* và *msr(D)* nhạy cảm, đề kháng trung gian và đề kháng hoàn toàn với erythromycin. Chỉ có 1 chủng mang gen *erm(B)* đề kháng hoàn toàn với kháng sinh này.

Bảng 5: mối liên quan giữa các chủng *S. suis* mang gen với mức độ đề kháng tetracycline (n = 81)

Gen	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(S)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>tet(40)</i>
Mức độ	(n,%)	(n,%)	(n,%)	(n,%)	(n,%)	(n,%)	(n,%)
S (MIC < 2)	7 (77,7)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22,2)
I (MIC 2-8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC > 8)	55 (76,4)	0 (0)	72 (100)	6 (8,4)	0 (0)	13 (18,1)	17 (23,6)
p	0,926			0,368		0,164	0,926
Tổng số	62	0	81	6	0	13	19

Chú thích: S: Sensitive - nhạy; I: Intermediate - trung gian, R: resistance - kháng, MIC: nồng độ ức chế tối thiểu (µg/ml)

Đối với đề kháng *S. suis* nhạy cảm với tetracycline (MIC ≤ 2 µg/ml), có 7 chủng mang gen *tet(M)*, 9 chủng mang *tet(K)* và 2 chủng mang *tet(40)*, không có chủng

nào mang gen *tet(O)*, *tet(L)*, *tet(S)* và *tet(W)*. Không thấy có chủng nào mang các gen trên đề kháng trung gian với tetracycline (MIC: 2-8 µg/ml). Ở các chủng đề kháng (MIC ≥ 8 µg/ml), có tới 55 chủng mang *tet(M)*, 72 chủng mang gen *tet(K)*, 6 chủng mang *tet(L)*, 13 chủng mang *tet(W)* và 17 chủng mang *tet(40)*, trong khi không có chủng nào mang gen *tet(O)* và *tet(S)*.

Bàn luận

Nhiễm khuẩn do *S. suis* thường dẫn đến các biến chứng nặng như viêm phổi, viêm màng não, nhiễm trùng huyết, viêm nội tâm mạc cũng như viêm khớp. Vi khuẩn này có khả năng gây bệnh rộng rãi từ động vật đến người, đặc biệt là trên lợn. Do việc sử dụng kháng sinh bừa bãi cả trong chăn nuôi lẫn điều trị y tế đã làm gia tăng đề kháng kháng sinh ở vi khuẩn này, vì vậy việc kiểm soát các nhiễm khuẩn do *S. suis* rất kém hiệu quả. Tetracycline và erythromycin là hai kháng sinh được sử dụng phổ biến trong điều trị và dự phòng loại nhiễm khuẩn này, hậu quả là tỷ lệ đề kháng đã ghi nhận được với tỷ lệ rất cao cả ở những chủng *S. suis* phân lập trên người và lợn ở khu vực châu Á, châu Âu và Bắc Mỹ. Hiện nay, cơ chế đề kháng tetracycline và erythromycin đã được làm sáng tỏ, có liên quan đến hệ thống bơm chủ động và sản sinh các enzyme mang hoạt tính methyl hóa. Gen *erm(B)* mã hóa cho enzyme erythromycin ribosomal methylase chịu trách nhiệm đề kháng các macrolide-lincosamine-streptogramin (MLS_B), tìm thấy phổ biến ở Hồng Kông và Bỉ. Đề kháng tetracycline chủ yếu liên quan đến các gen *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)* và *tet(O/W/32/O)*. Thêm vào đó, các protein bơm chủ động *tet(L)* và *tet(K)* cũng đã được xác định có liên quan đến đề kháng tetracycline ở *S. suis*.

Qua nghiên cứu 33 chủng *S. suis* phân lập được, sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho gen *erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)* và *mst(D)* cho thấy, chỉ có 1/33 chủng mang gen *erm(B)*, không có chủng nào mang các gen còn lại. Tuy nhiên, ở một số nghiên cứu khác lại ghi nhận một tỷ lệ cao các chủng *S. suis* mang các gen này, ví dụ như nghiên cứu của Surbhi (2005) tại Bỉ ghi nhận tới 70/125 chủng mang gen *erm(B)*, 34/125 chủng mang gen *mef(A/E)*, và chỉ có 2 chủng mang gen *erm(A)*. Một nghiên cứu khác của tác giả Hòa T.H (2014) tại

miền Nam Việt Nam ghi nhận có 36/38 chủng mang gen *erm(B)*, trong khi đó không phát hiện được chủng nào mang gen *erm(A)* và *mef(A/E)* [10]. Các số liệu giữa các nghiên cứu có sự khác biệt khá rõ ràng, tuy nhiên điều đặc biệt là các chủng *S. suis* gây bệnh tại Việt Nam trong hai giai đoạn khác nhau (2008) và (2014) lại có sự khác biệt khá rõ rệt. Chúng tôi cho rằng, có thể do việc kiểm soát và điều trị nhiễm trùng do *S. suis* bằng các phác đồ hiện tại rất hiệu quả, do đó đã ngăn chặn được sự lan truyền các gen đề kháng.

Đối với đề kháng tetracycline, tiến hành phân tích 81 chủng *S. suis* bằng PCR mồi đặc hiệu thu được tỷ lệ chủng mang gen *tet(K)* là 100%, *tet(M)* tới 76,6%, *tet(40)* là 23,5%, *tet(W)* 16,1%, *tet(L)* 7,4%. Trong khi đó, không phát hiện được các gen *tet(O)* và *tet(S)* trong số 81 chủng *S. suis* trong nghiên cứu. Đánh giá mức độ đề kháng của các chủng mang gen này thấy rằng, tỷ lệ chủng đề kháng tetracycline ở mức rất cao (≥ 8 µg/l). Kết quả này có sự khác biệt với kết quả nghiên cứu của Surbhi (2005) với 55/125 chủng mang gen *tet(M)*, 10/125 chủng mang gen *tet(O)*, không phát hiện được gen *tet(K)* và *tet(L)*. Trong khi đó, số liệu nghiên cứu của Hòa T.H (2014) chỉ ghi nhận có 3,9% số chủng mang gen *tet(M)*, *tet(L)*, trong khi gen *tet(M)* và *tet(O)* tìm thấy ở 90,8% số chủng, có 2,2% số chủng mang gen *tet(W)*. Sự xuất hiện của các gen *tet* cho thấy mức độ đề kháng của *S. suis* với loại kháng sinh thông dụng như tetracycline ngày càng gia tăng, và làm giảm đi sự lựa chọn điều trị cho bệnh nhân. Số liệu về các chủng *S. suis* mang gen đề kháng tetracycline trong nghiên cứu này có xu hướng cao hơn so với nghiên cứu của Hòa T.H (2014) tại miền Nam Việt Nam, chúng tôi cho rằng *S. suis* gây bệnh ngày càng gia tăng đề kháng tetracycline ở mức độ báo động: 100% chủng mang gen *tet(K)*, và một số gen khác cũng đã lên tới 70-80%, mức độ đề kháng của các chủng mang gen tương ứng cũng ở mức rất cao do tỷ lệ các chủng mang đa gen có xu hướng gia tăng với 72,8% số chủng mang 2 gen, 23,5% mang 3 gen và có 1,2% số chủng mang 4 gen trở lên. Với tỷ lệ mang gen như vậy, rõ ràng sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn sẽ ở mức rất cao, rất khó có sự đáp ứng điều trị bằng kháng sinh thông thường.

Kết luận

- Đã phát hiện các chủng *S. suis* phân lập từ bệnh nhân mang gen kháng erythromycin và tetracycline.
- Phần lớn các chủng kháng tetracycline là các chủng mang gen kháng thuốc.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước mã số KC10.18/11-15: “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử xác định mức độ kháng kháng sinh của một số chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp ở Việt Nam”. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ kinh phí cho đề tài này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Anh Đ.T (2011), “Căn nguyên vi khuẩn và tính kháng kháng sinh ở bệnh nhân viêm màng não mủ điều trị tại Bệnh viện đa khoa Bắc Giang”, *Tạp chí Y học thực hành*, số 3, tr.131-133, Bộ Y tế.
- [2] Wertheim H.F, Nguyen H.N, Taylor W, Lien T.T, Ngo H.T, Nguyen T.Q, Nguyen B.N, Nguyen H.H, Nguyen H.M, Nguyen C.T, et al (2009), “*Streptococcus suis*, an important cause of adult bacterial

meningitis in northern Vietnam”, *PLoS One*, 4(6), e5973.

- [3] Bộ Y tế (2007), *Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh do liên cầu lợn (Streptococcus suis) ở người*, Quyết định số 3605/QĐ-BYT.
- [4] Weisblum B (1995), “Erythromycin resistance by ribosome modification”, *Antimicrob Agents Chemother*, 39(3), pp.577-585.
- [5] Roberts M.C (2008), “Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes”, *FEMS Microbiol Lett*, 282(2), pp.147-159.
- [6] Levy S.B, McMurry L.M, Barbosa T.M, Burdett V, Courvalin P, Hillen W, Roberts M.C, Rood J.I, Taylor D.E (1999), “Nomenclature for new tetracycline resistance determinants”, *Antimicrob Agents Chemother*, 43(6), pp.1523-1524.
- [7] Levy S.B, McMurry L.M, Roberts M.C (2005), “Tet protein hybrids”, *Antimicrob Agents Chemother*, 49(7), p.3099.
- [8] Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, Goossens H (2005), “Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci”, *Antimicrob Agents Chemother*, 49(11), pp.4798-4800.
- [9] Chen L, Song Y, Wei Z, He H, Zhang A, Jin M (2013), “Antimicrobial susceptibility, tetracycline and erythromycin resistance genes, and multilocus sequence typing of *Streptococcus suis* isolates from diseased pigs in China”, *J Vet Med Sci*, 75(5), pp.583-587.
- [10] Hòa T.H (2014), “Một số đặc điểm dịch tễ học của nhiễm khuẩn bệnh viện do vi khuẩn kháng carbapenem mang gen NDM-1 tại Bệnh viện Việt Đức - Hà Nội, 2010-2011”, *Luận án tiến sĩ*.

Đánh giá kết quả sớm điều trị hoá chất bổ trợ trước bằng phác đồ Taxanes - doxorubicin (TA) kết hợp phẫu thuật bảo tồn trên bệnh nhân ung thư vú giai đoạn II (T2;N0,1;M0)

Hoàng Anh Dũng*, Lê Hồng Quang, Lê Thanh Đức, Trần Văn Thuận

Bệnh viện K

Ngày nhận bài 10.12.2015, ngày chuyển phản biện 15.12.2015, ngày nhận phản biện 18.1.2016, ngày chấp nhận đăng 25.1.2016

Điều trị hoá chất bổ trợ trước cho bệnh nhân ung thư vú (UTV) có vai trò làm hạ giai đoạn (downstaging), giúp cho phẫu thuật thuận lợi hơn. Thực tế lâm sàng tại Việt Nam cho thấy, thể tích mô vú thường tương đối nhỏ nên khi điều trị bảo tồn hiệu quả thẩm mỹ không cao. Điều trị hoá chất bổ trợ trước kỳ vọng sẽ làm tăng tỷ lệ điều trị bảo tồn cũng như tăng tính thẩm mỹ của phẫu thuật. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá đáp ứng, tác dụng phụ của hóa chất bổ trợ trước bằng phác đồ Taxanes - doxorubicin (TA) trên bệnh nhân UTV giai đoạn II (T2;N0,1;M0) và đánh giá kết quả sớm của phẫu thuật bảo tồn sau điều trị hóa chất bổ trợ trước của nhóm nghiên cứu. Đối tượng nghiên cứu là 41 bệnh nhân UTV giai đoạn II được điều trị hóa chất và phẫu thuật tại Bệnh viện K. Các tác giả sử dụng phương pháp nghiên cứu can thiệp lâm sàng không đối chứng, so sánh kết quả trước sau. Tuổi trung bình của bệnh nhân là 43,7, tuổi thấp nhất: 27, cao nhất: 61. Kích thước u trung bình trong nghiên cứu là 3,1 cm với biên độ từ 2-5 cm (T2). Kết quả nghiên cứu cho thấy, điều trị hóa chất bổ trợ trước bằng phác đồ TA trên bệnh nhân UTV giai đoạn II đạt được tỷ lệ đáp ứng cao với độc tính thấp: sau 6 chu kỳ có tới 46,3% số bệnh nhân đáp ứng hoàn toàn trên lâm sàng, 22% đáp ứng hoàn toàn trên mô bệnh học; độc tính hay gặp là hạ bạch cầu hạt chủ yếu độ 1 và 2. Tỷ lệ phẫu thuật bảo tồn sau điều trị hóa chất bổ trợ trước là 92,7%, phẫu thuật an toàn, tỷ lệ tai biến thấp (5,2%), kết quả thẩm mỹ tốt với sự hài lòng của đa số bệnh nhân trong nghiên cứu.

Từ khóa: hóa chất tân bổ trợ, phẫu thuật bảo tồn, ung thư vú.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

UTV là bệnh ung thư phổ biến nhất ở phụ nữ nhiều nước trên thế giới và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong số các nguyên nhân gây tử vong do ung thư ở nữ [1]. Năm 2012, theo công bố của cơ quan nghiên cứu quốc tế về ung thư (GLOBOCAN), trên toàn thế giới có 1.670.000 ca mắc mới và có 522.000 phụ nữ tử vong do UTV. Tại Mỹ, năm 2011 có khoảng 229.060 ca mắc mới và 39.920 ca chết vì UTV [2]. Ở Việt Nam, theo số liệu của chương trình mục tiêu phòng chống ung thư năm 2010, có 12.533 trường hợp mới mắc UTV với tỷ lệ mắc chuẩn theo tuổi là 29,9/100.000 dân [3].

UTV là bệnh có tiên lượng tốt, đặc biệt là ở giai đoạn sớm. Điều trị UTV là sự phối hợp điển hình giữa các phương pháp điều trị tại chỗ, tại vùng bằng phẫu thuật, tia xạ và điều trị toàn thân bằng hoá chất, nội tiết, kháng thể đơn dòng [4, 5]. Phẫu thuật bảo tồn kết hợp xạ trị vừa đem lại hiệu quả thẩm mỹ, làm giảm tâm lý tự ti so với cắt toàn bộ tuyến vú nhưng không làm

tăng tỷ lệ tái phát và không làm giảm thời gian sống thêm của bệnh nhân. Hiện nay, nhu cầu điều trị bảo tồn tuyến vú ngày càng tăng lên. Tuy nhiên, điều trị bảo tồn cho UTV giai đoạn sớm ở Việt Nam còn hạn chế do khối u lúc phát hiện khá lớn, kích thước tuyến vú bé, vấn đề theo dõi bệnh nhân sau phẫu thuật chưa được thường xuyên.

Điều trị hoá chất bổ trợ trước là phương pháp sử dụng hoá chất trước mổ để làm giảm lượng tế bào u tại chỗ, tại vùng và cả các vị trí ở xa (di căn xa). Kết quả là, khối u và hạch tại chỗ, tại vùng thoái lui, chuyển từ giai đoạn không mổ được thành mổ được, tạo điều kiện phẫu thuật dễ dàng hơn. Đối với UTV giai đoạn sớm thì điều trị hóa chất bổ trợ trước làm giảm kích thước khối u, tăng tỷ lệ bảo tồn vú hoặc cho phép phẫu thuật với kết quả thẩm mỹ tốt nhất [6]. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về vai trò của hóa chất bổ trợ trước đối với UTV nói chung và UTV giai đoạn sớm với nhiều kết quả khả quan.

Tại Việt Nam, có một số nghiên cứu về hoá chất

*Tác giả liên hệ: Tel: 04.38246652

Evaluating the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer patient by Taxanes - doxorubicin regimen

Summary

Background and objective: neoadjuvant chemotherapy plays an important role in downstaging of locally advanced breast cancer and makes it easier for surgery afterward. Due to limitation of Vietnamese breast volume, breast conservation surgery in breast cancer patients often gets limited cosmetic outcome. Neoadjuvant chemotherapy is expected to improve this situation. The authors conducted this study to evaluate the efficacy of Taxanes - doxorubicin (TA) regimen as neoadjuvant chemotherapy in stage II breast cancer and to analyse early results of breast conserving surgery after neoadjuvant chemotherapy. **Patients and method:** 41 patients with stage II breast cancer received TA regimen as neoadjuvant chemotherapy and breast conserving surgery at K Hospital, and uncontrolled clinical intervention was used for the study. The mean of age was 43.7 (the youngest: 27, the oldest: 61), and the mean size of tumors was 31 mm. After 3 cycles, there were 4 patients (9.8%) with disappearing tumor in clinical. After 6 cycles, there were 19 patients (46.3%) with complete response. From the research results, the authors concluded that, for patient with stage II breast cancer, neoadjuvant chemotherapy with TA regimen achieved high response but low toxicity. After 6 cycles, the rate of clinical and histological complete response reached 46.3% and 22%, respectively. The common toxicity was neutropenia grade I and II. 92.7% underwent breast conservation after preoperative chemotherapy with safety surgery and low complication (5.2%) provided the good cosmetic outcome and the satisfaction in most patients.

Keywords: breast cancer, breast conserving surgery, neoadjuvant chemotherapy.

Classification number 3.2

bổ trợ trước trong UTV nhưng mới tập trung vào giai đoạn không mổ được mà chưa có nghiên cứu nào đánh giá trên giai đoạn mổ được. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này với hai mục tiêu: 1. Đánh giá đáp ứng và tác dụng phụ của hóa chất bổ trợ trước bằng phác đồ TA trên bệnh nhân UTV giai đoạn II (T2;N0,1;M0); 2. Đánh giá kết quả sớm của phẫu thuật bảo tồn sau điều trị hóa chất bổ trợ trước của nhóm nghiên cứu.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: 41 bệnh nhân UTV giai đoạn sớm (T2;N0,1;M0) được điều trị hóa chất tân bổ trợ, sau đó phẫu thuật tại Bệnh viện K từ tháng 1.2013 đến tháng 10.2014.

- Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân: bệnh nhân nữ được chẩn đoán xác định UTV bằng mô bệnh học là ung thư biểu mô tuyến vú xâm lấn; chỉ bị ung thư một bên vú; giai đoạn: T2;N0,1;M0 (IIA, IIB); có nhu cầu bảo tồn tuyến vú; các chỉ số về huyết học, sinh hóa cho phép điều trị hóa chất; được điều trị hóa chất và phẫu thuật tại Bệnh viện K; có đầy đủ hồ sơ bệnh án lưu trữ.

+ Tiêu chuẩn loại trừ: u vú ở trung tâm, đa ổ, canxi hóa lan tỏa; mắc các bệnh nội khoa nặng nề; mắc bệnh ung thư khác đang tiến triển; đang mang thai.

Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu can thiệp lâm sàng không đối chứng, so sánh kết quả trước sau.

Kết quả và bàn luận

Đáp ứng và độc tính của phác đồ TA

Tuổi:

Tuổi trung bình là 43,7, tuổi thấp nhất: 27, cao nhất: 61. Trong đó, nhóm tuổi 31-40 chiếm tỷ lệ cao nhất (41,5%). Theo nghiên cứu của Hoàng Thanh Quang (2011), tuổi trung bình được điều trị bảo tồn là 42,4 tuổi và nhóm từ 40-49 tuổi hay gặp nhất (chiếm 54,7%) [7].

Đặc điểm u nguyên phát:

Bảng 1: đặc điểm u nguyên phát

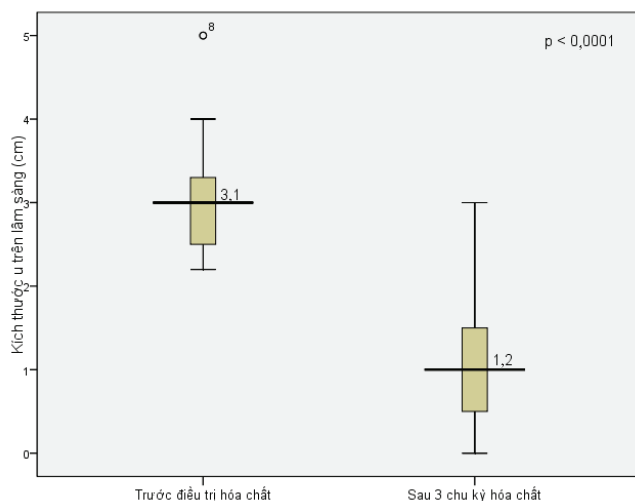
Các tính chất	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
Đường kính lớn nhất u trên lâm sàng (cm)	2-2,9	34,1
	3-3,9	53,7
	4-5	12,2
Tổng	41	100

Kích thước u trung bình trong nghiên cứu là 3,1 cm với biên độ từ 2-5 cm (T2). Như chúng ta đã biết, kích thước u là một yếu tố tiên lượng độc lập trong UTV.

Trong việc lựa chọn bệnh nhân cho phẫu thuật bảo tồn, người ta cũng quan tâm đến kích thước khối u, ở nước ta thường chỉ định khi khối u <3 cm.

Đáp ứng lâm sàng:

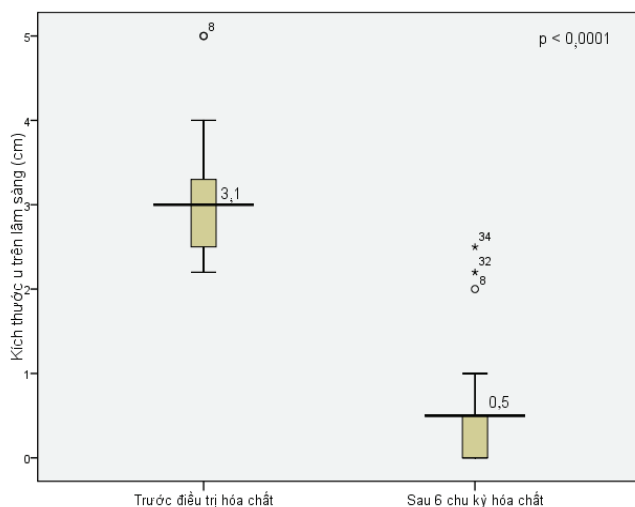
Đáp ứng u sau 3 chu kỳ hóa chất:



Biểu đồ 1: đáp ứng u sau 3 chu kỳ hóa chất

Trên lâm sàng, sau 3 đợt điều trị đã có tới 4 bệnh nhân (9,8%) không sờ thấy u. Đường kính lớn nhất trung bình của u giảm từ 3,1 cm (khoảng 2-5 cm) xuống còn 1,2 cm (khoảng 0-3 cm) ($p < 0,0001$). Không có bệnh nhân nào tiến triển.

Đáp ứng u sau 6 chu kỳ hóa chất:

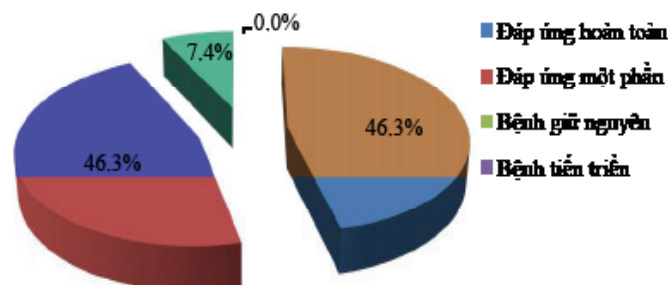


Biểu đồ 2: đáp ứng của u sau 6 chu kỳ hóa chất

Sau 6 chu kỳ điều trị, có tới 19 bệnh nhân (chiếm 46,3%) không sờ thấy u (đáp ứng hoàn toàn trên lâm sàng). Đường kính lớn nhất trung bình của u giảm từ 3,1 cm (khoảng từ 2-5 cm) xuống còn 0,5 cm (khoảng từ 0-2 cm) với $p < 0,0001$. Tỷ lệ đáp ứng toàn bộ đạt trên

90%. Chỉ có 3 bệnh nhân (chiếm 7,4%) u có giảm kích thước nhưng không đủ để đánh giá đáp ứng một phần, kích thước u sau điều trị 6 đợt của 3 bệnh nhân này đều <3 cm (bệnh giữ nguyên).

Đáp ứng lâm sàng theo RECIST:

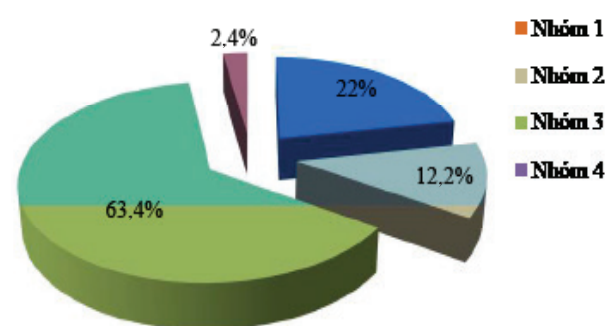


Biểu đồ 3: tỷ lệ đáp ứng lâm sàng của bệnh nhân sau hóa trị

Tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn đạt 46,3%, đáp ứng một phần đạt 46,3%. Có 7,4% số bệnh nhân có kích thước u giảm nhưng <30% (bệnh giữ nguyên), không có bệnh nhân nào tiến triển. Theo Lê Thanh Đức (2014) nghiên cứu trên 137 bệnh nhân giai đoạn 3 không mổ được, tỷ lệ đáp ứng toàn bộ là 92%, đáp ứng hoàn toàn trên lâm sàng là 31,4%, 94,2% chuyển sang giai đoạn mổ được, trong đó có 19% bệnh nhân đủ điều kiện bảo tồn [8].

Đáp ứng mô bệnh học:

Kết quả đáp ứng mô bệnh học của 41 bệnh nhân được thể hiện trên biểu đồ 4.



Biểu đồ 4: tỷ lệ đáp ứng trên mô bệnh học

Tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn trên mô bệnh học đạt 22%. Bên cạnh đó, có 12,2% đạt mức thoái lui, còn lại ung thư tại chỗ: 63,4% có thay đổi diện mạo u. Trong số 19 bệnh nhân đáp ứng hoàn toàn lâm sàng có 8 bệnh nhân đáp ứng hoàn toàn trên mô bệnh học (chiếm 42,1%).

Độc tính huyết học:

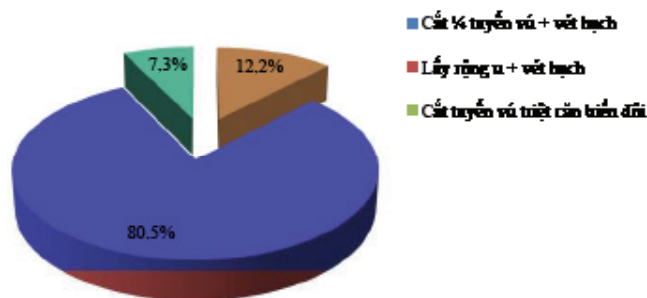
Bảng 2: độc tính huyết học qua các chu kỳ điều trị

	Độ 1 (%)	Độ 2 (%)	Độ 3 (%)	Độ 4 (%)
Hạ bạch cầu	64 (26)	24 (9,8)	6 (2,4)	3 (1,2)
Hạ bạch cầu hạt	60 (24,4)	27 (11)	5 (2)	3 (1,2)
Hạ tiểu cầu	12 (4,9)	3 (1,2)	0	0
Hạ huyết sắc	60 (24,4)	9 (3,7)	0	0

Độc tính hay gặp là hạ bạch cầu và hạ bạch cầu hạt, chủ yếu là độ 1 và 2. Hiếm có trường hợp hạ tiểu cầu và huyết sắc tố. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả của Lê Thanh Đức với tỷ lệ hạ bạch cầu tổng là 37,5%, bạch cầu trung tính là 42,2%, tỷ lệ hạ độ 3, 4 thấp [8]. Nghiên cứu của Anelli và cs (2003) trên bệnh nhân UTV giai đoạn IIIB được hóa trị trước mổ bằng phác đồ TA cho thấy, tỷ lệ giảm bạch cầu độ 3 hoặc 4 là 12,8% [9].

Độc tính ngoài hệ huyết học:

Độc tính trên gan chỉ là độ 1 và 2. Tỷ lệ này tương tự với nghiên cứu của Lê Thanh Đức [8], nhưng thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của Nguyễn Tiến Quang (42,9%) [10], có lẽ do các bệnh nhân bệnh đã di căn trước đó đã điều trị với nhiều loại hóa chất. Tỷ lệ độc tính thận trong nghiên cứu thấp, chỉ chiếm 6,1% do thuốc ít đào thải qua thận. Nôn và buồn nôn hay gặp chủ yếu ở độ 1 và 2. Hầu hết bệnh nhân có rụng tóc (97,6%). Độc tính thần kinh với biểu hiện tê bì có tỷ lệ 38,2%.

Kết quả điều trị**Phương pháp phẫu thuật:**

Biểu đồ 5: phương pháp phẫu thuật

Có trên 90% số bệnh nhân được phẫu thuật bảo tồn. Có 3 bệnh nhân đủ điều kiện nhưng không đồng ý bảo tồn được cắt tuyến vú triệt căn biến đổi.

Đánh giá diện cắt:

Đánh giá diện cắt được thực hiện trên 20 bệnh nhân trong nhóm. Tất cả diện cắt sau đều âm tính. Chủ yếu dương tính ở các diện cắt sát u và cách u 0,5 cm. Hầu hết các diện cắt cách u 1,5 cm và 2 cm đều âm tính, chỉ có 1 bệnh nhân dương tính ở diện cắt ngoài cách u 2 cm.

Kết quả thẩm mỹ:

Bảng 3: kết quả thẩm mỹ

Kết quả (Lowry-Carson)	Bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
Đẹp (7-8đ)	2	5,3
Tốt (6-6.9đ)	28	73,7
Trung bình (5-5,9đ)	7	18,4
Kém <5đ	1	2,6
Tổng	38	100

Có nhiều phương pháp đánh giá thẩm mỹ sau phẫu thuật, nhưng chúng tôi chọn yếu tố khách quan là thang điểm Lowry-Carson và đánh giá chủ quan dựa trên mức độ hài lòng của bệnh nhân. Đa số bệnh nhân hài lòng với kết quả điều trị. Trong số 38 bệnh nhân điều trị bảo tồn sau phẫu thuật, có tới 28 bệnh nhân (73,7%) được đánh giá là tốt, 2 bệnh nhân (5,3%) có kết quả đẹp và có 1 bệnh nhân kết quả kém (2,6%).

Kết luận**Đáp ứng và độc tính của phác đồ TA trên bệnh nhân UTV giai đoạn II (T2;N0,1;M0)**

- Đường kính lớn nhất trung bình của u nguyên phát giảm nhiều, từ 3,1 cm xuống 0,5 sau 6 chu kỳ điều trị. Tất cả các u sau điều trị đều có đường kính <2,5 cm và có thể bảo tồn.

- Tỷ lệ đáp ứng toàn bộ trên lâm sàng là 92,6%, trong đó có 46,3% đáp ứng hoàn toàn. Không có bệnh nhân nào tiến triển.

- Có 9 bệnh nhân (chiếm 22%) đạt được đáp ứng hoàn toàn trên mô bệnh học (PCR), 5 bệnh nhân (12,2%) chỉ còn ung thư tại chỗ. Đáp ứng hoàn toàn tại u liên quan đến hạch nách âm tính. Đáp ứng hoàn toàn trên mô bệnh học có liên quan đến đáp ứng hoàn toàn trên lâm sàng và tình trạng nội tiết âm tính.

- Độc tính hay gặp nhất là hạ bạch cầu (39,4%), hạ bạch cầu hạt (38,6%), mức độ hạ chủ yếu độ 1, 2. Các độc tính khác ít gặp hơn và đa số ở mức độ nhẹ.

Kết quả sớm của phẫu thuật bảo tồn

- Sau điều trị có tới 38 bệnh nhân (chiếm 92,7%) được phẫu thuật bảo tồn với kết quả thẩm mỹ cao (81,6% đẹp và tốt).

- Đa số các trường hợp u thoái hóa còn tồn thương đơn độc, diện cắt dương tính chủ yếu tại các vị trí sát u, cách 0,5 cm và 1 cm với tỷ lệ 5-25%.

- Thời gian phẫu thuật trung bình 69,7 phút. Thời gian hậu phẫu ngắn, trung bình 9,5 ngày.

- Phẫu thuật an toàn với tỷ lệ tai biến thấp (5,2%).

Tài liệu tham khảo

[1] Ferlay J, et al (2010), “Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008”, *International Journal of Cancer*, Vol.127, pp.2893-2917.

[2] Breast cancer (2014), *NCCN clinical practice guidelines in oncology*, Vol.2.

[3] Bùi Diệu và cs (2011), “Tình hình mắc ung thư ở phụ nữ Hà Nội

giai đoạn 2005-2008”, *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, số 3, pp.39-46.

[4] Nguyễn Bá Đức, Nguyễn Thị Hoài Nga (2007), “Dịch tễ học bệnh ung thư”, *Chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư*, tr.9-19.

[5] Nguyễn Bá Đức (2003), *Bệnh Ung thư vú*, Nhà xuất bản Y học.

[6] Fisher B, Bryant J, Wark N, et al (1998), “Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer”, *J Clin Oncol*, Vol.16, pp.2672-2685.

[7] Hoàng Thanh Quang (2011), “Đánh giá kết quả điều trị bảo tồn ung thư vú nữ giai đoạn I - II từ năm 2003-2006 tại Bệnh viện K”, *Luận văn thạc sỹ y học*, Trường Đại học Y Hà Nội.

[8] Lê Thanh Đức (2014), “Nghiên cứu hiệu quả hóa trị hỗ trợ trước phẫu thuật phác đồ AP trong UTV giai đoạn III”, *Luận án tiến sỹ y học*, Trường Đại học Y Hà Nội.

[9] Anelli A, Brentani R.R, et al (2003), “Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using palitaxel and doxorubicin in stage IIIB breast cancer”, *Ann Oncol.*, Vol.14, pp.428-432.

[10] Nguyễn Tiến Quang (2004), “Đánh giá kết quả hóa trị liệu cho UTV di căn bằng phác đồ TA và CAF tại Bệnh viện K”, *Luận văn tốt nghiệp bác sỹ nội trú*, Trường Đại học Y Hà Nội.

Phẫu thuật nội soi một cửa điều trị ung thư trực tràng: kinh nghiệm của Bệnh viện Trung ương Huế

Phạm Như Hiệp* và cộng sự

Bệnh viện Trung ương Huế

Ngày nhận bài 18.12.2015, ngày chuyển phản biện 22.12.2015, ngày nhận phản biện 20.1.2016, ngày chấp nhận đăng 26.1.2016

Nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả phẫu thuật nội soi (PTNS) một cửa và những kinh nghiệm được rút ra trong quá trình ứng dụng kỹ thuật điều trị ung thư trực tràng tại Bệnh viện Trung ương Huế. Đối tượng nghiên cứu gồm 15 bệnh nhân được chẩn đoán ung thư trực tràng các vị trí và được PTNS một cửa cắt trước, cắt trước thấp, phẫu thuật Pull through và phẫu thuật Miles từ tháng 1.2013 đến tháng 9.2015. Tuổi trung bình bệnh nhân trong nghiên cứu: $63,2 \pm 11,4$ tuổi (45-82), tỷ lệ nam/nữ 1,1/1; tăng CEA trước mổ 40,0%, kích thước u trung bình $3,4 \pm 1,9$ cm (1-7,5). Dùng phương pháp PTNS một cửa: phẫu thuật cắt trước 13,3%, cắt trước thấp 26,7%, phẫu thuật Pull through 6,7%, phẫu thuật cắt cụt trực tràng (Miles) 53,3%. Thời gian phẫu thuật $241,0 \pm 46,8$ phút, kích thước đường mổ $2,7 \pm 1,3$ cm (2-6), thời gian nằm viện $8,6 \pm 3,6$ ngày (6-15), thời gian theo dõi trung bình $17,3 \pm 2,6$ tháng (5-30). Qua nghiên cứu có thể kết luận: PTNS một cửa điều trị ung thư trực tràng bước đầu cho thấy tính an toàn, khả thi, có thể giải quyết được mọi vị trí ung thư của trực tràng và phù hợp với xu hướng phát triển của phẫu thuật xâm nhập tối thiểu trên thế giới.

Từ khóa: phẫu thuật nội soi một cửa, ung thư trực tràng.

Chỉ số phân loại 3.2

Đặt vấn đề

Với quan điểm phẫu thuật xâm nhập tối thiểu trong điều trị các bệnh lý tiêu hóa ngày càng được áp dụng rộng rãi cùng với kinh nghiệm của phẫu thuật viên theo đường cong huấn luyện, PTNS thường quy và nội soi một cửa điều trị ung thư đại trực tràng ngày càng được ứng dụng rộng rãi và đã cho thấy những ưu điểm về kết quả sớm cũng như những kết quả lâu dài [1, 2]...

Năm 2008, PTNS một cửa (single port) lần đầu tiên được thực hiện trong cắt trực tràng bởi Bucher và Remzi và đến nay đã trở thành một phương pháp được lựa chọn ở nhiều trung tâm trên thế giới [3].

Tại Bệnh viện Trung ương Huế, chúng tôi đã tiến hành nhiều PTNS một cửa như cắt ruột thừa, cắt túi mật, khâu lỗ thủng dạ dày, lồng ruột..., trong đó PTNS một cửa ung thư đại trực tràng đã được thực hiện từ năm 2011, đến nay đã thực hiện được số lượng lớn ca phẫu thuật. PTNS một cửa trong ung thư đại trực tràng có nhiều ưu điểm, nếu sử dụng PTNS kinh điển, vấn đề đặt

ra là sau khi phẫu tích, cắt bỏ..., phẫu thuật viên luôn gặp các vấn đề như đem bệnh phẩm ra ngoài, thực hiện miệng nối ngoài hoặc chuẩn bị để thực hiện miệng nối trong bằng stapler.

Xuất phát từ thực tế, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm đánh giá kết quả phẫu thuật và những kinh nghiệm được đúc rút trong quá trình ứng dụng kỹ thuật PTNS một cửa điều trị ung thư trực tràng tại Bệnh viện Trung ương Huế.

Đối tượng phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Gồm 15 bệnh nhân được PTNS một cửa cắt trực tràng trước - trước thấp, Pull through hoặc cắt cụt trực tràng (phẫu thuật Miles) tại Bệnh viện Trung ương Huế từ tháng 1.2013 đến tháng 9.2015.

Phương pháp nghiên cứu: tiến cứu có theo dõi, hóa xạ trị bổ trợ.

Lâm sàng: đau bụng, rối loạn tiêu hóa, đại tiện ra

*Email: phamnhuhipdr@gmail.com

Single port laparoscopic surgery in rectal cancer treatment: experience of Hue central hospital

Summary

The study's objective is to assess the results of single port laparoscopic surgery (SPLS) and experiences from this procedure's applications for rectal cancer treatment. 15 rectal cancer patients (high, middle and low rectum) underwent SPLS with anterior resection, low anterior resection, Pull through procedure or abdominoperineal resection (Miles procedure) from 1.2013 to 9.2015. The results showed that, the average age was 63.2 ± 11.4 years old (45-82) with the male/female ratio 1.1/1, preoperative CEA increased 40.0%, and the average tumor size 3.4 ± 1.9 cm (1-7.5). Methods of SPLS included anterior resection 13.3%, low anterior resection 26.7%, Pull through procedure 6.7%, and Miles procedure 53.3%. Time of surgery 241.0 ± 46.8 minutes, length of incision 2.7 ± 1.3 cm (2-6), hospital stay of 8.6 ± 3.6 days (6-15), duration of follow-up after surgery 17.3 ± 2.6 months (5-30). Conclusion: single port laparoscopic surgery in rectal cancer treatment is safe, feasible, and can solve every position of rectal cancer and be also in accordance with the development trend of minimally invasive surgery in the world.

Keywords: rectal cancer, single port laparoscopic surgery.

Classification number 3.2

máu, sút cân...

Cận lâm sàng: nội soi trực tràng với các hình ảnh tổn thương, kết quả giải phẫu bệnh trước mổ, giải phẫu bệnh sau mổ. CT 64 slice có dựng hình trước mổ, MRI hoặc nội soi siêu âm, nếu u từ giai đoạn T3 trở xuống. Hóa xạ trị theo liệu trình trước sau mổ theo phác đồ của Trung tâm ung bướu, Bệnh viện Trung ương Huế.

Chuẩn bị trước mổ: làm sạch đại tràng, gây mê nội khí quản, tư thế sản khoa.

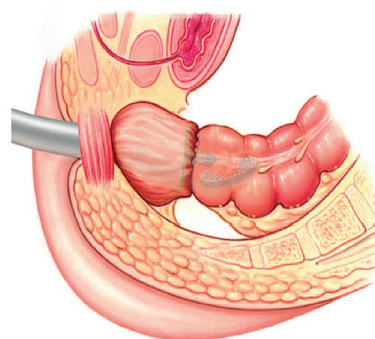
Các kỹ thuật

Kỹ thuật cắt trước và trước thấp nội soi một cửa: chỉ định cho ung thư trực tràng cao (cách rìa hậu môn 10-15 cm) và trực tràng trung gian (cách rìa hậu môn 6-10 cm). Đặt dụng cụ một cửa qua đường rạch 2-2,5 cm xuyên qua trung tâm rốn. Qua các kênh của dụng cụ một cửa, đặt đèn soi và dụng cụ thao tác. Việc thám sát ổ phúc mạc là động tác bắt buộc để đánh giá vị trí khối u, mức độ xâm lấn và giúp khẳng định chưa có di căn như đánh giá trước mổ. Phẫu tích và di động đại tràng sigma, đại tràng xuống, bộc lộ và thắt động mạch, tĩnh mạch mạc treo tràng dưới sát gốc để đảm bảo nguyên tắc ung thư học.



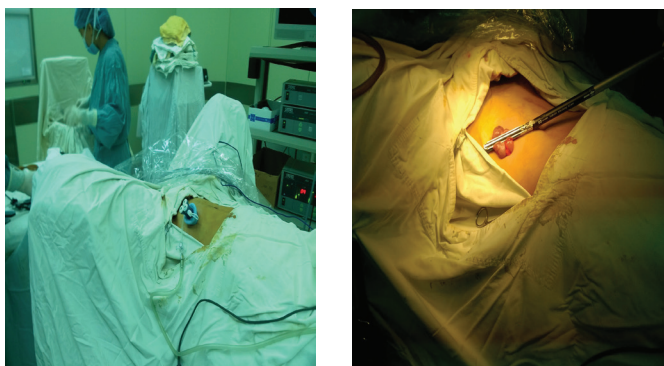
Hình 1: phẫu thuật cắt trước và trước thấp

Với u trực tràng cao, di động trực tràng kèm u theo kỹ thuật TME xuống dưới u 5 cm và đi ngược lên sát thành trực tràng để cắt bỏ rộng rãi mạc treo trực tràng. Với u trực tràng trung gian: thực hiện TME hoàn toàn. Cắt ngang trực tràng dưới u 2-3 cm bằng Endo-GIA 60 mm, đưa trực tràng kèm u qua vị trí đặt dụng cụ một cửa, cắt đoạn đại trực tràng kèm u và gắn đầu trên với máy khâu cắt vòng (EEA). Thực hiện miệng nối đại tràng sigma - trực tràng còn lại bằng EEA phối hợp qua đường tăng sinh môn dưới hướng dẫn nội soi.



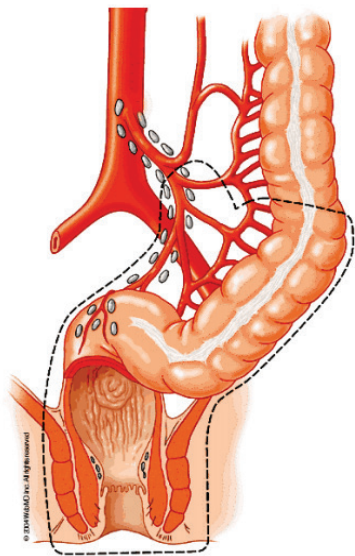
Hình 2: kỹ thuật nối máy trong cắt trực tràng trước, trước thấp nội soi

Kỹ thuật cắt cụt trực tràng nội soi một cửa: chỉ định cho ung thư trực tràng 1/3 dưới, có xâm lấn hoặc không thể thực hiện phẫu thuật bảo tồn cơ thắt. Phẫu thuật viên và người phụ đứng bên trái bệnh nhân. Đặt dụng cụ một cửa ở hố chậu trái, đặt đèn soi và các dụng cụ thao tác thám sát ổ phúc mạc, đưa đại tràng sigma ra ngoài và cắt đôi bằng GIA 60 mm. Đầu trên sẽ được đưa ra hố chậu trái làm hậu môn nhân tạo sau khi tháo trocar 1 lỗ.



Hình 3: vị trí trocar một cửa hố chậu trái và cắt đại tràng sigma

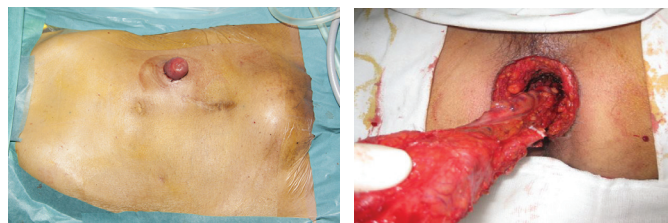
Đặt lại dụng cụ một cửa, phẫu tích và thắt động mạch mạc treo tràng dưới sát gốc, di động trực tràng theo kỹ thuật TME xuống đến mặt trước xương cùng và cơ nâng hậu môn, cắt dây chằng phúc mạc hai bên của trực tràng.



Hình 4: nguyên lý phẫu thuật cắt cụt trực tràng

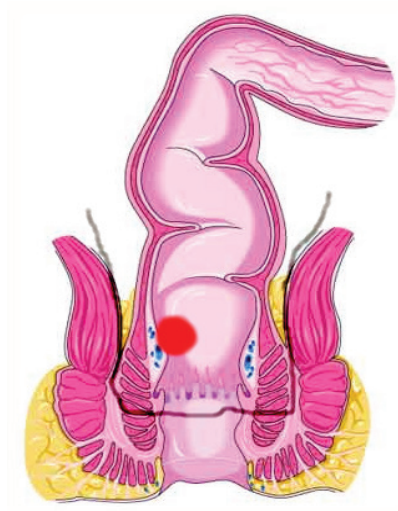
Chuyển qua thì phẫu thuật tầng sinh môn: khâu kín ống hậu môn, cắt dây chằng hậu môn - cùng, cắt cơ nâng hậu môn đảm bảo diện cắt bỏ xung quanh an toàn, phẫu tích đi lên vào khoang trước xương cùng.

Tách trực tràng ra khỏi tiền liệt tuyến hay âm đạo, rút bỏ trực tràng kèm khối u ra ngoài qua tầng sinh môn.



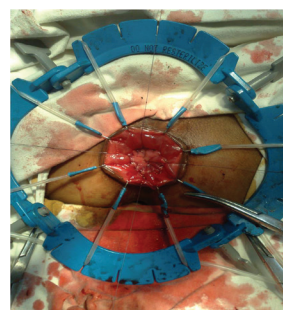
Hình 5: hậu môn nhân tạo vĩnh viễn và phẫu tích tầng sinh môn

Kỹ thuật phẫu thuật Pull through: chỉ định cho ung thư trực tràng thấp ở giai đoạn T₁₋₃, không có xâm lấn cơ thắt, cơ nâng hậu môn và cơ thắt ngoài. Kích thước khối u nhỏ để có thể kéo ra ngoài qua hậu môn.



Hình 6: nguyên lý bảo tồn cơ thắt

Việc phẫu tích và di động trực tràng thì nội soi giống với phẫu thuật cắt cụt trực tràng thì bụng. Với thì tầng sinh môn, kỹ thuật Pull through được phát triển từ phẫu thuật Soave, gồm phối hợp cắt bỏ niêm mạc trực tràng đi từ dưới lên, vào ổ phúc mạc bằng đường mở trực tràng dưới u, kéo đoạn trực tràng kèm u ra đường hậu môn và làm miệng nối đại tràng - hậu môn thực hiện bằng khâu tay [4].



Hình 7: miệng nối đại tràng - ống hậu môn bằng khâu tay

Kết quả

Các bảng từ 1 đến 4 thể hiện đặc điểm chung của các bệnh nhân trong nghiên cứu, kết quả phẫu thuật, các giai đoạn bệnh sau mổ, kết quả theo dõi, tái khám.

Bảng 1: đặc điểm chung

Đặc điểm chung	n = 15	%
Tuổi trung bình (45-82 tuổi)	63,2 ± 11,4	
Tỷ lệ nam/nữ	8/7	1,1/1
CEA trước mổ		
< 5 ng/ml	9	60,0
≥ 5 ng/ml	6	40,0
Vị trí u qua đánh giá trước mổ		
Trực tràng cao	2	13,3
Trực tràng trung gian	4	26,7
Trực tràng thấp	9	60,0
Kích thước u trung bình (1-7,5 cm)	3,4 ± 1,9	

Bảng 2: kết quả phẫu thuật

Kết quả phẫu thuật	n = 15	%
Phẫu thuật cắt trước	2	13,3
Phẫu thuật cắt trước thấp	4	26,7
Phẫu thuật Pull through (mở thông HT)*	1	6,7
Phẫu thuật cắt cụt trực tràng (Miles)	8	53,3
Thời gian phẫu thuật (180-315 phút)	241,0 ± 46,8	
Tai biến, biến chứng		
Chảy máu	0	0
Nhiễm trùng vết mổ	2	13,3
Kích thước đường mổ (2-6 cm)	2,7 ± 1,3	
Thời gian nằm viện (6-15 ngày)	8,6 ± 3,6	

*: Không xâm lấn vào cơ thắt

Biến chứng trong và sau mổ không nghiêm trọng, đều giải quyết được bằng PTNS hoặc bảo tồn. Không có chuyển mổ mở. Bờ an toàn đạt yêu cầu trên 15 bệnh nhân. Chưa phát hiện tái phát tại chỗ trên cả 2 nhóm bệnh nhân.

Bảng 3: giai đoạn bệnh sau mổ

Giai đoạn	Độ xâm lấn của khối u (TMN)	Cắt trước và trước thấp	Phẫu thuật Pull through	Cắt cụt trực tràng
I	T ₁₋₂ N ₀ M ₀	3	0	0
II	T ₃₋₄ N ₀ M ₀	3	1	5
III	T _x N ₁₋₂ M ₀	0	0	3

Bảng 4: kết quả theo dõi, tái khám

Kết quả tái khám	n = 15	%
Thời gian theo dõi trung bình (5-30 tháng)	17,3 ± 2,6	
Tắc ruột sau mổ	0	0
Hạch lớn cạnh niệu quản	2	13,3
Tái phát tại chỗ	0	0
Đóng mở thông hồi tràng sau 2 tháng	1	6,7

Bàn luận

Qua 15 trường hợp PTNS một cửa trong thời gian hơn 2 năm, điều trị ung thư trực tràng tại Bệnh viện Trung ương Huế, chúng tôi nhận thấy kỹ thuật này phù hợp với xu hướng hiện nay trên thế giới là phẫu thuật càng ngày càng ít xâm nhập và cùng một mục đích phẫu thuật nhưng can thiệp tối thiểu mà đem lại nhiều lợi ích cho bệnh nhân cả về kết quả sớm sau mổ cũng như kết quả lâu dài về mặt ung thư học, đây là điều mà cả phẫu thuật viên và bệnh nhân mong muốn đạt tới [5].

Việc giảm sang chấn trong phẫu thuật là một vấn đề quan trọng trong tất cả các kỹ thuật phẫu thuật mới trong hai thập kỷ qua và PTNS một cửa chắc chắn là bước đột phá quan trọng nhất. Về mặt kỹ thuật, đây là sự phát triển kỹ thuật trên nền phẫu thuật mở và PTNS truyền thống điều trị ung thư trực tràng, việc phẫu tích các mạch máu kèm nạo vét hạch tương ứng vẫn được tiến hành theo đúng nguyên tắc ung thư học.

Tuy nhiên, thay vì bệnh nhân phải chịu một đường mổ dài hoặc nhiều vết mổ cùng với việc tổn thương phúc mạc thì PTNS một cửa khắc phục được nhược điểm này và hơn nữa, vị trí đặt dụng cụ một cửa là nơi dễ đưa bệnh phẩm ra ngoài, cắt bỏ và thực hiện tái lập lưu thông tiêu hóa. Đại trực tràng là tạng rỗng, có thể thu nhỏ và kéo ra ngoài qua vị trí đặt trocar một cửa. Chính điều này làm cho PTNS một cửa có vai trò rất quan trọng trong điều trị ung thư trực tràng, vì tránh phải mở thêm một đường mổ nữa để lấy bệnh phẩm cũng như thực hiện khâu nối [2, 6].

Về việc chỉ định PTNS một cửa ung thư trực tràng: không ít khó khăn mang lại cho kỹ thuật PTNS một cửa, thứ nhất là nguyên tắc tam giác gấp khó khăn, thứ hai là việc bộc lộ phẫu trường trong PTNS một cửa không giống với PTNS truyền thống và thứ ba là tình trạng va chạm và xung đột dụng cụ. Theo Bulut O [7], đây là tình trạng nổi bật và gây khó khăn nhất trong quá trình thực hiện kỹ thuật bằng PTNS một cửa

nói chung và trong ung thư trực tràng nói riêng, vì vậy việc chỉ định nên đặt ra cho những khối u kích thước nhỏ, di động được, chưa có xâm lấn thanh mạc và xung quanh (T1-T3) [7].

Tất cả bệnh nhân đều được đánh giá vị trí, kích thước khối u trước mổ trên CT scan 64 slice để có định hướng và chiến lược phẫu thuật. Trong nghiên cứu này, kích thước khối u trung bình trên CT scan là $3,4 \pm 1,9$ cm, tuy nhiên trên thực tế phẫu thuật thường lớn hơn do có tình trạng viêm, dính và phù nề. Theo nghiên cứu của nhiều tác giả, kích thước khối u càng lớn thì độ xâm nhiễm càng cao và thanh mạc trực tràng - hàng rào ngăn chặn sự phát triển của ung thư sẽ dễ bị phá vỡ theo quá trình phát triển tăng kích thước và xâm lấn của khối u [6, 8].

Cắt toàn bộ mạc treo trực tràng có thể thực hiện tốt bằng PTNS một cửa, tuy nhiên kỹ thuật phức tạp hơn nhiều so với PTNS truyền thống. Do đó, cần có sự lựa chọn bệnh nhân kỹ càng, cũng như phải được thực hiện bởi các phẫu thuật viên giàu kinh nghiệm, đã thực hiện nhiều phẫu thuật cắt trực tràng bằng PTNS truyền thống nhiều công [2, 9].

Nghiên cứu của chúng tôi không gặp chảy máu trong và sau mổ, nhiễm trùng vết mổ 13,3%, tỷ lệ cắt được khối u triệt để là 100%, không có tử vong liên quan phẫu thuật và không gặp tai biến cần phải chuyển mổ mở, điều này có thể do số lượng bệnh nhân nghiên cứu chưa nhiều hoặc phần nào đánh giá được trình độ của phẫu thuật viên PTNS một cửa - là những người đã có kinh nghiệm PTNS ung thư trực tràng theo đường cong huấn luyện.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian phẫu thuật trung bình $241,0 \pm 46,8$ phút (180-315 phút), kích thước đường mổ $2,7 \pm 1,3$ cm (2-6) và thời gian nằm viện $8,6 \pm 3,6$ ngày (6-15). Theo nghiên cứu của Bulut O [7], thời gian phẫu thuật trung bình 229 phút, không gặp tai biến trong mổ và biến chứng sau mổ tính chung là 11,4%, và theo nghiên cứu của Lolle I, Rosenstock S [10], thời gian nằm viện trung bình 4,6 ngày, thấp nhất 4 ngày và cao nhất 16 ngày.

Kết luận

PTNS một cửa điều trị ung thư trực tràng bước đầu cho thấy tính an toàn, khả thi, có thể giải quyết được mọi vị trí ung thư của trực tràng và phù hợp với xu hướng phát triển của phẫu thuật xâm nhập tối thiểu trên thế giới.

Tài liệu tham khảo

- [1] Phạm Như Hiệp, Phan Hải Thanh và cs (2012), “PTNS cắt trực tràng bảo tồn cơ thắt trong điều trị ung thư trực tràng thấp: Kinh nghiệm của Bệnh viện Trung ương Huế”, *Tạp chí PTNS và nội soi Việt Nam*, **1(2)**, tr.140-144.
- [2] Kim S.J, Choi B.J, Lee S.C (2014), “Overview of single-port laparoscopic surgery for colorectal cancers: past, present and the future”, *World J Gastroenterol*, **20(4)**, pp.997-1004.
- [3] Remzi F.H, Kirat H.T, Kaouk J.H, Geisler D.P (2008), “Single-port laparoscopy in colorectal surgery”, *Colorectal Disease*, **Vol.10**, pp.823-826.
- [4] Phạm Như Hiệp, Phạm Anh Vũ và cs (2015), *Các kỹ thuật mới trong ung thư đại trực tràng*, sách chuyên khảo, Nhà xuất bản Đại học Huế.
- [5] Thomas C (2012), *Single Port Laparoscopic Surgery*, Department of General, Visceral and Trauma Surgery Center for Minimally Invasive Surgery, Germany, pp.99-116.
- [6] Cianchi F, Staderini F, Badii B (2014), *Single-Incision Laparoscopic Colectomy: A New Era in the Treatment of Colorectal Cancer*, *Colorectal Cancer - Surgery, Diagnostics and Treatment*, pp.125-140.
- [7] Bulut O (2011), *Single - Incision Laparoscopic Surgery for Rectal Cancer*, *Rectal Cancer - A Multidisciplinary Approach to Management*, pp.137-158.
- [8] Trần Thiện Hòa (2012), “Kết quả bước đầu PTNS cắt trực tràng thấp với miệng nối Đại tràng - Hậu môn khâu tay qua đường hậu môn có bảo tồn cơ thắt trong K trực tràng thấp”, *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*, **tập 16**, phụ bản của số 1, tr.147-151.
- [9] Soo-hong kim, et al (2011), “Single Port Laparoscopic Surgery and Transanal Specimen Retrieval for Sigmoid Colon Cancer”, *J Korean Surg Soc*, **Vol.80**, pp.77-83.
- [10] Lolle I, Rosenstock S, Bulut O (2014), “Single-port laparoscopic rectal surgery - a systematic review”, *Dan Med J*, **61(7)**, p.A4878.

Xác định loài nấm *Candida* phân lập từ máu người bằng bộ kit PCR-RFLP do Học viện Quân y sản xuất

Đỗ Ngọc Ánh^{1*}, Lê Trần Anh¹, Nguyễn Lê Huyền Trang²
Hoàng Cao Sạ³, Nguyễn Khắc Lực¹

¹Học viện Quân y

²Viện Kiểm nghiệm vắc xin và Sinh phẩm y tế

³Bệnh viện đa khoa Tp. Nam Định

Ngày nhận bài 21.12.2015, ngày chuyển phản biện 25.12.2015, ngày nhận phản biện 20.1.2016, ngày chấp nhận đăng 27.1.2016

Mục tiêu của nghiên cứu là ứng dụng bộ kit PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) do Học viện Quân y sản xuất để xác định loài nấm men phân lập từ máu bệnh nhân nhiễm nấm máu. 93 mẫu nấm men phân lập từ máu bệnh nhân đã được sử dụng để xác định loài bằng bộ kit PCR-RFLP. Loài nấm được xác định căn cứ vào kích thước sản phẩm PCR và số lượng, kích thước các mảnh cắt giới hạn. Kết quả cho thấy, trong số 93 chủng nấm men phân lập từ máu có 18 chủng là *Candida albicans*, 47 chủng *C. tropicalis*, 1 chủng *C. krusei*, 6 chủng *C. glabrata*, 16 chủng *C. parapsilosis* và 5 chủng chưa rõ loài. 5 chủng chưa rõ loài được xác định là *Candida mesorugosa* bằng so sánh trình tự gen. Thông qua nghiên cứu, có thể kết luận rằng: bộ kit PCR-RFLP là công cụ đơn giản, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có thể ứng dụng tốt trong xác định các loài nấm phân lập từ máu, độ chính xác cao hơn so với soi tươi và định danh bằng máy vitek 2 compact.

Từ khóa: máu, nấm men, PCR-RFLP, xác định.

Chỉ số phân loại 3.2

Distribution of *Candida* species collected from blood of Vietnamese patients based on PCR-RFLP kit

Summary

The purpose of this study was to identify yeast species isolated from the blood samples by PCR-RFLP kit. In this study, the authors used PCR-RFLP kit as a method for the specification of yeast isolates from 93 blood samples. The amplified product was digested using restriction enzyme by RFLP to identify candida species. The results showed that, the most frequently found species was *C. tropicalis* (n = 47, 50.54%), and followed by *Candida albicans* (n = 18, 19.35%), *C. parapsilosis* (n = 16, 17.20%), *C. glabrata* (n = 6, 6.45%), *C. krusei* (n = 1, 1.08%) and 5 *Candida* spp. By sequencing the PCR products, these 5 isolates were identified as *C. mesorugosa*. In conclusion, PCR-RFLP is an easy, highly sensitive, specific and valuable tool for the rapid identification of yeast isolates from blood. This rapid method will help clinicians to decide on empirical therapy in yeast cases before antifungal susceptibility results are available.

Keywords: blood, identification, PCR-RFLP kit, yeast.

Classification number 3.2

Đặt vấn đề

Candida sp. được xác định là căn nguyên đứng hàng đầu gây nhiễm nấm máu ở người. Trước đây, nhiều nghiên cứu cho rằng *C. albicans* là căn nguyên gây nhiễm nấm máu phổ biến nhất trong số các nấm *Candida sp.* Tuy nhiên, một số nghiên cứu gần đây cho thấy, nhiễm nấm máu do *Candida non-albicans* có xu hướng tăng lên. Theo một số nghiên cứu tại Ấn Độ, *C. tropicalis* là căn nguyên phổ biến nhất gây nhiễm nấm máu [1]. Một số vi nấm khác có thể gây nhiễm nấm máu nhưng tỷ lệ gặp ít hơn là *C. neoformans*, *Penicillium marneffeii*... [2-4].

Loài nấm *Candida* có thể được xác định bằng các biện pháp truyền thống như soi tươi, nuôi cấy, thử nghiệm huyết thanh, thử phản ứng

*Tác giả liên hệ: Tel: 0989255773, Email: dranhk61@gmail.com

sinh hóa... nhưng các phương pháp này thường mất khá nhiều thời gian hoặc gặp phải những khó khăn nhất định và một số trường hợp vẫn không xác định được loài [1, 5]. Với ưu điểm cho kết quả nhanh và chính xác, kỹ thuật RFLP-PCR được nhiều tác giả trên thế giới lựa chọn sử dụng. Trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước mã số KC10.32/11-15, nhóm nghiên cứu của Học viện Quân y đã chế tạo thành công bộ kit PCR-RFLP xác định 7 loài nấm men gây bệnh thường gặp. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu ứng dụng bộ kit PCR-RFLP do Học viện Quân y sản xuất để xác định loài nấm men phân lập từ máu bệnh nhân nhiễm nấm máu.

Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

93 chủng nấm men được phân lập từ máu của người bệnh nhiễm nấm máu tại Bệnh viện Chợ Rẫy (85 chủng) và Bệnh viện Quân y 103 (8 chủng).

Vật liệu nghiên cứu

Dụng cụ: máy PCR (GeneAmp PCR system 9700 AB - Applied Biosystem, Mỹ), máy ly tâm lạnh Mikro 22R (Hettich, Đức), máy soi và chụp gel Dolphin Doc (Wealtec, Mỹ), bộ điện di...

Sinh phẩm hóa chất: bộ kit PCR-RFLP do Học viện Quân y sản xuất (gồm các thành phần chính: dung dịch MC1-RFLP, MC2-RFLP, M-enzyme, T-buffer, Marker 100, Loading dye, chứng dương, chứng âm...), Sabouraud's Dextrose Agar (SDA), dung dịch NaCl 0,9%, dung dịch mực tàu, bộ kit tách ADN tổng số (QIAGEN, Mỹ), gel agarose, dung dịch TBE 0,5%, các hóa chất cần thiết khác.

Phương pháp nghiên cứu

Phân loại nấm men bằng hình thái: các chủng nấm được tăng sinh bằng cách cấy trên môi trường thạch Sabouraud. Khuẩn lạc sau khi mọc được quan sát, chẩn đoán hình thái (soi tươi - nhuộm mực tàu); còn đối với những nấm *Candida sp.* được tiến hành thử nghiệm huyết thanh.

Thử nghiệm huyết thanh: lấy tế bào nấm từ khuẩn lạc cho vào huyết thanh và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1-2 giờ; sau đó đem ra làm tiêu bản: nếu xuất hiện ống mầm thì đó là nấm *C. albicans*, không xuất hiện ống

mầm thì là *C. non-albicans*.

Tách chiết ADN và thực hiện nhân đoạn gen đích của nấm men: các mẫu nấm men được tách ADN theo quy trình của Hãng QUIAGEN (Mỹ). Sau đó, ADN được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR. Thành phần phản ứng PCR gồm: 2 µl ADN tổng số, 12 µl dung dịch MC1-RFLP và 8 µl dung dịch MC2-RFLP. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt Thermocycle của Hãng Eppendorf (Đức). Thời gian các bước chạy phản ứng PCR như sau: 1 chu kỳ 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ mỗi chu kỳ gồm 94°C trong 40 giây, 56°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút; 1 chu kỳ 72°C trong 15 phút.

Xác định loài nấm men bằng phương pháp RFLP-PCR: sản phẩm phản ứng PCR được cắt giới hạn với các thành phần: 10 µl dung dịch M-enzyme, 11 µl T-buffer và 9 µl sản phẩm PCR. Hỗn dịch được ủ trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 37°C trong 90 phút. Sản phẩm cắt giới hạn và sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên thạch Agarose 2% trong thời gian 45 phút ở điện thế 100 V cùng với thang ADN chuẩn 100bp (Norgen). Bản gel điện di tiếp tục được nhuộm bằng ethidium bromide (0,5 µg/ml) trong 15 phút và được ghi hình trên thiết bị chụp gel Dolphin Doc (Wealtec, Mỹ). Hình ảnh điện di được sử dụng để phân tích xác định loài nấm men dựa vào kích thước sản phẩm PCR và cắt giới hạn như bảng 1 [6].

Bảng 1: kích thước sản phẩm PCR và các mảnh cắt giới hạn

Loài nấm	Kích thước sản phẩm PCR	Kích thước sản phẩm cắt giới hạn
<i>C. albicans</i>	535	297, 238
<i>C. glabrata</i>	871	557, 314
<i>C. tropicalis</i>	524	340, 184
<i>C. krusei</i>	510	261, 249
<i>C. guilliermondii</i>	608	371, 155, 82
<i>C. parapsilosis</i>	520	520
<i>C. neoformans</i>	556	428, 128

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Labo Trung tâm Nghiên cứu y dược học quân sự và Labo nấm Bộ môn Ký sinh trùng - Học viện Quân y.

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 1.2015 đến tháng 9.2015.

Xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý và phân tích bằng các công cụ như SPSS 13.0 for windows, BioEdit...

Kết quả

Kết quả định danh các chủng nấm men bằng phương pháp phân loại theo hình thái được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: kết quả định danh nấm men bằng hình thái

Loài nấm	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>Candida albicans</i>	17	18,28
<i>Candida non-albicans</i>	76	81,72
Tổng	93	100

Các chủng nấm men được phân loại sơ bộ bằng thử nghiệm huyết thanh. Các chủng sinh ống mầm thì kết luận theo hình thái là *C. albicans*. Đối với những chủng không sinh ống mầm tiếp tục được nhuộm mực tàu. Kết quả cho thấy, trong số 93 chủng nấm nghiên cứu có 17 chủng là *C. albicans*, 76 chủng là *Candida non-albicans*. Kết quả định danh các chủng nấm men bằng kỹ thuật PCR- RFLP được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: kết quả định danh nấm men bằng kỹ thuật PCR- RFLP

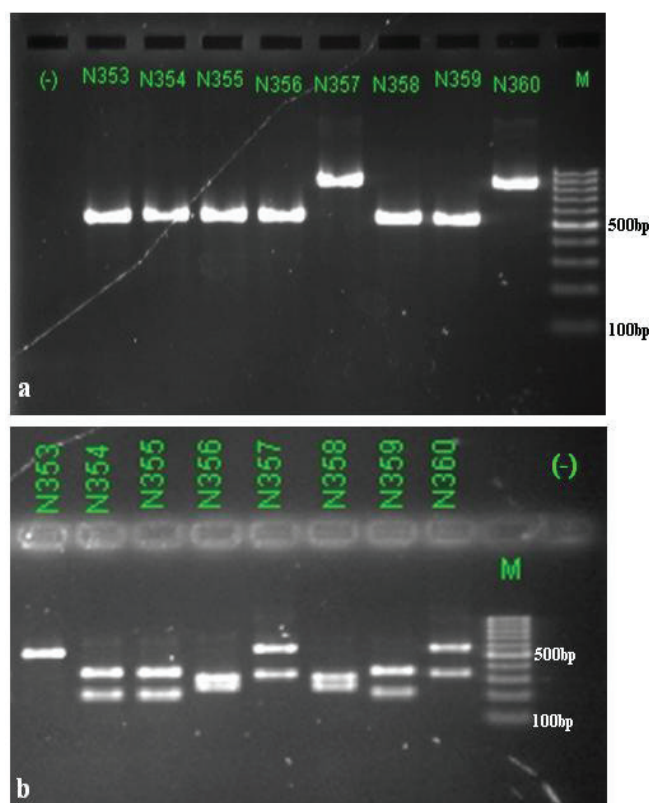
Loài nấm	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>Candida tropicalis</i>	47	50,54
<i>Candida albicans</i>	18	19,35
<i>Candida parapsilosis</i>	16	17,20
<i>Candida glabrata</i>	6	6,45
<i>Candida krusei</i>	1	1,08
<i>Candida spp.</i>	5	5,38
Tổng	93	100

Kết quả xác định loài nấm bằng kỹ thuật PCR-RFLP cho thấy: có 47 chủng là *C. tropicalis*, 18 chủng là *C. albicans*, 16 chủng là *C. parapsilosis*, 6 chủng là *C. glabrata*, 1 chủng là *C. krusei* và 5 chủng chưa xác định. Bảng 4 so sánh kết quả định danh bằng bộ kit

PCR-RFLP do Học viện Quân y sản xuất với máy định danh tự động.

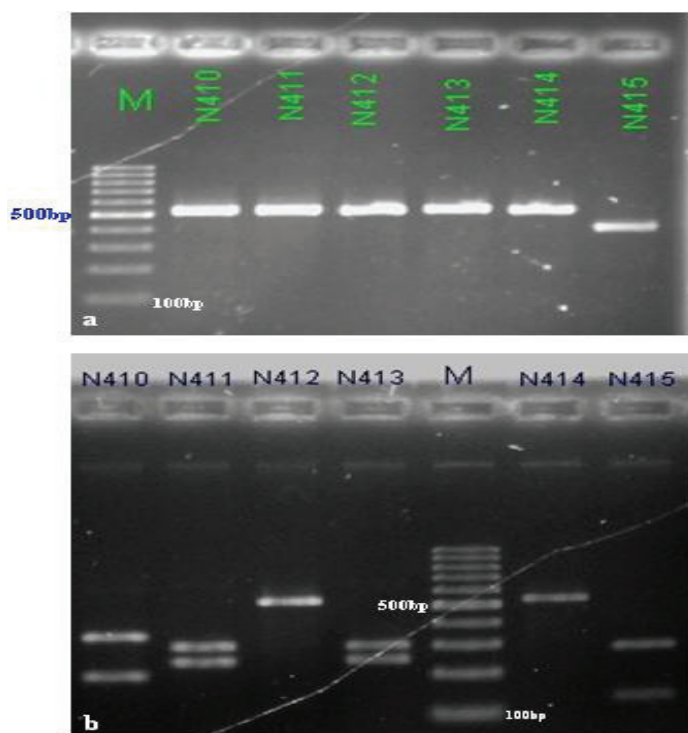
Bảng 4: so sánh kết quả định danh bằng bộ kit PCR-RFLP của Học viện Quân y và máy định danh tự động

Loài nấm	Định danh bằng nuôi cấy Vitek		Định danh bằng PCR-RFLP	
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>Candida tropicalis</i>	14	15,05	47	50,54
<i>Candida albicans</i>	19	20,43	18	19,35
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	16	17,20
<i>Candida glabrata</i>	0	0	6	6,45
<i>Candida krusei</i>	33	35,49	1	1,08
<i>Candida spp.</i>	27	29,03	5	5,38
Tổng	93	100	93	100
$\chi^2 = 85,12; p < 0,001$				



Hình 1: sản phẩm PCR và cắt giới hạn của các chủng N353÷N360 (N353÷N360 là ký hiệu các chủng nấm men nghiên cứu)

Hình 1 cho thấy, các chủng nấm N353÷N360 đều cho kích thước sản phẩm PCR và cắt giới hạn như mô tả ở bảng 1.



Hình 2: sản phẩm PCR và cắt giới hạn của các chủng N410÷N415

Hình 2 cho thấy, các chủng nấm N410÷N414 đều cho kích thước sản phẩm PCR và cắt giới hạn như mô tả ở bảng 1. Riêng chủng N415 kích thước sản phẩm PCR khoảng 400bp, có 2 mảnh cắt giới hạn khoảng 120 và 300bp không như mô tả ở bảng 1.

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, bộ kit PCR-RFLP được xây dựng dựa trên công bố trước đó bởi *Mirhendi* và cộng sự năm 2001 [6]. 93 chủng nấm men *Candida* phân lập từ máu bệnh nhân tại Bệnh viện Chợ Rẫy (Tp Hồ Chí Minh) và Bệnh viện Quân y 103 được đưa vào nghiên cứu. Nguyên lý xác định loài nấm của bộ kit PCR-RFLP dựa vào sự khác biệt về kích thước sản phẩm PCR, số lượng và kích thước các mảnh cắt bằng enzyme giới hạn.

Trước khi sử dụng bộ kit PCR-RFLP, chúng tôi đã tiến hành phân loại nấm dựa vào hình thái và tiến hành thử nghiệm huyết thanh. Kết quả cho thấy, có 17 chủng là *C. albicans*, còn lại 76 chủng là *Candida non-albicans*. Với bộ kit PCR-RFLP, có 18 chủng *C. albicans*, 47 chủng *C. tropicalis*, 1 chủng *C. krusei*, 6 chủng *C. glabrata*, 16 chủng *C. parapsilosis* và 5 chủng chưa xác định. Như vậy, có sự phù hợp cao về kết quả xác định loài nấm *C. albicans* giữa 2 phương

pháp hình thái, thử nghiệm huyết thanh và PCR-RFLP. Điều này cho thấy, kỹ thuật thử nghiệm huyết thanh cho kết quả phân biệt nấm *C. albicans* và *Candida non-albicans* khá chính xác. Tuy nhiên, đối với các nấm *Candida non-albicans*, căn cứ hình thái và thử nghiệm huyết thanh không xác định được loài nhưng với phương pháp PCR-RFLP đã chỉ ra chính xác loài và loài *C. tropicalis* chiếm tỷ lệ cao nhất với 50,54%. Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của *Xess I và cs* (2007) tại Ấn Độ [7]. Như vậy có thể thấy, *C. albicans* không còn chiếm ưu thế trong nhiễm nấm máu mà là các nấm *Candida non-albicans*. Cần mở rộng nghiên cứu để khẳng định kết luận này.

5 chủng chưa được xác định loài là do kích thước sản phẩm PCR và cắt giới hạn không giống như mô tả. Đối với 5 chủng nấm này, kết quả so sánh trình tự gen với ngân hàng gen cho thấy, đây là nấm *Candida mesorugosa* với tỷ lệ tương đồng nucleotide đạt > 99%. Đây là nấm men gây bệnh ít được nhắc tới và thông báo gây nhiễm nấm máu ở Việt Nam.

So sánh kết quả định danh bằng kit PCR-RFLP và máy định danh vitek 2 compact cho thấy, có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 2 phương pháp ($\chi^2 = 85,12$, $p < 0,001$). Sự khác biệt này là do phương pháp nuôi cấy định danh bằng máy định danh dựa vào bảng kết quả lên men thủy phân một số loại đường và một số chất hóa học. Sử dụng càng nhiều phản ứng lên men thì giá trị xác định loài càng cao. Vì thế, trong trường hợp sử dụng hạn chế số lượng các đường lên men thì sẽ có sự nhận diện nhầm một số loại nấm, chẳng hạn như *C. parapsilosis* và *C. krusei*.

Kỹ thuật PCR-RFLP đã được nhiều tác giả như *Ayatollahi Mousavi và cs* (2007) [8], *Alireza Farasat và cs* (2012) [5], *Ramraj Vijayakumar và cs* (2012) [1] áp dụng trong xác định thành phần loài nấm men gây bệnh ở người... Hầu hết đều cho rằng, PCR-RFLP là kỹ thuật sinh học phân tử đơn giản, dễ thực hiện, tốn ít thời gian và có độ nhạy, độ đặc hiệu cao. Nhờ phát hiện nhanh loài nấm gây bệnh, các nhà lâm sàng có thể dựa trên kinh nghiệm điều trị đối với từng loài nấm để đưa ra quyết định dùng thuốc mà chưa cần đến kết quả thử độ nhạy với thuốc kháng nấm [1]. Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi cũng nhận thấy, kỹ thuật này khá đơn giản, chỉ cần 1 kỹ thuật viên được đào tạo khoảng 2-3

tháng là có thể thực hiện được. Thời gian để xác định được loài nấm bằng kỹ thuật này mất khoảng 12 tiếng (tính từ khi tiến hành tách ADN của chủng nấm), nhanh hơn nhiều so với thời gian xác định độ nhạy với thuốc kháng nấm (khoảng 48-72 giờ). Điều này thực sự có ý nghĩa, giúp các nhà lâm sàng có căn cứ lựa chọn thuốc điều trị thay vì phải đợi thêm 2-3 ngày chờ kết quả thử độ nhạy với thuốc kháng nấm. Rõ ràng, nếu được điều trị sớm, bệnh nhân có thể tránh được các biến chứng, di chứng do tiến triển nặng của bệnh gây ra.

Kết luận

Bằng bộ kit PCR-RFLP đã xác định được trong số 93 chủng nấm men phân lập từ máu người có 18 chủng *C. albicans*, 47 chủng *C. tropicalis*, 1 chủng *C. krusei*, 6 chủng *C. glabrata*, 16 chủng *C. parasilosis*. 5 chủng còn lại là nấm *Candida mesorugosa*.

Tài liệu tham khảo

[1] Ramraj Vijayakumar, et al (2012), "Molecular Species Identification of Candida from Blood Samples of Intensive Care Unit Patients by Polymerase Chain Reaction - Restricted Fragment Length

Polymorphism", *Journal of Laboratory Physicians*, **1(4)**, pp.1-4.

[2] Lê Bách Quang và cs (2008), *Ký sinh trùng và côn trùng y học*, Giáo trình giảng dạy đại học - Học viện Quân y, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, tr.382-386.

[3] Trần Xuân Mai và cs (2004), *Vì nấm y học*, Trường Đại học Y dược Tp Hồ Chí Minh, sách tham khảo, tr.107-120.

[4] Nhữ Thị Hoa và cs (2012), "Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của viêm não - màng não do *Cryptococcus neoformans* tại Bệnh viện Nhiệt đới Tp Hồ Chí Minh từ 11.2008 đến 6.2009", *Tạp chí Y học Tp Hồ Chí Minh*, **tập 16**, phụ bản của số 1/2012: Chuyên đề Ký sinh trùng, tr.76-82.

[5] Alireza Farasat, et al (2012), "Identification of Candida Species Screened from Catheter Using Patients with PCR-RFLP Method", *European Journal of Experimental Biology*, **2(3)**, pp.651-656.

[6] S.H Mirhendi, et al (2001), "A PCR-RFLP method to Identification of the Important Opportunistic Fungi: Candida Species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium solani*", *Iranian J. Publ. Health*, **3-4(30)**, pp.103-106.

[7] Xess I, et al (2007), "Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study", *Infection*, **Vol.35**, pp.256-259.

[8] S.A Ayatollahi Mousavi, et al (2007), "Rapid Molecular Diagnosis for Candida species Using PCR-RFLP", *Biotechnology*, **6(4)**, pp.587-593.

Phân lập một số vina-ginsenosides phục vụ công tác tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Nguyễn Minh Đức*, Dương Hồng Tổ Quyên, Nguyễn Thị Minh Tâm, Lê Quốc Việt
Huỳnh Trần Quốc Dũng, Tăng Thị Bảo Trân, Lê Thị Hồng Vân

Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 18.12.2015, ngày chuyển phân biện 22.12.2015, ngày nhận phân biện 22.1.2016, ngày chấp nhận đăng 27.1.2016

Vina-ginsenosides là các hợp chất rất đặc trưng cho sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae). Trong nghiên cứu này, các tác giả phát triển một quy trình để phân lập một số vina-ginsenosides sử dụng làm chất đối chiếu quan trọng nhằm phục vụ cho công tác tiêu chuẩn hóa và đánh giá chất lượng sâm Việt Nam (SVN) và các chế phẩm. Nghiên cứu đã phân lập được 3 vina-ginsenoside có cấu trúc ocotillol bao gồm: V-R2 (98,25%), V-R11 (97,15%) và V-R10 (98,78%). Các hợp chất phân lập được xác định cấu trúc bằng phổ MS và NMR. Kết quả phân lập với sự hỗ trợ của hệ thống sắc ký hiệu năng cao HPLC đã giúp rút ngắn thời gian phân lập cũng như giúp định vị chính xác vị trí chất phân lập trong mẫu, do vậy các vina-ginsenosides phân lập được có độ tinh khiết cao. Quy trình phân lập đơn giản, có tính lặp lại cao, có thể ứng dụng điều chế một lượng lớn các vina-ginsenosides.

Từ khóa: chất đối chiếu, kiểm nghiệm, sâm Việt Nam, tiêu chuẩn hóa.

Chỉ số phân loại 3.4

Đặt vấn đề

SVN (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae), còn gọi là Sâm Ngọc Linh, là một dược liệu quý, đặc hữu của Việt Nam được phát hiện vào năm 1973 ở núi Ngọc Linh, tỉnh Kon Tum [1]. Đến nay, đã có nhiều nghiên cứu về thực vật, hóa học, kiểm nghiệm, tác dụng sinh học và dược lý được tiến hành và chứng minh SVN là một loài sâm quý có các tác dụng dược lý như chống oxy hóa, chống khối u, chống stress [1-6].

Thành phần hóa học chính của SVN ngoài các saponin thuộc nhóm protopanaxadiol, protopanaxatriol đã tìm thấy ở Nhân sâm, Tam thất, Sâm Mỹ... còn có saponin thuộc nhóm ocotillol chiếm hàm lượng cao, đặc trưng là majonosid-R2 (M-R2), mang lại tác dụng chính cho loài sâm này [1].

Từ bộ phận dưới mặt đất của SVN, Nguyễn Minh Đức và cộng sự còn phân lập được nhiều hợp chất mới, đặt tên là vina-ginsenoside với hàm lượng thấp nhưng rất đặc trưng cho SVN và đáng lưu ý [1]. Vì vậy, các vina-ginsenosides có vai trò quan trọng trong nghiên cứu tiêu chuẩn hóa và đánh giá chất lượng SVN và các

chế phẩm.

Bài báo này công bố kết quả phân lập một số hợp chất vina-ginsenosides để sử dụng làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm.

Thực nghiệm

Hóa chất và dụng cụ, thiết bị

Methanol, cloroform, dicloromethan loại tinh khiết phân tích (Xilong, Trung Quốc); acetonitril loại dùng cho hệ thống HPLC (J.T. Baker, Mỹ); nước cất 2 lần.

Bản mỏng sắc ký silica gel F₂₅₄ (Merck, Đức). Silica gel 60 dùng cho sắc ký cột (Merck, Đức) và silica pha đảo RP-18 (ODS), 50-60 µm (Phenomenex, Mỹ). Hệ thống HPLC LC-8A với đầu dò SPD-20A (Shimadzu, Nhật). Cột HiQsil C18, 250×4,6 mm; 5 µm (Kyatech, Nhật). Cột Discovery HS C18, 250×21,2 mm; 10 µm (Sigma-Aldrich, Mỹ). Máy đo khối phổ microTOF-Q (Bruker, Mỹ). Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR AV-500 Ultrashield (Bruker, Mỹ).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng: cao n-BuOH toàn phần (70 g) chiết

*Tác giả liên hệ: Tel: 08.38558411

Developing a procedure for isolation of some vina-ginsenosides to be used as reference standards in standardization and quality control of Vietnamese ginseng

Summary

Vina-ginsenosides are characteristic minor saponins in Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.- Araliaceae). The study aimed to develop a procedure for isolation of some vina-ginsenosides to be used as reference standards in standardization and quality control of Vietnamese ginseng. The study includes the extractions and isolation of 3 vina-ginsenosides which share the same structure of ocotillol and the verification of these saponins with various criteria including TLC purity, HPLC quantitative analysis, MS and NMR spectra. The isolated saponins were identified as vina-ginsenoside R2, -R10, R11 with the HPLC purity > 95%. By using the preparative reverse-phased HPLC system with an ODS column, the isolation procedure of these compounds could be simpler and faster. The result showed the developed method was suitable for isolation of these compounds to be used as the reference standards for standardization and quality control of Vietnamese ginseng.

Keywords: quality control, reference standards, standardization, Vietnamese ginseng.

Classification number 3.4

xuất từ thân và rễ SVN. Các chất đối chiếu: Vina-ginsenoside R2 (V-R2), Vina-ginsenoside R11 (V-R11) do Ban Nghiên cứu khoa học - thư viện, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu:

Chiết suất cao *n*-BuOH toàn phần: bộ phận dưới mặt đất (thân rễ và rễ củ) của SVN sau khi sấy khô, được xay nhỏ, chiết Soxhlet với MeOH. Cô đặc dưới áp suất giảm để loại dung môi, thu được cặn. Hòa tan cặn với nước cất, lắc đều với ethyl acetate (EtOAc), cô đặc thu được cao EtOAc và cao nước. Cao EtOAc

tiếp tục được hòa tan với nước và chiết phân bố với *n*-BuOH bão hòa nước, cô đặc thu được cao *n*-BuOH toàn phần SVN.

Phân lập các vina-ginsenosides từ cao *n*-BuOH:

- Phân lập các phân đoạn từ cao *n*-BuOH toàn phần SVN bằng phương pháp sắc ký cột (SKC) cổ điển sử dụng cột 6,5×60 cm. Triển khai bằng EtOAc-MeOH (100:0), thay đổi tỷ lệ phân cực tăng dần, mỗi lần không quá 10%. Kiểm tra các phân đoạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM), HPLC, thu được: phân đoạn A có chứa nhiều chất X, phân đoạn B có chứa nhiều V-R2 và phân đoạn C có chứa nhiều V-R11.

- Phân đoạn A được tiếp tục loại tạp bằng SKC cổ điển, sử dụng cột 4×40 cm. Triển khai bằng CHCl₃-MeOH (95:5), thu được phân đoạn A4 giàu chất X và đã loại bớt tạp. Phân tích phân đoạn A4 bằng HPLC và tiếp tục tinh chế chất X từ phân đoạn A4 bằng phương pháp HPLC điều chế pha đảo RP-18 để thu được chất X tinh khiết.

- Phân đoạn B được tiếp tục loại tạp bằng SKC cổ điển, sử dụng cột 4×40 cm. Triển khai bằng hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH tăng dần từ 95:5 đến 85:15, mỗi lần tăng không quá 4%, thu được phân đoạn B6 giàu V-R2. Tiếp tục tinh chế phân đoạn B6 bằng SKC cổ điển, sử dụng cột 4×40 cm. Triển khai bằng hệ EtOAc-MeOH tăng dần từ 25:1 đến 8:2. Phân đoạn B6 có chứa V-R2 dễ bay hơi dung môi tự nhiên thu được chất kết tinh V-R2 tinh khiết.

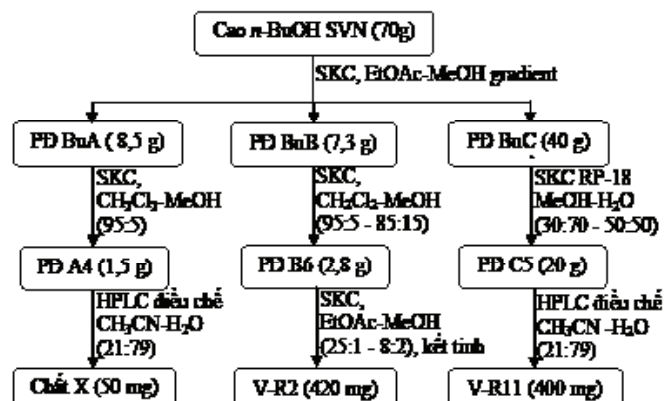
- Phân đoạn C được tiếp tục loại tạp bằng sắc ký lỏng hiệu năng trung bình MPLC pha đảo RP-18 có hệ dung môi MeOH-H₂O có tỷ lệ tăng dần từ 30:70 đến 50:50, mỗi lần tăng không quá 5%, thu được các phân đoạn C5 giàu V-R11. Phân tích phân đoạn C5 bằng HPLC và tiếp tục tinh chế V-R11 bằng phương pháp HPLC điều chế pha đảo RP-18 thu được V-R11 tinh khiết.

Xác định cấu trúc và đánh giá độ tinh khiết các hợp chất thu được:

- Các hợp chất thu được sẽ được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM ở 3 hệ dung môi khác nhau, HPLC phân tích để xác định độ tinh khiết và được xác định cấu trúc bằng phổ MS, NMR.

Kết quả và bàn luận

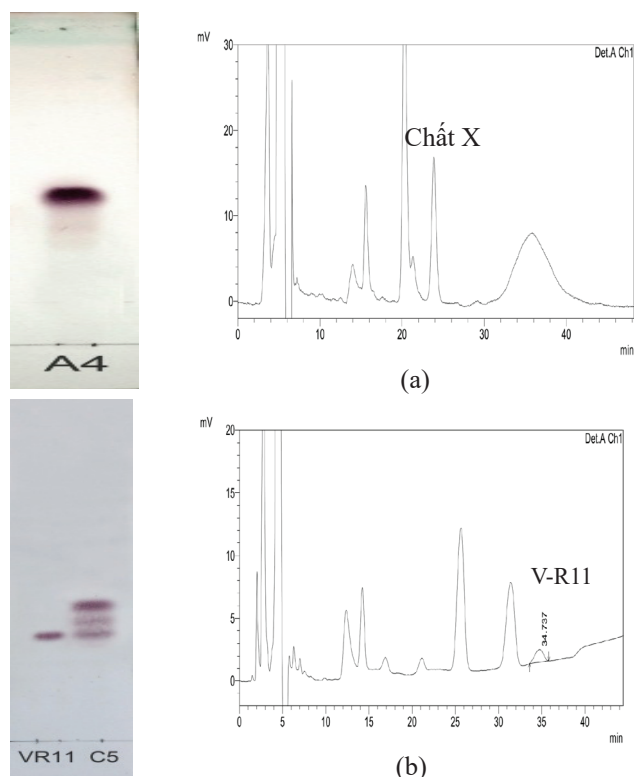
Phân lập các vina-ginsenosides từ cao *n*-BuOH



Hình 1: sơ đồ phân lập các vina-ginsenosides từ cao *n*-BuOH toàn phần SVN

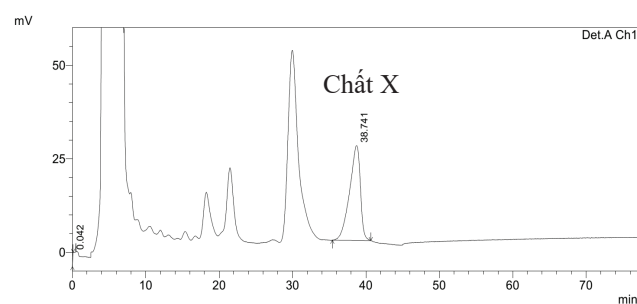
Phân đoạn B6 sau khi loại tạp bằng SKC cô điển, các phân đoạn chứa V-R2 để kết tinh, lọc lấy phần kết tinh và rửa lại với EtOAc-MeOH (25:1) thu được 420 mg V-R2 tinh khiết.

Các phân đoạn A4, C5 được phân tích bằng SKLM và HPLC để tìm hệ dung môi phù hợp áp dụng cho HPLC điều chế.

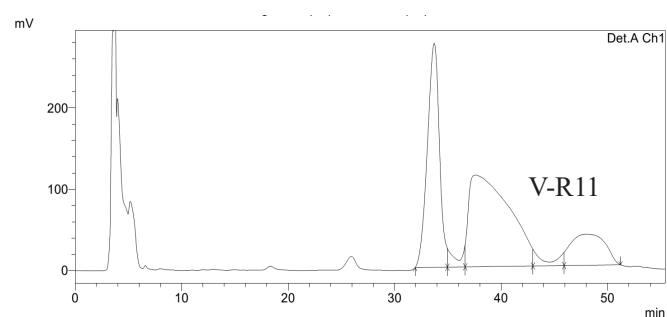


Hình 2: sắc ký đồ SKLM và HPLC phân tích các phân đoạn A4 (a), C5 (b)
 Hệ thống HPLC LC-8A; cột Kyatech HiQsil C-18 (250×4,6 mm, 5 μm);
 phát hiện UV 190 nm; tốc độ dòng 0,8 ml/ph; thể tích tiêm mẫu 20 μl;
 nhiệt độ phòng. Pha động: (a) CH₃CN-H₂O (26:74); (b) CH₃CN-H₂O (23:77)

Dựa vào điều kiện HPLC phân tích các phân đoạn A4, C5 tiếp tục tinh khiết hóa các vina-ginsenosides bằng phương pháp HPLC điều chế.



(a)



(b)

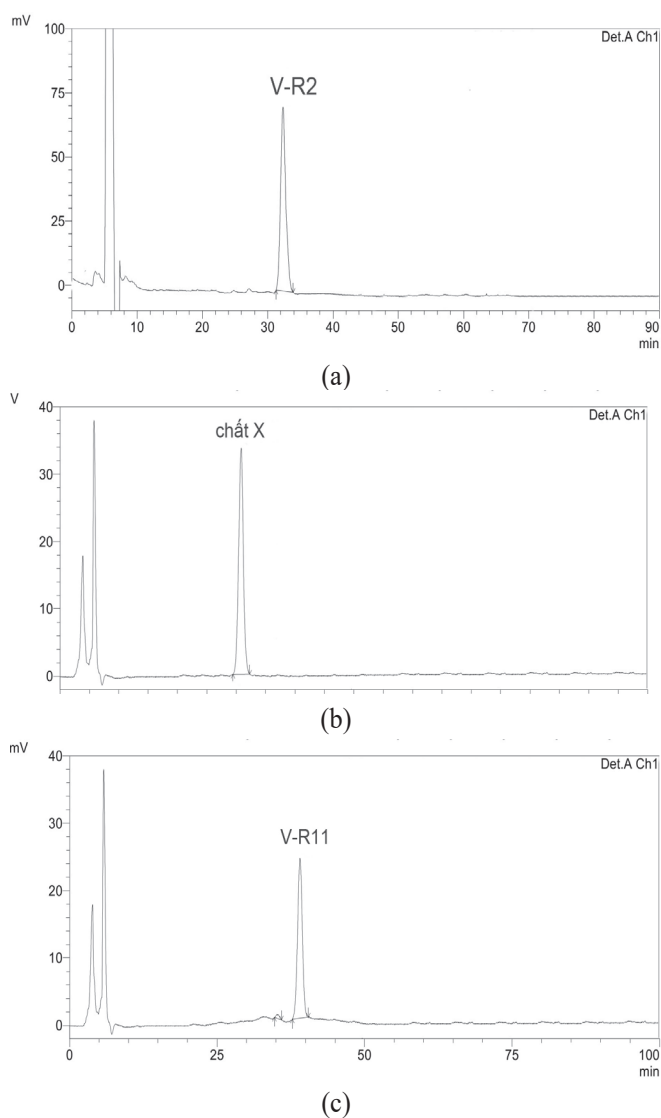
Hình 3: sắc ký đồ HPLC điều chế phân đoạn A4 (a) và C5 (b)
 Hệ thống HPLC Shimadzu LC-10AD; cột Discovery HS C18 (250×21,2 mm;
 10 μm); phát hiện: UV 190 nm; tốc độ dòng: 15 ml/phút; Pha động:
 ACN-H₂O (21:79).

Phân đoạn A4 sau khi được tinh khiết hóa bằng HPLC điều chế thu được 50 mg chất X tinh khiết. Phân đoạn C5 sau khi được tinh khiết hóa thu được 420 mg V-R11.

Xác định cấu trúc và độ tinh khiết của các hợp chất phân lập được

Định tính bằng SKLM: 3 hợp chất phân lập được kiểm tra bằng SKLM ở 3 hệ dung môi khác nhau đều cho một vết duy nhất trên bản mỏng. Riêng V-R2 và V-R11 phân lập được cho Rf trùng với vết của V-R2 và V-R11 chuẩn đối chiếu.

Định tính bằng HPLC phân tích: các hợp chất phân lập được được kiểm tra bằng HPLC phân tích. Kết quả cho thấy V-R2 và V-R11 phân lập được cho 1 pic chính trùng với thời gian lưu của chuẩn V-R2 và V-R11 đối chiếu với độ tinh khiết lần lượt là 98,25% và 97,15%. Hợp chất X phân lập được cho 1 pic chính với độ tinh khiết theo % diện tích pic là 98,78%.



Hình 4: sắc ký đồ HPLC kiểm tra độ tinh khiết của V-R2 (a), chất X (b), V-R11 (c)

Hệ thống HPLC LC-8A; cột Kyatech HiQsil C-18 (250×4,6 mm, 5 μ m); phát hiện UV 190 nm; tốc độ dòng 0,8 ml/ph; thể tích tiêm mẫu 20 μ l; nhiệt độ phòng. Pha động: (a) $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (28:72); (b) $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (26:74); (c) $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (24:76)

Phổ MS: khối phổ của hợp chất V-R2 phân lập được cho ion pic $[\text{M}+\text{H}]^+$ ở m/z 829,0643 tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{43}\text{H}_{72}\text{O}_{15}$ ($M=828,487$) của vina-ginsenoside R2.

Khối phổ của hợp chất V-R11 phân lập được cho ion pic $[\text{M}-\text{H}]^-$ ở m/z 785,8988 tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$ ($M=786,98$) của vina-ginsenoside R11.

Khối phổ của hợp chất X phân lập được cho ion pic $[\text{M}+\text{H}]^+$ ở m/z 655,423 tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_{14}$ ($M=654,8728$).

Phổ NMR: kết quả so sánh phổ ^{13}C -NMR của các chất phân lập: V-R2, V-R11 (đo ở 125 MHz, trong $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) so với số liệu phổ NMR đã được công bố cho thấy là giống nhau. Bên cạnh đó, phổ ^{13}C -NMR và ^1H -NMR của chất X phù hợp với phổ NMR của hợp chất vina-ginsenoside R10 đã công bố.

Bảng 1: so sánh phổ ^{13}C -NMR của các chất phân lập được với tài liệu đã công bố

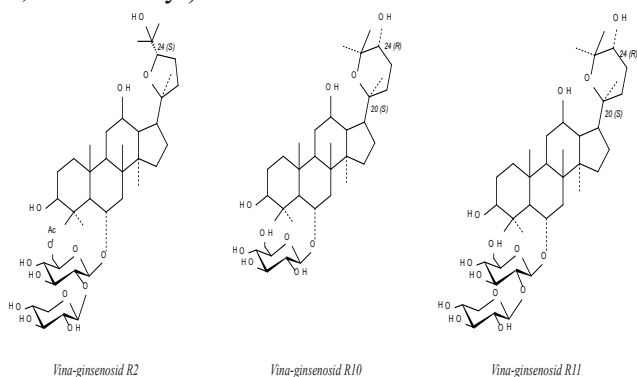
Khung aglycon							Phản đường							
C	1	1R	2	2R	3	3R	C	1	1R	2	2R	3	3R	
1	39,4	39,5	39,5	39,3	39,4	39,6	6-O-Glc	1	103,1	103,5	103,5	103,3	105,8	106,0
2	27,6	27,8	28,0	27,9	27,8	28,1		2	80,1	80,2	80,2	80,1	75,3	75,4
3	78,6	78,7	78,5	78,4	78,3	78,5		3	78,6	78,7	78,7	78,6	79,9	80,1
4	39,9	40,1	40,2	40,0	40,1	40,1		4	71,1	71,2	71,2	71,1	71,8	71,8
5	61,2	61,3	61,4	61,2	61,3	61,5		5	74,9	75,0	79,8	79,7	79,4	79,6
6	79,1	79,3	79,4	79,3	78,4	78,6	Xyl	6	64,9	65,0	62,9	62,7	62,9	62,5
7	45,1	45,3	44,8	44,7	44,9	45,1		1	104,8	105,0	104,8	104,6		
8	41,0	41,1	41,1	40,9	40,9	41,1		2	75,6	75,7	75,8	75,6		
9	50,1	50,2	50,0	49,9	49,9	50,1		3	78,6	78,7	78,8	78,6		
10	39,5	39,6	39,5	39,4	39,3	39,4		4	71,1	71,2	71,7	71,6		
11	32,0	32,2	31,6	31,5	31,9	32,1	CH ₃ CO	5	67,1	67,3	67,2	67,1		
12	70,7	70,8	70,5	70,4	70,4	70,6			20,9	21,0				
13	49,0	49,2	48,9	47,8	48,7	48,9	CH ₃ CO		170,7	170,8				
14	52,2	52,3	52,0	51,9	51,9	52,1								
15	32,4	32,6	32,1	31,9	31,5	31,7								
16	25,7	25,8	27,6	27,5	27,4	27,6								
17	49,4	49,5	52,2	52,1	51,9	52,2								
18	17,7	17,9	17,2	17,1	17,1	17,3								
19	16,9	17,0	17,6	17,4	17,4	17,6								
20	86,9	87,0	77,9	77,8	77,8	77,9								
21	26,8	27,0	26,3	26,1	26,2	26,3								
22	32,4	32,6	27,8	27,6	27,7	27,7								
23	28,5	28,6	25,9	25,7	25,7	25,9								
24	88,3	88,4	74,4	74,3	74,2	74,4								
25	69,9	70,0	80,0	77,9	77,9	78,1								
26	26,4	26,6	23,2	23,1	23,0	23,2								
27	28,8	28,9	29,9	29,9	29,8	29,9								
28	31,6	31,7	31,7	31,6	31,5	30,0								
29	16,8	16,9	16,7	16,5	16,1	16,3								
30	17,8	17,9	17,7	17,6	17,5	17,7								

Ghi chú: 1: V-R2 phân lập; 1R: V-R2 đối chiếu theo tài liệu [2]
2: V-R11 phân lập; 2R: V-R11 đối chiếu theo tài liệu [4]
3: V-R10 phân lập; 3R: V-R10 đối chiếu theo tài liệu [4]

V-R2 phân lập (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): ^1H -NMR δ 0,84; 0,99; 1,22; 1,27; 1,28; 1,35; 1,42; 1,97 (s, 3H, $\text{CH}_3 \times 8$); 2,05 (s, 3H, CH_3CO); 4,95 (1H, $J = 6$ Hz, H-1 của Glc); 5,68 (1H, $J = 6$ Hz, H-1 của Xyl).

V-R10 phân lập (500 MHz, C_5D_5N): 1H -NMR δ 0,81; 1,04; 1,20; 1,32; 1,52; 1,60; 1,68; 2,07 (s, 3H, $CH_3 \times 8$); 3,53 (1H, dd, $J = 11, 5$ Hz, H-3); 3,74 (1H, ddd, $J = 10, 10, 5$ Hz, H-12); 3,86 (1H, dd, $J = 10, 5$ Hz, H-24); 4,43 (1H, ddd, $J = 10, 10, 3$ Hz, H-6); 5,05 (1H, trùng với pic dung môi, H-1 của Glc).

V-R11 phân lập (500 MHz, C_5D_5N): 1H -NMR δ 0,76; 0,95; 1,14; 1,29; 1,42; 1,49; 1,64; 2,04 (s, 3H, $CH_3 \times 8$); 3,47 (1H, dd, $J = 11, 4,5$ Hz, H-3); 3,69 (1H, ddd, $J = 12, 9, 4$ Hz, H-12); 4,35 (1H, m, H-6); 4,91 (1H, d, $J = 5,7$ Hz, H-1 của Glc), 5,72 (1H, d, $J = 5,8$ Hz, H-1 của Xyl).



Hình 5: công thức cấu tạo của các chất vina-ginsenosides đã phân lập

Kết luận

Từ cao *n*-BuOH của phần dưới mặt đất SVN, đã phân lập được 3 vina-ginsenoside có cấu khung ocotillol bao gồm V-R2 (98,25%), V-R11 (97,15%) và V-R10 (98,78%). Các hợp chất phân lập được xác định

cấu trúc bằng phổ MS và NMR. Kết quả phân lập với sự hỗ trợ của hệ thống HPLC điều chế đã giúp rút ngắn thời gian phân lập cũng như giúp định vị chính xác vị trí chất phân lập trong mẫu nên các vina-ginsenosides phân lập được có độ tinh khiết cao. Quy trình phân lập đơn giản, có tính lặp lại cao, có thể ứng dụng điều chế một lượng lớn các vina-ginsenosides trong tương lai nhằm phục vụ cho công tác tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm SVN và các chế phẩm.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007), *Sâm Việt Nam và một số cây thuốc thuộc họ Nhân sâm*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr.141
- [2] N.M Duc, N.T Nham, R Kasai, A Ito, K Yamasaki, O Tanaka (1993), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha e Grushv. Collected in Central Vietnam. I", *Chem. Pharm. Bull.*, **41(11)**, pp.2010-2014.
- [3] N.M Duc, R Kasai, K Ohtani, A Ito, N.T Nham, K Yamasaki, O Tanaka (1994), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha e Grushv. Collected in Central Vietnam. II", *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, p.115.
- [4] N.M Duc, R Kasai, K Ohtani, A Ito, N.T Nham, K Yamasaki, O Tanaka (1994), "Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha e Grushv. Collected in Central Vietnam. III", *Chem. Pharm. Bull.*, **42(3)**, pp.634-640.
- [5] N.T Nham, P.V De, T.C Luan, Nguyen Minh Duc, S Shibata, O Tanaka, R Kasai (1995), "Pharmacognostical and chemical studies on Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (Araliaceae)", *J. Jpn. Bot.*, **70**, p.1.
- [6] Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.804-810.

Nghiên cứu quy trình sản xuất viên nang mềm chứa cao dược liệu Đinh lăng và Bạch quả

Nguyễn Huy Văn*, Trần Quang Lục, Lâm Thị Bích Hồng

Công ty Cổ phần Traphaco

Ngày nhận bài 14.12.2015, ngày chuyển phản biện 16.12.2015, ngày nhận phản biện 12.1.2016, ngày chấp nhận đăng 18.1.2016

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá tác động của một số tá dược và các thông số trong quy trình sản xuất viên nang mềm (mỗi viên chứa 100 mg chiết xuất cao Bạch quả và 300 mg chiết xuất cao Đinh lăng). Kết quả thực nghiệm đã xây dựng được công thức dịch thuốc thích hợp cho sản phẩm ở quy mô 160.000 viên/mẻ với tỷ lệ dầu cọ - sáp ong trắng - dầu đậu nành (20:4:76), tỷ lệ Lecithin/tổng lượng pha dầu là 6%. Đã xây dựng công thức dịch vỏ nang với lượng Glycerin 34%, Sorbitol 24% so với Gelatin. Đồng thời, đã xác định một số thông số phù hợp cho quy trình sản xuất, đó là nhiệt độ ủ gel ở 40°C, thời gian ủ gel 24 giờ, nhiệt độ của nệm bơm dịch là 39-42°C. Các kết quả nghiên cứu đã được triển khai áp dụng vào sản xuất ở quy mô công nghiệp trên 3 lô sản phẩm. Kết quả theo dõi độ ổn định ở điều kiện thường cho thấy, viên đạt tiêu chuẩn chất lượng sau thời gian 24 tháng.

Từ khóa: Bạch quả, chiết xuất, Đinh lăng, viên nang mềm.

Chỉ số phân loại 3.4

Research into the manufacturing process of soft capsules containing Ginkgo biloba and Polyscias fructicosa extracts

Summary

The objective of this study was to assess the impact of some pharmaceutical excipients and the parameters in producing Cebraton soft capsules (1 cap. contains 100 mg Ginkgo biloba extract and 300 mg Polyscias fructicosa extract). The experimental results showed that the Cebraton suspension and gel was formulated: Palm oil/Bee wax/Soybean oil ratio was 20:4:76; Lecithin/lipophilia excipients was 5% in Cebraton suspension; Glycerin/Gelatin and Sorbitol/Gelatin were 34%; 24% in gel. Some processing parameters were determined: gel should be preserved at 40°C in 24 hours before use, and temperature of injection segment was 39-42°C. The manufacturing process for 160.000 Cebraton soft capsules was constructed; the final product conformed to the technical standard after 24 months at real condition.

Keywords: extract, Ginkgo biloba, Polyscias fructicosa, soft capsule.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Hiện nay, các sản phẩm đông dược được sản xuất dưới nhiều dạng bào chế khác nhau, từ các dạng cổ truyền như hoàn cứng, hoàn mềm, trà, cốm, viên bao đường... tới những dạng hiện đại hơn như viên bao phim, viên nang cứng, viên nang mềm... Khó khăn chung khi sản xuất thuốc đông dược dưới các dạng bào chế hiện đại là liều dùng thường khá cao, gây bất tiện cho người sử dụng. Trong số những dạng bào chế đó, viên nang mềm tương đối thuận lợi cho sản xuất thuốc đông dược vì có khả năng chứa được lượng lớn cao dược liệu, ngoài ra còn có các ưu điểm khác như: che giấu được mùi vị dược liệu; thuốc được giải phóng và hấp thu tốt hơn; màng Gelatin và tá dược thân dầu giúp bảo vệ hoạt chất tránh tác động của các yếu tố ngoại môi như độ ẩm, ánh sáng, dịch vị; thể chất viên mềm, dễ uống... [1-5].

Để tạo ra một sản phẩm dạng nang mềm đông dược với hàm lượng lớn để giảm liều dùng, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu bào chế và hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất viên nang mềm Cebraton, mỗi viên chứa 100 mg cao Bạch quả và 300 mg cao Đinh lăng. Các nghiên cứu được tiến hành cả ở quy mô

*Tác giả liên hệ: Email: vannguyenhuy@traphaco.com.vn

pilot và sản xuất thử nghiệm, với mục tiêu hoàn thiện công thức bào chế và xác định các thông số phù hợp cho quy trình sản xuất.

Thực nghiệm

Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Máy trộn phân tán Chang sung (Hàn Quốc).
- Dây chuyền sản xuất viên nang mềm tự động SkySofgel SS100 (Hàn Quốc).
- Các thiết bị kiểm tra chất lượng: máy đo độ bền gel Brookfield (Mỹ), máy đo độ rắn...
- Các nguyên liệu: cao khô Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* extract), cao khô Bạch quả (*Ginkgo biloba* leaves extract) và các tá dược đạt tiêu chuẩn dược dụng.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: quy trình sản xuất viên nang mềm Cebraton.

Phương pháp nghiên cứu:

- Bào chế và hoàn thiện công thức dịch thuốc đóng nang: phân tán cao dược liệu trong tá dược thân dầu bằng máy trộn phân tán và làm mịn bằng máy xay keo. Tạo nang theo phương pháp ép khuôn. Đánh giá chất lượng dịch thuốc qua các chỉ tiêu: thời gian chảy của 200 g dịch thuốc ở 30°C qua phễu thủy tinh có kích thước Φ 80 mm, dài 130 mm (trong đó cuống có đường kính 10 mm, chiều dài 70 mm); mức độ tách lớp của dịch thuốc.

Công thức dịch thuốc cho 1 viên: 100 mg cao khô Bạch quả, 255 mg cao khô Đinh lăng (~ 300 mg cao khô Đinh lăng), 15 mg aerosil và 475 mg các thành phần khác: dầu đậu nành, dầu cọ, sáp ong trắng, Palm oil, Lecithin.

- Bào chế và hoàn thiện công thức dịch vỏ nang: dịch vỏ nang gồm: Gelatin, chất hóa dẻo (Glycerin; Sorbitol), chất màu, chất bảo quản, chất làm thơm và nước. Dịch vỏ nang được pha chế trên thiết bị nấu gel công suất 40-70 kg Gelatin/mẻ.

- Đánh giá độ bền gel: theo phương pháp đo độ Bloom [1].

- Theo dõi độ ổn định: theo hướng dẫn của Asean

về theo dõi độ ổn định, dựa trên tiêu chuẩn cơ sở của sản phẩm.

Kết quả và bàn luận

Hoàn thiện công thức dịch thuốc và dịch vỏ nang Cebraton

Khảo sát tỷ lệ sáp ong trắng, dầu cọ, dầu đậu nành trong dịch thuốc:

Trong dịch thuốc Cebraton, 3 thành phần: sáp ong trắng, dầu cọ, dầu đậu nành đóng vai trò làm môi trường phân tán cao dược liệu. Khảo sát 5 công thức dịch thuốc với tỷ lệ: dầu cọ - sáp ong trắng - dầu đậu nành 8:5:87 (D1), 14:4:82 (D2), 20:4:76 (D3), 23:4:73 (D4) và 20:5:75 (D5), các thành phần khác giữ cố định, pha chế và tạo nang trong cùng điều kiện môi trường và thông số máy. Kết quả khảo sát như trong bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của tỷ lệ sáp ong trắng, dầu cọ, dầu đậu nành/dịch thuốc ($n = 3$)

Chỉ tiêu \ Công thức	D1	D2	D3	D4	D5
Độ chảy trung bình của hỗn dịch (giây)	184 ± 5	168 ± 4	137 ± 3	145 ± 3	175 ± 4
Độ đồng đều khối lượng viên (%)	-5,5 $\rightarrow$ +5,1	-2,2 $\rightarrow$ +4,5	-2,1 $\rightarrow$ +2,9	-3,8 $\rightarrow$ +5,2	-5,7 $\rightarrow$ +4,6
Dịch thuốc sau 48 h/ 40°C	+	-	+	+	-
Dịch thuốc/viên sau 6 tháng/30°C, 75%	+	-	+	+	+

Ký hiệu: -: hơi tách lớp; +: không tách lớp

Như vậy, tỷ lệ sáp ong, dầu cọ, dầu đậu nành có ảnh hưởng rõ rệt đến thể chất dịch thuốc cũng như chất lượng viên. Sáp ong giúp tạo hỗn dịch bền, tuy nhiên lượng sáp ong nhiều sẽ làm cho thể chất dịch thuốc đặc, trơn chảy kém, không thuận lợi cho quá trình pha chế, tạo nang. Kết quả khảo sát cho thấy, dịch thuốc D3 với tỷ lệ dầu cọ - sáp ong trắng - dầu đậu nành (20:4:76) đạt thể chất và độ trơn chảy tốt nhất, viên có độ đồng đều khối lượng tốt.

Khảo sát tỷ lệ Lecithin trong dịch thuốc:

Trong dịch thuốc Cebraton, Lecithin được sử dụng như một chất gây thấm (hay chất phân tán). Tiến hành khảo sát 4 công thức dịch thuốc D6, D7, D8, D9 với tỷ lệ Lecithin/tổng lượng pha dầu lần lượt là: 4,0; 5,0; 6,0 và 7,0%, các thành phần khác giữ cố định theo công thức D3, pha chế và tạo nang trong cùng điều kiện môi trường và thông số máy.

Bảng 2: ảnh hưởng của tỷ lệ Lecithin trong dịch thuốc (n = 3)

Chỉ tiêu	Công thức	D6	D7	D8	D9
Độ chảy trung bình của hỗn dịch (giấy)		175 ± 4	161 ± 3	155 ± 3	147 ± 3
Độ đồng đều khối lượng viên (%)		-2,7 → +3,0	-2,0 → +2,7	-2,3 → +3,2	-3,5 → +1,9
Dịch thuốc sau 48 h/40°C		--	-	+	+
Dịch thuốc/viên sau 6 tháng/30°C, 75%		--	-	+	+

Ký hiệu: --: tách lớp, -: hơi tách lớp, +: không tách lớp

Kết quả khảo sát (bảng 2) cho thấy, dịch thuốc D8, D9 đạt thể chất đồng nhất, không có hiện tượng kết tụ hay tách lớp sau khi để ở 40°C trong 48 h. Tuy nhiên, trong thực tế dịch thuốc D9 khi tạo nang lại khó khăn hơn D8. Do vậy, lựa chọn D8 (6,0% Lecithin so với tổng lượng pha dầu) để xây dựng công thức dịch thuốc.

Khảo sát tỷ lệ chất hóa dẻo trong dịch vỏ nang:

Chất hóa dẻo ảnh hưởng đến độ mềm dẻo, độ bền và khả năng tạo viên của màng gel, từ đó quyết định đến chất lượng của viên nang mềm và hiệu suất của quá trình sản xuất. Ngoài ra, chất hóa dẻo còn có ảnh hưởng nhất định tới độ rã của viên.

Tiến hành khảo sát 4 công thức dịch vỏ nang với tỷ lệ % Glycerin và Sorbitol so với Gelatin là 25-25 (V1), 32-26 (V2), 34-24 (V3), 39-26 (V4), các thành phần khác giữ cố định, pha chế và tạo nang trong cùng điều kiện môi trường và thông số máy. Kết quả khảo sát như trong bảng 3.

Bảng 3: ảnh hưởng của chất hóa dẻo trong công thức dịch vỏ nang (n = 3)

Chỉ tiêu	Công thức	V1	V2	V3	V4
Độ bền gel (gam)		480	504	525	540
Khả năng tạo viên		+	-	++	-
Tỷ lệ viên không đạt hình thức		3,5 %	3,6 %	3,4 %	4,8 %
Độ rã sau 12 tháng/ 30°C, 75%		20 - 22 phút	13 - 16 phút	10 - 12 phút	17 - 19 phút

Ký hiệu: ++: rất tốt, +: tốt, -: kém

Như vậy, với công thức V3 (lượng Glycerin 34%, Sorbitol 24% so với Gelatin) thì quá trình tạo nang thuận lợi cũng như hình thức và độ rã viên tốt nhất.

Khảo sát một số thông số trong quy trình sản xuất Cebraton

Khảo sát nhiệt độ, thời gian ủ dịch vỏ nang:

Dịch vỏ nang sau khi pha chế xong, cần ủ lại trong

1 khoảng thời gian ở nhiệt độ nhất định để ổn định cấu trúc gel trước khi tiến hành tạo nang. Nhiệt độ ủ dịch vỏ nang trước khi tạo nang được khảo sát ở các mức: 40; 50; 60°C và ở các mức thời gian là: 12 h; 24 h; 36 h, 48 h.

Bảng 4: ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian ủ dịch vỏ nang trước khi tạo nang (n = 3)

Thời gian ủ (h)		Nhiệt độ	40°C	50°C	60°C
12	Cảm quan màng gel		Có bọt nhỏ	Có bọt nhỏ	Có rất ít bọt
	Khả năng tạo viên		-	-	-
	Độ bền gel (g)		416	365	268
24	Cảm quan màng gel		Hết bọt khí	Hết bọt khí	Hết bọt khí
	Khả năng tạo viên		++	+	-
	Độ bền gel (g)		359	278	88
36	Cảm quan màng gel		Hết bọt khí	Hết bọt khí	Hết bọt khí
	Khả năng tạo viên		+	-	-
	Độ bền gel (g)		230	182	75
48	Cảm quan màng gel		Hết bọt khí	Hết bọt khí	Hết bọt khí
	Khả năng tạo viên		-	-	-
	Độ bền gel (g)		194	126	47

Ký hiệu: ++: rất tốt, +: tốt, -: kém

Như vậy, để gel vừa hết bọt khí, vừa đảm bảo độ bền cần thiết cho quá trình tạo nang, lựa chọn nhiệt độ ủ dịch gel trước khi tạo nang là 40°C và thời gian để ổn định dịch gel trước khi tạo nang là 24 h.

Khảo sát nhiệt độ tại nệm bơm dịch thuốc vào nang:

Nhiệt độ của nệm bơm dịch ảnh hưởng đến chất lượng mỗi hàn và hình thức của viên. Khảo sát nhiệt độ tại nệm bơm dịch ở các mức: 37-39°C, 39-42°C, 42-44°C để xác định giá trị phù hợp. Kết quả khảo sát như sau:

- Ở mức nhiệt độ 37-39°C, mỗi hàn viên kém, viên có hiện tượng thấm dầu sau khi sấy khô.

- Ở mức nhiệt độ 42-44°C: màng gel quá mềm, nhiều viên bị phồng, méo.

- Ở mức nhiệt độ 39-42°C, viên đạt chất lượng, tỷ lệ viên hỏng thấp.

Như vậy, lựa chọn nhiệt độ cài đặt cho bộ phận nệm bơm dịch thuốc là 39-42°C để viên đạt chất lượng và hiệu suất tốt nhất.

Theo dõi độ ổn định

Tiến hành sản xuất công nghiệp 3 lô với quy trình có công thức và các thông số kỹ thuật đã xác định như trên. Theo dõi độ ổn định của 3 lô sản phẩm ở điều kiện thường (nhiệt độ 30±2°C, độ ẩm 75±5%) theo tiêu chuẩn cơ sở của sản phẩm.

Kết quả: sau 24 tháng, sản phẩm đạt tiêu chuẩn chất lượng đã quy định.

Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu, khảo sát các thành phần tá dược, đã xây dựng công thức dịch thuốc thích hợp cho sản phẩm ở quy mô 160.000 viên/mẻ với tỷ lệ dầu cọ - sáp ong trắng - dầu đậu nành (20:4:76); tỷ lệ Lecithin/ tổng lượng pha dầu là 6%. Đã xây dựng công thức dịch vỏ nang với lượng Glycerin 34%, Sorbitol 24% so với Gelatin. Đồng thời, đã xác định một số thông số phù hợp cho quy trình sản xuất, đó là nhiệt độ ủ gel ở 40°C, thời gian ủ gel 24 h, nhiệt độ của nệm bơm dịch là 39-42°C.

Các kết quả nghiên cứu trên đã được triển khai áp dụng vào sản xuất ở quy mô công nghiệp trên 3 lô sản

phẩm. Kết quả theo dõi độ ổn định ở điều kiện thường cho thấy, viên đạt tiêu chuẩn chất lượng sau thời gian 24 tháng.

Tài liệu tham khảo

- [1] Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [2] *Modern pharmaceuticals*, 4th edition, Chapter 11: Hard and soft shell capsules.
- [3] *Pharmaceutical capsule*, 2nd edition, Chapter 10: Technology to manufacture soft capsules.
- [4] *Pharmaceutical capsules*, 2nd edition, Chapter 11: Formulation and physical properties of soft capsules.
- [5] *Pharmaceutics - The Science of dosage form design*, 2nd edition, Chapter 30: Soft Gelatin capsules.

Nghiên cứu tổng hợp Gefitinib làm thuốc điều trị bệnh ung thư

Nguyễn Văn Tài*, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Thị Hà, Vũ Đức Nam, Nguyễn Tiên Phong

Khoa Hóa thực vật, Viện Dược liệu

Ngày nhận bài 19.12.2015, ngày chuyển phản biện 20.12.2015, ngày nhận phản biện 18.1.2016, ngày chấp nhận đăng 22.1.2016

Bài báo trình bày phương pháp tổng hợp Gefitinib đi từ 3-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde. Gefitinib được sử dụng để điều trị bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC), ung thư tuyến tụy và các bệnh ung thư khác. Quá trình tổng hợp trải qua các bước gồm alkyl hóa nguyên liệu đầu, chuyển hóa nhóm aldehyde thành nhóm nitril tương ứng, nitro hóa, khử hóa, đóng vòng và phản ứng với 3-chloro-4-fluoroanilin để được Gefitinib với 7 giai đoạn và hiệu suất toàn quy trình đạt 15,88%. Sản phẩm và các hợp chất trung gian được xác định cấu trúc bởi các phổ IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS.

Từ khóa: EGFR, Gefitinib, tổng hợp, ung thư, 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde.

Chỉ số phân loại 3.4

Study on synthesis of Gefitinib for cancer drug

Summary

This paper reports a method for synthesis of Gefitinib starting from 3-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde. Gefitinib is used for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC), pancreatic cancer and other cancers. The process includes alkylation of starting material, conversion of aldehyde into the corresponding nitrile, nitration, reduction, cyclization and reaction with 3-chloro-4-fluoroaniline to afford Gefitinib with seven steps and overall productivity of 15.88%. The product and intermediates have been characterized by IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, MS.

Keywords: cancer, EGFR, Gefitinib, synthesis, 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Các thụ thể tăng trưởng biểu bì (EGFR) thuộc họ protein ErbB của receptor tyrosine kinases (RTK) gồm 4 thành viên: ErbB-1/EGFR, ErbB-2/HER-2/neu, ErbB-3/HER-3 và ErbB-4/HER-4. Hoạt hóa enzyme EGFR (ligand-dependent hoặc ligand-independent) dẫn đến sự phosphoryl hóa tại đuôi các tế bào chất của các thụ thể làm tăng sự đáp ứng của các phân tử cơ chất dẫn đến sự hoạt hóa các tín hiệu kích thích tế bào phát triển. Các con đường tín hiệu liên quan đến EGFR bao gồm: RAS-RAF-MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)-AKT, và JAK-STAT (signal transducers và activators of transcription) [1].

Trong các bệnh nhân ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC) (chiếm khoảng 75-80% số bệnh nhân ung thư phổi) và một số bệnh ung thư khác có sự đột biến của gen dẫn đến protein "EGFR" biểu hiện quá mức trên bề mặt của một số tế bào ung thư [2]. Các hợp chất như Gefitinib có khả năng ức chế chọn lọc EGFR và HER-2 bằng cách ngăn chặn sự gia tăng của protein "EGFR", từ đó hạn chế sự phát triển của bệnh nên được sử dụng để điều trị NSCLC, ung thư vú và một số bệnh ung thư không đáp ứng với các phương pháp hóa trị liệu khác [3, 4]. Gefitinib được thương mại hóa và phân phối bởi Công ty Astra-Zeneca với tên thương mại là Iressa, đây là một trong những thuốc điều trị tại đích. Gefitinib được Cơ quan An toàn thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chấp nhận để điều trị NSCLC vào tháng 5.2003, cho đến nay Gefitinib đã được bán trên thị trường ở 64 quốc gia.

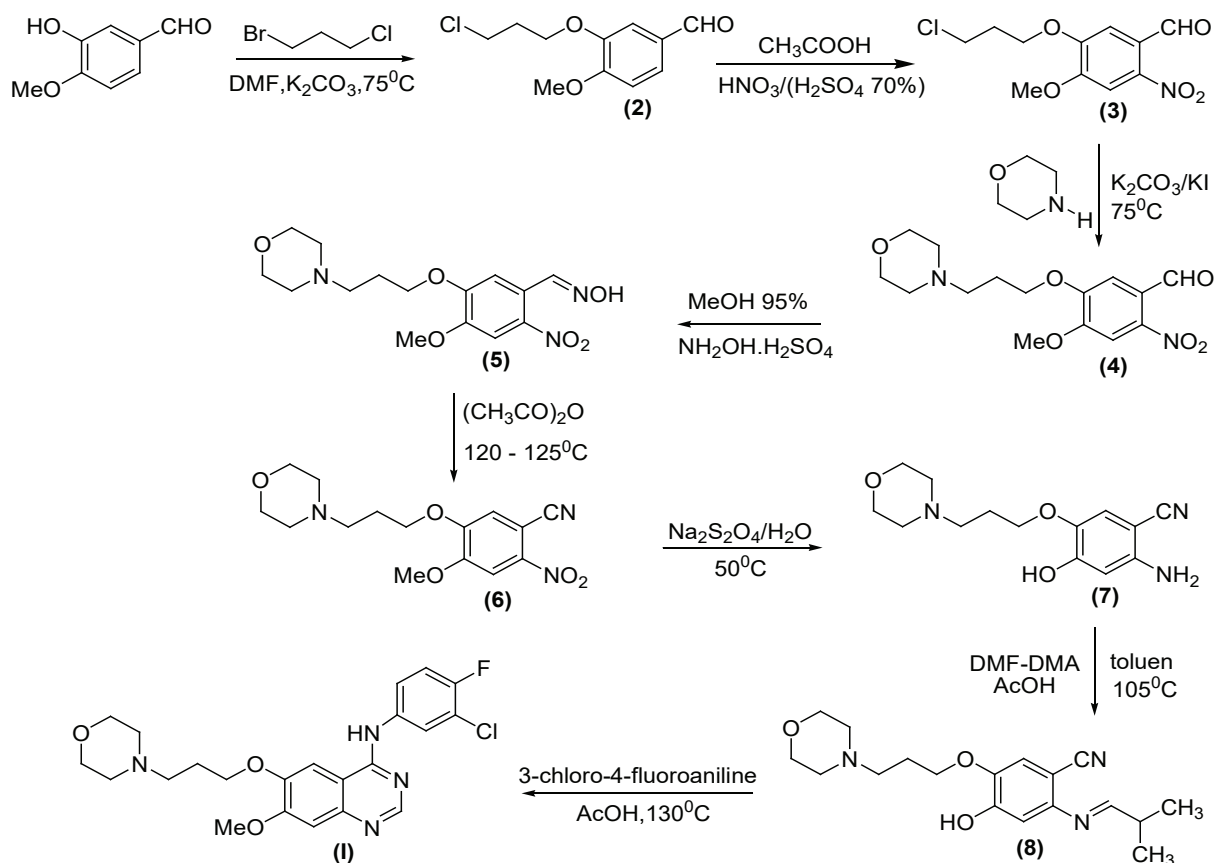
Trong bài báo này, chúng tôi trình bày phương pháp tổng hợp Gefitinib từ nguyên liệu đầu phổ biến rẻ tiền là 3-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde qua 7 giai đoạn, với các phản ứng đơn giản, an toàn, dễ thực hiện.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenvantai1111@gmail.com

Nguyên vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu và thiết bị: hóa chất, dung môi được cung cấp bởi các hãng: Merck, Fisher, AK Scientific hoặc P.A Trung Quốc và được sử dụng trực tiếp không qua tinh chế. Sắc ký lớp mỏng được tiến hành trên bản mỏng silica gel 60 GF₂₅₄ của Merck. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy Bruker AV500, phổ hồng ngoại được đo trên máy quang phổ hồng ngoại Impact 410 Nicolet, phổ khối lượng đo trên máy AutoSpec Premier - Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu: Gefitinib được điều chế từ 3-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde theo sơ đồ sau:



Kết quả, bàn luận

Nhiều tài liệu đã công bố các phương pháp tổng hợp Gefitinib trong phòng thí nghiệm cũng như trong công nghiệp [5-12]. Ở đây, chúng tôi tổng hợp Gefitinib với mục tiêu quy trình tổng hợp đơn giản, an toàn, có triển vọng phát triển ra quy mô lớn.

Gefitinib được tổng hợp từ nguyên liệu đầu là isovanilin. Isovanilin tham gia phản ứng alkyl hóa với 1-bromo-3-chloropropan thu được chất (2) với hiệu

suất 82%. Phản ứng được thực hiện trong dung môi phân cực là DMF, xúc tác vô cơ K₂CO₃ thời gian thực hiện ngắn (3 h). Khi nghiên cứu thay thế DMF bằng các dung môi khác như CH₃CN, THF, toluen thì hiệu suất phản ứng giảm xuống (lần lượt là 78, 72 và 67%), nếu thời gian phản ứng tăng thì sản phẩm có nhiều tạp chất. Như vậy, DMF vẫn là dung môi phản ứng cho hiệu suất cao nhất. Nitro hóa chất (2) bằng acid nitric trong acid acetic bằng với xúc tác H₂SO₄ 70% cho chất (3) có màu vàng sáng. Phản ứng nitro hóa vòng benzen xảy ra khá dễ dàng, ban đầu thực hiện phản ứng ở 0-5°C sau đó kéo dài qua đêm ở nhiệt độ thường để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sản phẩm tách ra khỏi dung dịch dưới dạng kết tủa, trung hòa hỗn hợp

phản ứng đến pH 8, lọc rửa kết tủa nhiều lần với nước thu được sản phẩm (3) với hiệu suất 86%. Hợp chất (3) tham gia phản ứng thế nguyên tử clo bằng vòng morpholin. Phản ứng được thực hiện trong dung môi DMF với xúc tác base vô cơ K₂CO₃, có mặt của KI hoặc TBAI, ở nhiệt độ 75-80°C. Nếu không sử dụng thêm KI hoặc TBAI thì phản ứng chuyển hóa chậm và không hoàn toàn, sau 24 h chỉ khoảng 70% chất đầu chuyển hóa và thời gian phản ứng dài kéo theo nhiều tạp chất sinh ra. Khi có mặt của KI hoặc TBAI thì

phản ứng chuyển hóa hoàn toàn sau 3 h. Phản ứng xảy ra theo cơ chế thế nucleophin thay thế nguyên tử clo trong hợp chất (3) bằng vòng morphorlin, liên kết C-Cl có tính electrophin kém nên phải sử dụng thêm xúc tác KI hoặc TBAI để tạo thuận lợi cho quá trình phân cắt C-Cl, thúc đẩy phản ứng xảy ra nhanh và hoàn toàn. Để tham gia phản ứng đóng vòng tạo dẫn xuất quinazolin, nhóm andehit trong hợp chất (4) được chuyển thành nhóm cyanua thông qua dẫn xuất aldoxim (5). Nhóm andehit trong chất (4) tham gia phản ứng với hydroxy amin hydrochlorid trong dung môi MeOH 95%, KOH là xúc tác. Phản ứng xảy ra hoàn toàn sau 4 h, sản phẩm (5) tạo thành dưới dạng kết tủa tách ra khỏi dung dịch, trung hòa dung dịch phản ứng về pH 7-8 bằng acid acetic, lọc rửa sản phẩm với nước, thu được chất rắn màu vàng cam với hiệu suất thô đạt 81%. Nhóm chức oxim trong hợp chất (5) được chuyển thành nhóm nitril bằng tác nhân anhydrid acetic ở 120°C, theo dõi quá trình phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy sau 5 h phản ứng xảy ra hoàn toàn. Anhydrid acetic giúp tách một phân tử nước để chuyển hóa aldoxim thành nitril, sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp sản phẩm được đổ ra nước đá và trung hòa bằng dung dịch NH_3 đến pH 9, sản phẩm (6) kết tủa khỏi dung dịch được lọc rửa với nước. Hiệu suất thô của phản ứng đạt 87%. Hợp chất (6) được khử hóa nhóm nitro thành nhóm amin bằng tác nhân $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{HCl}$ cho chất (7). Các tác nhân thông thường để khử hóa nhóm nitro thành amin thường được sử dụng là Fe/HCl , $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ 10%, Raney/Ni... Với tác nhân Fe/HCl thường khó kiểm soát được quá trình phản ứng sinh ra nhiều tạp, trong khi đó sử dụng xúc tác $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ 10%, Raney/Ni tiến hành ở áp suất cao lại yêu cầu thiết bị chuyên dụng, nguy hiểm, xúc tác có giá thành cao, phản ứng trong thời gian dài và không hoàn toàn [12]. Trong khi sử dụng tác nhân khử hóa đơn giản $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{HCl}$ ở 50°C, phản ứng xảy ra với hiệu suất 90%, ít tạp chất, không yêu cầu thiết bị đặc thù. Hợp chất (7) tham gia phản ứng one-pot gồm 2 giai đoạn để chuyển thành Gefitinib. Có thể tổng hợp Gefitinib thông qua giai đoạn tạo thành quinazolin-4(3H)-on từ formamidin và các dẫn xuất chlorid như thionyl chlorid. Tuy nhiên, con đường này tồn tại nhiều hạn chế như hiệu suất thấp, cần phải dùng lượng dư formamidin, tác nhân SOCl_2 nguy hiểm và độc hại. Để hạn chế những nhược điểm này, chúng tôi đã tổng hợp Gefitinib từ hợp chất (7) thông qua hợp chất trung gian N' -[2-cyano-5-methoxy-5-{3-(4-morpholinyl)propoxy}phenyl]- N,N -dimethyl formamidin (8) [12]. Chất (7) phản ứng với DMF-DMA sinh ra hợp chất (8),

trong quá trình phản ứng, MeOH sinh ra được cất loại ngay bằng hệ thống Dean-Stark, kết thúc phản ứng, DMF-DMA dư được loại khỏi hỗn hợp phản ứng bằng phương pháp cất dưới áp suất thấp. Chất (8) được sinh ra không cần phải tinh chế mà được cho phản ứng luôn với 3-chloro-4-fluoroanilin với xúc tác là acid acetic ở 120-125°C. Hiệu suất cả hai giai đoạn đạt 50%. Trong quá trình thực hiện phản ứng sinh ra một số sản phẩm phụ, do đó sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel, hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{MeOH}$ (100:0-7:3).

Thực nghiệm

Tổng hợp 3-(3-chloropropoxy)-4-methoxybenzaldehyde (2): cho vào bình cầu 2 cổ dung tích 50 ml (có lắp hệ thống sinh hàn, khuấy từ, nhiệt kế) 2 g isovanilin (0,013 mol, 1 equiv) và 15 ml DMF, khuấy cho hỗn hợp tan hoàn toàn, cho tiếp 5,5 g K_2CO_3 (0,04 mol, 3,08 equiv.) và khuấy trong vòng 15 phút. Sau đó nhỏ từ từ 1,9 ml 1-bromo-3-chloro propan (0,019 mol, 1,5 equiv.) vào bình phản ứng rồi tăng nhiệt độ trong bình lên 75°C và giữ ở nhiệt độ này trong suốt quá trình phản ứng. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng đến khi isovanilin phản ứng hết hoàn toàn (sau khoảng 3 h) thì dừng phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được để nguội về nhiệt độ phòng, đổ ra 100 ml nước đá khuấy trong 30 phút rồi chiết lấy sản phẩm bằng ethyl acetate (3x80 ml), pha hữu cơ được gộp lại và rửa bằng nước muối bão hòa, làm khan bằng Na_2SO_4 , cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 2,46 g sản phẩm dạng tinh thể trắng. Hiệu suất thô của phản ứng đạt 82%. Sản phẩm có $R_f = 0,45$ trên sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi n-hexan:ethyl acetat (8:2). Tinh chế sản phẩm để xác định cấu trúc bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải với hệ dung môi gradient n-hexan:ethylacetate (100:0-9:1). Sản phẩm được chứng minh cấu trúc bằng phổ IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$:

IR (cm^{-1} , KBr): 2926,81; 2828,61 ($-\text{CH}_3$, CH_2); 1683,50 ($\text{C}=\text{O}$); 1587,89; 1516,86; 1474 ($\text{C}=\text{C}$ vòng benzen); 1273, 1120,77 (Ar-O-C). **ESI-MS (m/z):** $[\text{M-H}]^- = 226,98$. **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH); δ (ppm):** 9,82 (s, 1H, H-CHO); 7,58 (d, 1H, H- C_6); 7,48 (s, 1H, H- C_2); 7,16 (d, 1H, H- C_5); 4,21 (t, 2H, H- CH_2Cl); 3,96 (s, 3H, H- CH_3O); 3,80 (t, 2H, H- CH_2O), 2,24 (m, 2H- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOH); δ (ppm):** 192,9; 156,7; 150,3; 131,5; 127,9; 112,6; 112,4; 66,8; 56,7; 42,2; 33,5.

Tổng hợp 5-(3-chloropropoxy)4-methoxy-2-

nitrobenzaldehyd (3): trong bình cầu 2 cổ dung tích 25 ml có lắp khuấy từ chứa 0,5 g 3-(3-chloropropoxy)-4-methoxybenzaldehyd (2,2 mmol) (2) và 3,4 ml acid acetic. Tiến hành làm lạnh phản ứng về 0-5°C bằng đá muối rồi nhỏ từ từ 0,76 ml acid nitric (0,018 mol), sau 15 phút nhỏ tiếp 2 ml acid sunfuric 70%; luôn giữ nhiệt độ hỗn hợp phản ứng trong suốt quá trình ở 0-5°C. Sau đó, phản ứng được tiếp tục khuấy ở nhiệt độ thường đến khi kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng thấy hết chất đầu thì dừng phản ứng (sau 12 h). Đổ hỗn hợp phản ứng vào 50 ml nước đá khuấy trong 30 phút, trung hòa về pH 7,5-8 bằng dung dịch NH_3 , lọc kết tủa, rửa nhiều lần bằng nước thu được 0,515 g sản phẩm là chất rắn màu vàng nhạt. Hiệu suất thô phản ứng đạt 86%. Sản phẩm có $R_f = 0,5$ trên sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi n-hexan:aceton (8:2). Tinh chế sản phẩm để xác định cấu trúc bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải với hệ dung môi gradient n-hexan:ethylacetate (100:0-8:2). Sản phẩm được chứng minh cấu trúc bằng phổ IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$:

IR (cm^{-1} , KBr): 2973,34; 2888,95 ($-\text{CH}_3$, CH_2); 1683,16 ($-\text{CH}=\text{O}$); 1574,6, 1514,89; 1445 ($\text{C}=\text{C}$ vòng benzen), 1286,91, 1224,48 (Ar-O-C). **MS $[\text{M}+\text{H}]^+$** = 274; **$[\text{M-H}]^-$** = 272. **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm):** 10,44 (s, 1H, H-CHO); 7,61 (s, 1H, H- C_5); 7,43 (s, 1H, H- C_2); 4,32 (t, 2H, H- CH_2Cl); 4,01 (s, 3H, H- CH_3O); 3,78 (t, 2H, H- CH_2O); 2,34 (s, 2H, 2H- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3); δ (ppm):** 187,64; 152,69; 143,97; 125,45; 114,08; 110,84; 107,38; 66,06; 56,71; 40,97; 31,83.

Tổng hợp 4-methoxy-5-(3-morpholinopropoxy)-2-nitro benzaldehyd (4): trong bình cầu 2 cổ 25 ml có lắp máy khuấy từ và nhiệt kế chứa 0,28 g 5-(3-chloropropoxy)-4-methoxy-2-nitro benzaldehyd (1,83 mmol, 1equiv.) (3) hòa tan trong 7 ml DMF. Nhỏ từ từ 0,3 ml morpholine (3,47 mmol, 1,9 equiv.) vào hỗn hợp phản ứng, khuấy 15 phút, cho tiếp 0,6 g K_2CO_3 (4,34 mmol; 2,24 equiv.) và 0,3 g NaI (2 mmol; 1,1 equiv.) rồi tăng nhiệt độ phản ứng lên 75°C. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng cho đến khi hết chất đầu (khoảng 3 h) thì dừng. Cô cạn dung môi DMF, cho vào hỗn hợp phản ứng 10 ml nước, chiết với ethyl acetat (3x10 ml), pha hữu cơ được rửa lại với nước muối bão hòa, làm khan bằng Na_2SO_4 rồi cất dưới áp suất thấp thu được 0,234 g sản phẩm màu vàng cam. Hiệu suất thô phản ứng đạt 71%. Trên sắc ký lớp mỏng, sản phẩm có giá trị $R_f = 0,4$ với hệ dung môi n-hexan:ethyl acetat (7:3). Sản phẩm được chứng

minh cấu trúc bằng các phổ IR và MS:

IR (cm^{-1} , KBr): 2966,31; 2910,05 ($-\text{CH}_3$, CH_2); 1683,37 ($-\text{CH}=\text{O}$); 1574,99; 1516,83; 1423 ($\text{C}=\text{C}$ vòng benzen); 1286,84; 1226,03 (Ar-O-C). **MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$** = 325,1.

Tổng hợp 4-methoxy-6-nitro-3-[3-(4-morpholinyl)propoxyl] benzaldoxim (5): trong bình cầu 25 ml có lắp máy khuấy từ, phễu nhỏ giọt và sinh hàn hồi lưu, chứa dung dịch của 0,36 g 4-methoxy-5-(3-morpholinopropoxy)-2-nitro benzaldehyde (1,1 mmol; 1 equiv.) (4) trong 2,6 ml methanol 95%. Nhỏ từ từ dung dịch chứa 0,15 g $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ (2,2 mmol, 2 equiv.) trong 0,4 ml nước vào hỗn hợp phản ứng. Tiếp tục cho vào hỗn hợp phản ứng dung dịch chứa 0,075 g KOH (1,34 mmol) trong 0,6 ml nước. Quá trình phản ứng xuất hiện kết tủa màu vàng cam là sản phẩm (5). Sau 4 h khuấy ở nhiệt độ thường, theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng phản ứng xảy ra hoàn toàn, đổ vào 20 ml nước đá, trung hòa về pH = 7-8 bằng acid acetic. Lọc kết tủa, rửa với 5 ml nước thu được 0,292 g sản phẩm màu vàng cam, hiệu suất phản ứng đạt 81%. Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải với hệ dung môi gradient n-hexan:aceton (100:0-7:3). Sản phẩm được chứng minh cấu trúc bằng phổ IR $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$:

IR (cm^{-1} , KBr): 3433,22 ($-\text{N-OH}$); 2944,36; 2866,43 ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$); 1685,12 ($-\text{CH}=\text{N}$); 1574,62; 1519,37; 1425 ($\text{C}=\text{C}$ vòng benzen); 1289,64; 1225,66 (Ar-O-C).

MS: $[\text{M-H}]^-$ = 338, **$[\text{M}+\text{H}]^+$** = 340. **$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, MeOH); δ (ppm):** 8,59 (s, 1H, H-NOH); 7,68 (s, 1H, H- C_5); 7,45 (s, 1H, H- C_2); 4,22 (t, 2H, H- CH_2Cl); 3,95 (s, 3H, H- CH_3O); 3,73 (t, 4H, H- CH_2O); 2,60 (t, 2H, H- $\text{CH}_2\text{O-Ar}$); 2,53 (t, 4H, H- CH_2N); 2,07 (m, 2H, H- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOH); δ (ppm):** 151,4; 146,86; 123,66; 114,678; 111,74; 111,34; 108,87; 68,61; 67,704; 56,87; 56,44; 54,77; 26,96.

Tổng hợp 4-methoxy-6-nitro-3-[3-(4-morpholinyl)propoxyl] benzonitril (6): trong bình cầu 2 cổ 25 ml có lắp sinh hàn hồi lưu, máy khuấy từ, nhiệt kế, chứa 0,3 g 4-methoxy-6-nitro-3-[3-(4-morpholinyl)propoxyl]benzaldoxim (0,88 mmol) (5) hòa tan trong 6 ml Anhydrid acetic, tăng nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng lên 120-125°C, theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng. Sau 5 h, phản ứng xảy ra hoàn toàn, đưa nhiệt độ về 30-35°C, thêm vào 200 ml nước, điều chỉnh pH về 9-10 bằng dung dịch amoniac, hỗn hợp xuất hiện kết tủa màu vàng nâu. Lọc thu chất rắn, rửa với 20 ml

nước, sấy khô được 0,25 g sản phẩm có màu vàng nâu. Hiệu suất phản ứng đạt 87%. Sản phẩm có $R_f = 0,4$ với hệ dung môi n-hexan:aceton (8:2). Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải với hệ dung môi gradient n-hexan:aceton (100:0-8:2). Sản phẩm được chứng minh cấu trúc bằng phổ IR, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$:

IR (cm^{-1} , KBr): 2965,62; 2838,09 (CH_3 , CH_2); 1573,01, 1524,13; 1459,80 ($\text{C}=\text{C}$ vòng benzen), 1326 (CN); 1271,96; 1215,35 (Ar-O-C). **MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 322$.** **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm):** 7,79 (s, 1H, H-C_5); 7,28 (s, 1H, H-C_2); 4,23 (t, 2H, $\text{H-CH}_2\text{Cl}$); 4,02 (s, 3 H, $\text{H-CH}_3\text{O}$); 3,74 (t, 4H, $\text{H-CH}_2\text{O}$); 2,55 (t, 2H, $\text{H-CH}_2\text{O-Ar}$); 2,50 (t, 4 H, $\text{H-CH}_2\text{N}$), 2,49 (m, 2H; $\text{H-CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3); δ (ppm):** 153,02; 152,34; 142,54; 128,18; 116,37; 115,55; 108,00; 68,24; 66,80; 56,73; 54,81; 53,60; 25,77.

Tổng hợp 2-amino-4-methoxy-5-(3-morpholinopropoxy) benzonitril (7): trong bình cầu 2 cổ 50 ml (có lắp sinh hàn hồi lưu, máy khuấy từ gia nhiệt, nhiệt kế) chứa 0,44 g 4-methoxy-6-nitro-3-[3-(4-morpholinyl)propoxyl] benzonitril (1,37 mmol) (6) và 16 ml nước. Cho từ từ dung dịch chứa 1,2 g natri dithionit hòa tan trong 0,5 ml nước vào bình phản ứng và tăng nhiệt độ lên 50°C , khuấy trong 2,5 h. Sau đó tiếp tục gia nhiệt lên 70°C rồi cho từ từ 8 ml HCl 25% vào hỗn hợp phản ứng, tiếp tục khuấy ở nhiệt độ này trong khoảng 2 h cho đến khi phản ứng xảy ra hoàn toàn. Phản ứng kết thúc, làm lạnh về 20°C và điều chỉnh về pH 10 bằng dung dịch NH_3 . Sản phẩm được chiết với dichloromethan (3 lần x 30 ml), rửa pha hữu cơ với nước và nước muối bão hòa, cất loại dung môi được 0,34 g sản phẩm là chất rắn màu nâu. Hiệu suất phản ứng đạt 90%. Sản phẩm có $R_f = 0,6$ với hệ dung môi triển khai chloroform:methanol (20:1). Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải với hệ dung môi gradient n-hexan:aceton (100:0-7:3). Sản phẩm được chứng minh cấu trúc bằng phổ IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$:

IR (cm^{-1} , KBr): 3461,55 ($-\text{NH}$); 2958,53 ($-\text{CH}_3$, CH_2); 2228,80 (NH); 1575,451; 1536,32; 1456,980 ($\text{C}=\text{C}$ vòng benzen); 1340 (dd hóa trị $-\text{CH}_3$, CH_2); 1340,7 (CN); 1231,15; 1147 (Ar-O-C). **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH); δ (ppm):** 6,9 (s, 1H, H-C_5); 6,45 (s, 1H, H-C_2); 3,96 (t, 2H, $\text{H-CH}_2\text{Cl}$); 3,84 (s, 3H, $\text{H-CH}_3\text{O}$); 3,73 (t, 4H, $\text{H-CH}_2\text{O}$); 2,60 (t, 2H, $\text{H-CH}_2\text{O-Ar}$); 2,55 (t, 4 H, $\text{H-CH}_2\text{N}$), 1,95 (m, 2H; $\text{H-CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOH); δ (ppm):** 157,17; 149,86; 141,64; 119,34; 118,05; 100,26; 86,153; 69,67; 67,56; 56,72,;

56,23; 54,75; 27,17.

Tổng hợp 4-(3'-chloro-4'-fluoroanilino)-7-methoxy-6-(3-morpholino propoxy) quinazolin (1): trong bình phản ứng 25 ml (được lắp với máy khuấy từ, nhiệt kế, thiết bị Dean-Stark) chứa hỗn hợp 0,5 g 2-amino-4-methoxy-5-(3-morpholinopropoxy) benzonitril (1,7 mmol) (7), 6 ml toluen, 0,01 ml acetic acid, 0,5 ml DMF-DMA (3,7 mmol). Tiến hành phản ứng ở 105°C , cất loại methanol sinh ra bằng thiết bị Dean-Stark. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng, sau 3 h chất đầu (7) đã phản ứng hoàn toàn, DMF-DMA dư và toluen được cất loại dưới áp suất thấp thu được hợp chất *N*-[2-cyano-5-methoxy-4-{3-(4-morpholinyl)propoxy}phenyl]-*N,N*-dimethyl formamidin (8) dưới dạng dầu màu nâu. Cho vào bình phản ứng chứa (8) 4,5 ml acetic acid, 0,31 g 3-chloro-4-fluoro anilin (2,1 mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng trong khoảng 5 h ở $125-130^\circ\text{C}$ cho đến khi chất trung gian đã chuyển hóa hoàn toàn (kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng), làm lạnh hỗn hợp phản ứng xuống 25°C , đổ vào 20 ml nước đá và điều chỉnh về pH 9 bằng dung dịch amoniac, thêm vào 30 ml ethyl acetate và khuấy trong 1 h. Chiết pha nước với ethyl acetat (3 lần x 30 ml), gộp toàn bộ pha hữu cơ rửa lại với nước muối bão hòa, làm khan bằng Na_2SO_4 và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu 0,78 g sản phẩm dạng dầu màu nâu. Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{MeOH}$ (100:0-7:3), thu được 0,4 g sản phẩm Gefitinib. Sản phẩm có màu trắng, nhiệt độ nóng chảy $193-196^\circ\text{C}$, $R_f = 0,4$ với hệ dung môi ethylacetate, và 0,6 với hệ dung môi $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{MeOH}$ (9:1). Hiệu suất phản ứng sau chạy cột đạt 50%. Sản phẩm được chứng minh cấu trúc bằng các phổ:

IR (cm^{-1} , KBr): 3393,74 (NH); 2956,67; 2822,72 ($-\text{CH}_3$, CH_2); 1628,97 ($\text{C}=\text{N}$); 1577,86; 1535; 1429,64 ($\text{C}=\text{C}$ vòng benzen), 1222,65; 1112,77 (Ar-O-C). **ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^- = 445$; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 447$.** **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ (ppm):** 8,64 (s, 1H, H-C_2); 7,89 (m, 1H, H-C_8); 7,58 (m, 1H, H-C_5); 7,27 (d, 1H, H-C_5), 7,21 (s, 1H, H-C_2); 7,12 (t, 1H, H-C_6); 4,12 (t, 2H, $\text{H-CH}_2\text{Cl}$); 3,94 (s, 3H, $\text{H-CH}_3\text{O}$); 3,74 (t, 4H, $\text{H-CH}_2\text{O}$); 2,57 (t, 2H, $\text{H-CH}_2\text{O-Ar}$); 2,50 (m, 4H, $\text{H-CH}_2\text{N}$); 2,07 (m, 2H, $\text{H-CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$). **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3); δ (ppm):** 156,33; 155,67; 155,19; 153,71; 153,38; 148,96; 147,42; 124,13; 121,70; 120,99; 116,57; 109,02; 107,75; 101,21; 67,53; 66,61; 56,14; 55,30; 53,59; 25,82.

Kết luận

Gefitinib được tổng hợp từ isovanilin trải qua 7 giai đoạn với hiệu suất toàn quy trình đạt 15,88%. Gefitinib và các chất trung gian được chứng minh cấu trúc bằng các phương pháp phổ IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR. Quy trình tổng hợp đơn giản, an toàn, dễ thực hiện, có khả năng triển khai ra quy mô lớn.

Tài liệu tham khảo

- [1] Xiaoqing Wu, Mingdong Li, Yang Qu, Wenhua Tang, Youguang Zheng, Jiqin Lian, Min Jia, Liang Xu (2010), "Design and synthesis of novel Gefitinib analogues with improved anti-tumor activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**, pp.3812-3822.
- [2] Bernard W Stewart, Paul Kleihues (2008), "World cancer report 2008", WHO.
- [3] Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatito G, De Placido S, Bianco A.R, Tortora G (2000), "Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor", *Clin Cancer Res.*, **6**(5), pp.2053-2063.
- [4] Swaisland H, Laight A, Stafford L, Jones H, Morris C, Dane A, Yates R (2001), "Pharmacokinetics and tolerability of the orally active selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in healthy volunteers", *Clin Pharmacokinet.*, **40**(4), pp.297-306.
- [5] Gibson, Keith, Hopkinson (1996), "Quinazolin derivatives", *WO96/33980*.
- [6] Gilday, John Peter, Moody, David (2004), "Process for the preparation of 4-(3'-chloro-4'-fluoroanilino)-7-methoxy-6-(3-morpholinopropoxy) quinazolin", *WO2004/024703*.
- [7] Jyothi Prasad, Ramanadham, Pulla Reddy, Muddasani, Nageshwara Rao, Bollepalli, Venkaiah Chowdary, Nannapaneni (2005), "An improved process for the preparation of Gefitinib", *WO2005/070909 A1*.
- [8] Rao, Dharmaraj, Ramachandra, Kankan, Rajendra, Narayanrao, Pathi, Srinivas, Laxminarayan (2008), "Process for the preparation of Gefitinib", *WO2008/125867A2*.
- [9] Aggarwal, Ashvin, Kumar, Jain, Anshul, Kumar, Chidambaram, Venkateswaran, Srinivasan, Wadhwa, Lalit (2010), "Process for the preparation of Gefitinib", *WO2010/076810 A2*.
- [10] Petr Knesl, Dirk Röseling, Ulrich Jordis (2006), "Improved Synthesis of Substituted 6,7-Dihydroxy-4-quinazolinamines: Tandutinib, Erlotinib and Gefitinib", *Molecules*, **11**, pp.286-297.
- [11] Ming Dong Li, You Guang Zheng, Min Ji (2007), "Synthesis of Gefitinib from Methyl 3-hydroxy-4-methoxy benzoate", *Molecules*, **12**, pp.673-678.
- [12] Venkateshappa Chandregowda, Gudapati Venkateswara Rao, Goukanapalli Chandrasekara Reddy (2007), "Convergent Approach for Commercial Synthesis of Gefitinib and Erlotinib", *Organic Process Research & Development*, **11**, pp.813-816.

Nghiên cứu bào chế hệ phân tán rắn Felodipin bằng phương pháp phun sấy

Hoàng Văn Đức^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Duyên², Võ Xuân Minh²

¹Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế

²Trường Đại học Dược Hà Nội

Ngày nhận bài 1.12.2015, ngày chuyển phản biện 5.12.2015, ngày nhận phản biện 4.1.2016, ngày chấp nhận đăng: 14.1.2016

Trong nghiên cứu này, các tác giả đã nghiên cứu bào chế hệ phân tán rắn (HPTR) của Felodipin (FDP) bằng phương pháp phun sấy thông qua việc đánh giá ảnh hưởng của các chất mang (PVP K30, HPMC E5 LV, Poloxamer và mannitol) đến độ hòa tan của FDP, từ đó tìm ra công thức (CT) tối ưu để bào chế HPTR. Kết quả, đã đánh giá được ảnh hưởng của một số chất mang thân nước khi sử dụng riêng lẻ và phối hợp đến độ hòa tan của FDP trong HPTR; đã xác định được ảnh hưởng của tỷ lệ FDP và Poloxamer trong HPTR tới khả năng giải phóng dược chất; đã xác định được CT tối ưu bào chế HPTR tỷ lệ (PVP K30:mannitol:Poloxamer:FDP) = (9:2:0,629:0,9313). Độ hòa tan FDP trong HPTR tối ưu cao hơn so với bột nguyên liệu khoảng 2,1 lần. Tiểu phân HPTR hình cầu và ít bị kết tụ.

Từ khóa: chất mang thân nước, Felodipin, hệ phân tán rắn.

Chỉ số phân loại 3.4

A study on preparing solid dispersion system of Felodipine by spray drying method

Summary

In this study, the authors succeeded in preparing the solid dispersion system of Felodipine (FDP) which improves the solubility and dissolution. The influence of hydrophilic carriers including PVP K30, HPMC E5LV, Poloxamer and mannitol on the solubility and dissolution rate of FDP solid dispersion system (SDS) was also studied. In addition, Poloxamer was used as surfactant in FDP SDS, and effect of Poloxamer on the improvement of solubility and dissolution of FDP was also assessed. Finally, the formula of FDP SDS with (PVP K30:mannitol:Poloxamer:FDP) = (9:2:0.629:0.9313) was chosen. The solubility of FDP from SDS was 2.1 times higher than that of raw material FDP. The dissolution of FDP from SDS was also improved, FDP was released and dissolved more quickly and higher than raw material FDP. This SDS could be applied for dosage form of FDP to improve the bioability of the drug.

Keywords: Felodipine, solid dispersion system, the hydrophilic carriers.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

FDP là một thuốc chống tăng huyết áp thuộc nhóm dihydropyridin. Thuốc có khả năng thẩm thấu tốt nhưng kém tan trong nước nên sinh khả dụng phụ thuộc phần lớn vào độ tan và tốc độ hòa tan của FDP.

Tăng độ hòa tan của dược chất là biện pháp hàng đầu để tăng sinh khả dụng của thuốc. Hiện nay, trong thực hành bào chế, HPTR là giải pháp tăng độ hòa tan được ứng dụng rộng rãi nhất. Một số tác giả đã nghiên cứu làm tăng độ tan của FDP bằng HPTR bào chế bằng phương pháp nóng chảy và phương pháp dung môi.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu bào chế HPTR của FDP bằng phương pháp phun sấy thông qua việc đánh giá ảnh hưởng của các chất mang (PVP K30, HPMC E5 LV, Poloxamer, mannitol) đến độ hòa tan của FDP nhằm tìm ra CT tối ưu để bào chế HPTR.

Thực nghiệm

Thiết bị, dụng cụ

Máy phun sấy Buchi mini spray dryer model B-191, máy thử độ hòa tan (ERWEKA DT600 - Đức), máy đo quang UV - Vis (HITACHI U-1900 - Nhật Bản), máy đo pH (EUTECH Instrument - Thụy Điển), máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Shimadzu CLASS-VP 5.03 - Nhật Bản) và các

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

thiết bị, dụng cụ khác đạt tiêu chuẩn.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: nguyên liệu FDP (Trung Quốc, đạt tiêu chuẩn EP 7.0), PVP K30 (Trung Quốc, đạt tiêu chuẩn BP 2008), HPMC E5 LV (Mỹ, TCCS), Poloxamer (Singapore, TCCS), mannitol và các hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn dược dụng hoặc phân tích.

Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp bào chế HPTR: với chất mang là PVP K30, Poloxamer: hòa tan chất mang và dược chất vào ethanol 96%. Với chất mang là HPMC E5LV: ngâm trương nở HPMC E5LV với nước, sau đó hòa tan FDP và các chất mang khác nếu có (trừ mannitol) trong ethanol 96% và phối hợp 2 hỗn hợp. Phân tán mannitol (20% so với tỷ lệ chất mang) vào dung dịch vừa tạo thành bằng máy khuấy từ.

Phun sấy tạo HPTR [1]: sử dụng máy Buchi mini spray dryer model B-191 với các thông số quy trình: nhiệt độ khí đầu vào: 65°C, tốc độ phun dịch: 3 ml/phút, áp suất khí nén: 3 kg/cm², tốc độ hút khí: 90%. Sau khi thu được sản phẩm, tiến hành bảo quản trong bình hút ẩm.

Phương pháp định lượng: sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Pha động: Acetonitril/H₂O (80/20); detector: UV 234 nm; cột: C18 Phenomenex (4,6 mm × 25 cm; 5 µm); tốc độ dòng: 1 ml/phút; thể tích tiêm: 20 µl [2].

Phương pháp đánh giá độ tan: cân chính xác một lượng mẫu tương đương với khoảng 30,0 mg FDP vào bình nón có nút mài. Thêm vào bình chính xác 10,0 ml dung dịch Poloxamer 1%, đậy kín nút, lắc đều ở môi trường nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ, ly tâm 4000 vòng/phút/10 phút, thu lấy dịch trong để định lượng [3].

Phương pháp đánh giá độ hòa tan của FDP: sử dụng thiết bị giỏ tĩnh cánh khuấy; mẫu thử tương đương 5,0 mg FDP đặt trong giỏ kim loại và được nhúng chìm trong môi trường thử độ hòa tan; tốc độ khuấy 50 vòng/phút; môi trường: 500 ml dung dịch natri lauryl sulfat 1% trong đệm phosphat pH 6,5; nhiệt độ 37 ± 0,5°C [4, 5].

Sau các khoảng thời gian thử, hút 12,0 ml dịch hòa tan và bổ sung 12,0 ml môi trường hòa tan mới, đem ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút. Hút 1,0 ml dung dịch chuẩn có nồng độ 100,0 µg/ml vào bình định mức 10 ml, bổ sung vừa đủ thể tích bằng dịch hòa tan tương ứng đã ly tâm rồi lắc đều. Đo độ hấp thụ

bằng máy quang phổ UV - Vis ở bước sóng 363,2 nm.

Nhiều xạ tia X (X-Ray): HPTR được nghiền mịn, ghi với góc quét 5-50° (2θ) ở tốc độ quét 0,030°/phút và nhiệt độ 25°C.

Kết quả và bàn luận

Khảo sát chất mang PVP K30, HPMC E5LV, mannitol

Qua tham khảo tài liệu [6-9] sau khi lựa chọn chất mang, chúng tôi thiết kế CT HPTR như bảng 1 và tiến hành phun sấy theo thông số mô tả ở mục phương pháp nghiên cứu. Kết quả thu được như sau:

Bảng 1: các CT HPTR và % hòa tan dược chất

STT	Chất mang (g)					% hòa tan của FDP ($\bar{X}$, n=3)					
	FLD	PVP K30	HPMC E5LV	Poloxamer	Mannitol	0,5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
CT1	1	9				19,18	32,79	45,59	55,47	63,3	73,72
CT2	1	4,5				45,98	60,42	68,83	71,01	72,43	71,74
CT3	1	3				15,85	25,78	33,06	44,17	47,47	49,8
CT4	1		1			27,09	35,96	47,49	55,3	61,86	63,62
CT5	1		2			26,2	38,84	56,62	64,14	68,27	71,37
CT6	1		3			34,68	47,53	67,48	77,9	82,52	85,89
CT7	1	9		0,5		90,73	97,3	97,47	98,27	97,8	97,48
CT8	1	9		1		87,44	93,3	96,12	96,65	96,73	96,13
CT9	1	9		1,5		87,72	91,91	93,03	94,41	94,7	94,88
CT10	1	4,5		0,5		47,64	57,48	63,58	69,17	72,04	74,28
CT11	1	4,5		1		61,69	74,85	81,32	83,18	84,44	86,37
CT12	1	4,5		1,5		45	61,77	70,34	72,85	81,3	82,27
CT13	1		3	1		49,42	61,21	80,27	88,44	89,43	98,15
CT14	1		3	1,5		32,96	52,14	74,03	82,42	85,93	91,09
CT15	1	1	1			42,49	60,73	73,48	80,05	87,15	91,73
CT16	1	1	2			51,77	70,32	86,86	92,25	96,13	96,49
CT17	1	2	1			36,24	54,2	68,03	72,05	74,86	78,6
CT18	1	1	2	1		57,99	77,16	87,08	92,66	95,76	99,21
CT19	1	1	2	1,5		48,64	67,54	85,92	92,17	94,85	96,51
CT20	1	9		0,5	2	80,99	89,6	92,27	93,95	94,5	96,74

Nhận xét:

- Với chất mang là PVP K30: từ CT1, CT2, CT3 cho thấy, trong khoảng tỷ lệ từ 3:1 đến 9:1 khi tăng tỷ lệ chất mang thì dược chất hòa tan sau 5 h tăng dần. Mức độ tăng trong khoảng tỷ lệ 3:1 đến 4,5:1 rõ rệt (từ 49,80 lên 71,74%), trong khoảng tỷ lệ từ 4,5:1 đến 9:1 thì độ tan dược chất tăng không đáng kể (từ 71,74 lên 73,72%). Tuy nhiên, tốc độ hòa tan trong các giờ đầu ở tỷ lệ 4,5:1 lại cao hơn ở tỷ lệ 9:1. Với kết quả này, tỷ lệ 4,5:1 được lựa chọn để nghiên cứu tiếp theo khi phối hợp với Poloxamer.

- Với chất mang là HPMC E5LV: từ CT4, CT5, CT6 cho thấy, khi tăng tỷ lệ chất mang trong khoảng từ 1:1 đến 3:1 độ hòa tan dược chất tại các thời điểm đều có xu hướng tăng. Tại tỷ lệ 3:1 sau 0,5 h đạt 34,68% và sau 5 h đạt 85,89%, chất mang cải thiện độ hòa tan tốt nhưng tốc độ hòa tan chậm.

- Với chất mang là PVP K30 kết hợp với Poloxamer: số liệu ở CT7, CT8, CT9, CT10, CT11, CT12 cho thấy,

quá trình hòa tan FDP trong 5 h đầu đều tăng lên khi có mặt của Poloxamer ở tất cả mẫu thử. So với CT không chứa Poloxamer thì tốc độ hòa tan giờ đầu của các CT chứa Poloxamer (CT7, CT8, CT9) đều đạt ngưỡng gần bão hòa và có tỷ lệ PVP cao; khi thêm Poloxamer thì mức độ hòa tan ở các CT này cao hơn hẳn so với CT10, CT11, CT12 có tỷ lệ PVP thấp. Như vậy, ảnh hưởng của Poloxamer lên HPTR có tác động của PVP K30.

- Với chất mang là HPMC E5 kết hợp với Poloxamer: số liệu ở CT13, CT14 cho thấy, quá trình hòa tan FDP trong 5 h đầu tăng lên khi có mặt của Poloxamer.

- Với chất mang là HPMC E5 kết hợp với PVP K30: số liệu ở CT15, CT16, CT17 cho thấy, tỷ lệ hòa tan FDP được cải thiện đáng kể khi phối hợp 2 chất mang thân nước so với chỉ dùng 1 chất mang riêng lẻ. Với CT16, mức độ hòa tan gần như tối đa sau 5 h (96,49%), tuy nhiên tốc độ hòa tan của các CT khảo sát này vẫn chậm là do ảnh hưởng của HPMC. CT16 được lựa chọn để nghiên cứu tiếp khi phối hợp với Poloxamer.

- Với chất mang là HPMC E5, PVP K30 và Poloxamer: số liệu ở CT18, CT19 có chứa Poloxamer có cải thiện độ hòa tan nhưng không nhiều so với CT không có Poloxamer (CT16).

- Khảo sát ảnh hưởng của mannitol: sau các nghiên cứu sàng lọc về độ hòa tan, kết quả cho thấy với CT7 thì HPTR có tốc độ và mức độ hòa tan tốt nhất. Tuy nhiên, khi bào chế theo CT7 nhận thấy sản phẩm hút ẩm rất mạnh và nhanh, hình thành nhiều mảng kết tụ và khả năng trơn chảy kém.

Để khắc phục hiện tượng này, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của mannitol tới các thông số về độ hòa tan, cảm quan, độ trơn chảy. So sánh kết quả CT7 và CT20 cho thấy, mức độ hòa tan tương tự nhau. Tuy nhiên, tốc độ hòa tan HPTR ở CT7 cao hơn ở CT20 tại thời điểm giờ thứ nhất. Nguyên nhân có thể là do mannitol bao phủ bên ngoài bề mặt tiểu phân HPTR làm giảm hiện tượng hút ẩm, hút nước của các chất mang thân nước, nên có thể làm giảm nhẹ tốc độ hòa tan tại giờ đầu.

So sánh tính chất vật lý của HPTR không có mannitol (CT7) và HPTR có mannitol (CT20), kết quả cho thấy các tiểu phân thu được ở CT7 có dạng gần cầu, tuy nhiên bột có xu hướng bị dính. Các tiểu phân thu được ở CT20 có dạng cầu hơn, bề mặt trơn nhẵn, các tiểu phân rời, không có xu hướng bị dính. Như vậy, có thể kết luận mannitol có trong CT có vai trò quan trọng trong việc tạo cầu và giảm kết dính giữa các tiểu phân.

Qua khảo sát đầu tiên, CT cấu tạo với tỷ lệ FDP:PVP K30:Poloxamer:mannitol = 1:9:0,5:2 được lựa chọn để

nghiên cứu tiếp.

Quy hoạch thực nghiệm và tối ưu hóa CT bào chế HPTR

Kết quả khảo sát các chất mang cho thấy, Poloxamer là chất mang có ảnh hưởng nhiều nhất đến HPTR, trong khi đó PVP K30 và mannitol tại các tỷ lệ trong CT20 có thể coi là phù hợp. Do vậy, quy hoạch thực nghiệm được thiết kế bằng cách hằng định hàm lượng PVP K30 và mannitol, thay đổi FDP và Poloxamer theo CT cơ bản như sau:

FDP thay đổi (0,8-1,2 g)

Poloxamer thay đổi (0,2-0,8 g)

PVP K30 = 9 g

mannitol = 2 g

Bào chế HPTR bằng cách phân tán các thành phần trên trong 100 ml ethanol 96%, phun sấy theo các thông số đã mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu.

Thí nghiệm được thực hiện với các biến độc lập (FDP và Poloxamer), có các ký hiệu và giá trị như bảng 2; biến phụ thuộc là % giải phóng dược chất (bảng 3).

Bảng 2: ký hiệu và các mức của biến độc lập

Biến độc lập	Ký hiệu	Mức dưới (-1)	Mức cơ bản (0)	Mức trên (+1)
FDP (g)	X1	0,8	1	1,2
Poloxamer (g)	X2	0,2	0,5	0,8

Bảng 3: ký hiệu và các mức của biến phụ thuộc

Biến phụ thuộc	Ký hiệu	Yêu cầu
% FDP giải phóng sau 30 phút	Y1	Max
% FDP giải phóng sau 1 giờ	Y2	Max
% FDP giải phóng sau 3 giờ	Y3	Max
% FDP giải phóng sau 5 giờ	Y4	Max
Độ tan của FDP	Y5	Max

+ Thiết kế thí nghiệm: sử dụng phần mềm Modde 8.0 thiết kế thí nghiệm hợp tử tại tâm (CCF) với 2 biến đầu vào 11 thí nghiệm. Tiến hành bào chế HPTR và đánh giá độ hòa tan, kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4: thiết kế thí nghiệm và % FDP hòa tan từ HPTR

CT	FDP	Poloxamer	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
1	-1	-1	45,49	53,17	72,30	83,00	293,87
2	+1	-1	36,20	42,78	59,29	66,69	259,81
3	-1	+1	64,95	80,56	94,09	96,72	449,64
4	+1	+1	55,80	72,14	84,52	85,21	338,32
5	-1	0	82,17	91,42	96,9	98,90	380,06
6	+1	0	63,81	79,43	87,63	91,35	264,80
7	0	-1	37,78	50,42	67,49	76,06	295,95
8	0	+1	60,67	77,34	91,26	91,88	521,29
9	0	0	79,88	88,72	94,20	97,58	512,50
10	0	0	78,01	87,93	95,45	98,35	501,55
11	0	0	80,99	89,55	93,95	96,74	483,32

+ Phân tích kết quả thực nghiệm:

Chọn mô hình toán học bậc 2: $Y_i = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{12}X_1X_2$

Xác định hệ số của phương trình hồi quy sử dụng phần mềm Modde 8.0 để xử lý số liệu và xác định hệ số của phương trình hồi quy. Kết quả phần mềm đưa ra như sau:

Bảng 5: hệ số phương trình hồi quy

Hệ số	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
A_0	78,04	88,46	94,45	97,27	477,50
A_1	-4,22	-5,23	-4,64	-3,53	-33,62*
A_2	8,26	10,11	8,85	6,76	59,32
A_{11}	-1,81*	-1,66*	-1,25	-1,03*	-73,87
A_{22}	-15,47	-14,30	-8,94	-7,71	-21,27*
A_{12}	1,12*	1,08*	0,68*	0,58*	-9,85*
R	0,968	0,989	0,996	0,973	0,894
$R_{\text{hiệu chỉnh}}$	0,935	0,978	0,992	0,946	0,787

Ghi chú: * là các hệ số không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$)
 $R_{\text{hiệu chỉnh}}$: là hệ số tương quan giữa giá trị thực nghiệm và giá trị tính theo mô hình. $R_{\text{hiệu chỉnh}}$ càng gần 1 thì mô hình càng gần với thực nghiệm

Nhận xét: giá trị $R_{\text{hiệu chỉnh}}$ cao ở mọi biến phụ thuộc cho thấy, các số liệu thực nghiệm có ý nghĩa thống kê. Các hệ số A_1 và A_2 có ý nghĩa với các biến phụ thuộc Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 , như vậy cả FDP và Poloxamer đều có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng giải phóng dược chất. Tuy nhiên với biến Y_5 thì chỉ có A_2 có ý nghĩa thống kê, chỉ có Poloxamer ảnh hưởng đến độ tan của FDP trong HPTR (hàm lượng FDP trong HPTR ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê đến độ tan của FDP trong HPTR, điều này là phù hợp).

Phương trình hồi quy thu được:

$$Y_1 = 78,04 - 4,22 \cdot X_1 + 8,26 \cdot X_2 - 15,47 \cdot X_2^2$$

$$Y_2 = 88,46 - 5,23 \cdot X_1 + 10,11 \cdot X_2 - 14,30 \cdot X_2^2$$

$$Y_3 = 94,45 - 4,64 \cdot X_1 + 8,85 \cdot X_2 - 1,25 \cdot X_1^2 - 8,94 \cdot X_2^2$$

$$Y_4 = 97,45 - 3,53 \cdot X_1 + 6,76 \cdot X_2 - 7,71 \cdot X_2^2$$

$$Y_5 = 477,50 + 59,32 \cdot X_2 - 73,87 \cdot X_1^2$$

+ Dự kiến CT tối ưu:

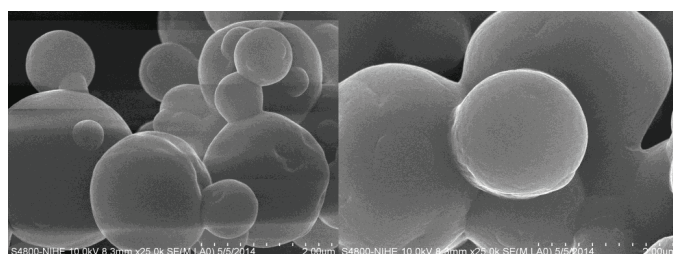
Kết quả xử lý của phần mềm Modde 8.0 thu được CT tối ưu như sau:

PVP K30:mannitol:Poloxamer:FDP = 9:2:0,629:0,9313 g

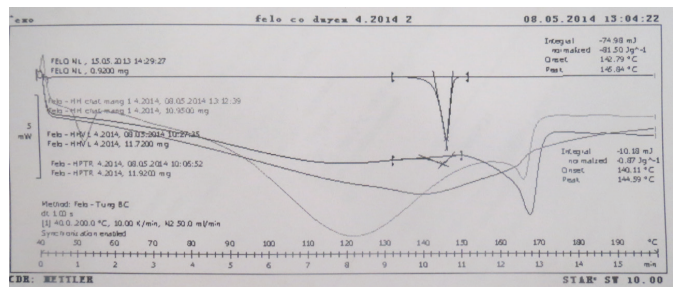
(phân tán trong 100 ml ethanol 96%).

Tiến hành phun sấy và đánh giá lại một số chỉ tiêu của HPTR thu được kết quả như sau: hiệu suất (50,78%), hàm ẩm (6,05%), khối lượng riêng biểu kiến (0,29 g/cm³), hàm lượng dược chất trong HPTR (7,33%), chỉ số nén (22,17). Như vậy, HPTR thu được có hiệu suất khá cao, hàm ẩm, khối lượng riêng biểu kiến thấp, chỉ số nén tương đối thấp nằm trong vùng có khả năng trơn chảy thuận lợi.

Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy, các tiểu phân HPTR có dạng hình cầu, bề mặt trơn nhẵn, ít hiện tượng kết dính.



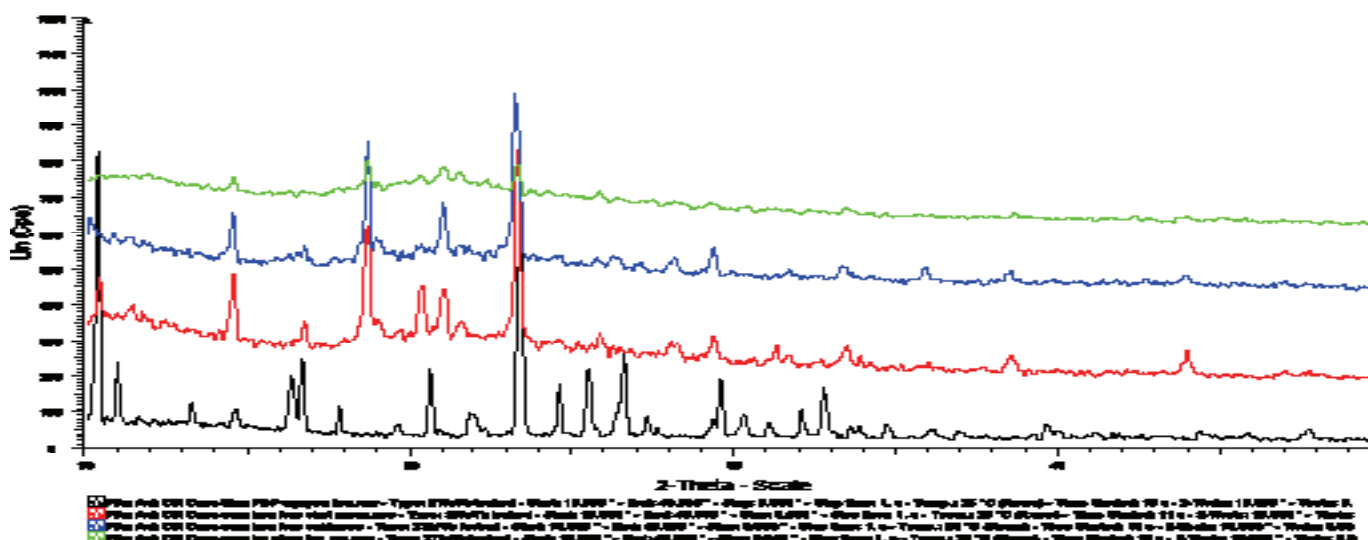
Hình 1: hình ảnh SEM của HPTR



Hình 2: đồ thị phân tích nhiệt vi sai

Phân tích nhiệt vi sai: sự chuyển pha nhiệt trong mẫu nguyên liệu FDP diễn ra rất nhanh cho pic nhọn trong khoảng hẹp, nhiệt độ chuyển pha là khoảng 140°C. Trong mẫu hỗn hợp vật lý cũng có sự chuyển pha nhiệt xảy ra ở khoảng 140°C của dược chất, nhưng pic tù hơn. Trong mẫu HPTR không thấy xuất hiện pic chuyển pha nhiệt.

Phân tích phổ nhiễu xạ tia X: trên phổ FDP nguyên liệu xuất hiện các pic nhọn ở vị trí đặc trưng của CT chứng tỏ FDP nguyên liệu tồn tại ở dạng kết tinh. Cường độ các pic từ mẫu hỗn hợp vật lý giảm so với nguyên liệu và giảm đáng kể ở mẫu HPTR. Điều này chứng minh, FDP trong HPTR đã có sự chuyển dạng từ kết tinh sang vô định hình.

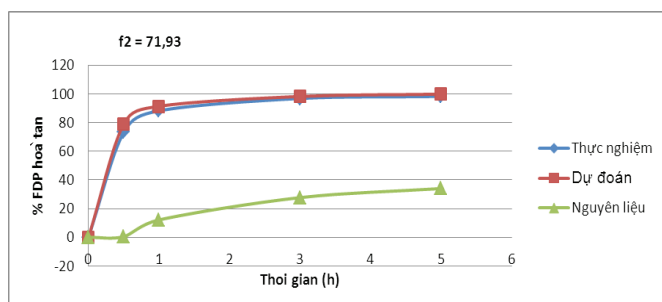


Hình 3: phổ nhiễu xạ tia X

Thử độ hòa tan FDP từ HPTR bào chế theo CT tối ưu trong môi trường đệm phosphate pH 6,5 cho kết quả trình bày trong bảng 6.

Bảng 6: % FDP hòa tan từ HPTR bào chế theo CT tối ưu trong đệm phosphate pH 6,5

Thời gian (giờ)	0,5 h	1 h	3 h	5 h	Độ tan (mcg/ml)
Theo thực nghiệm	73,24	88,24	96,84	98,26	495,8
Theo dự đoán	79,11	91,4	98,26	99,87	508,4
FDP nguyên liệu	0,43	12,16	27,72	34,03	240,5



Hình 4: % FDP giải phóng trong đệm phosphate pH = 6,5

Nhận xét: giá trị f_2 của 2 đồ thị hòa tan = 71,93 có thể kết luận hai đồ thị giải phóng là giống nhau. Như vậy, CT tối ưu có thể làm tăng độ tan được chất lên gấp khoảng 3 lần so với FDP nguyên liệu trong môi trường đệm phosphate pH = 6,5.

Thử độ tan FDP từ HPTR theo CT tối ưu tiến hành trong môi trường Poloxamer 1%, kết quả cho thấy độ tan được cải thiện tăng 2,1 lần so với FDP nguyên liệu.

Kết luận

Đã đánh giá được ảnh hưởng của một số chất mang thân nước PVP K30, HPMC E5LV, Poloxamer khi sử

dụng riêng lẻ và phối hợp đến độ hòa tan của FDP trong HPTR.

Đã xác định được ảnh hưởng của tỷ lệ FDP và Poloxamer trong HPTR tới khả năng giải phóng được chất.

Đã xác định được CT tối ưu bào chế HPTR với tỷ lệ (PVP K30:mannitol:Poloxamer:FDP) = (9:2:0,629:0,9313). Độ hòa tan FDP trong HPTR tối ưu cao hơn so với bột nguyên liệu khoảng 2,1 lần. Tiểu phân HPTR hình cầu và ít bị kết tụ.

Tài liệu tham khảo

- [1] Celik M, Wendel S.C (2005), "Spray-drying and pharmaceutical technology", *Handbook of pharmaceutical granulation technology*, 2, pp.152-160.
- [2] Kumar P.S, et al (2012), "Validaton, quantitative and qualitative analysis of FDP drug using HPLC", *Journal of Pharmacy Research*, 5(4), pp.1838-1840.
- [3] Lee K.R, Kim E.J, Seo S.W, Choi H.K (2008), "Effect of Poloxamer on the Dissolution of FDP and Preparation of Controlled Release Matrix Tablets Containing FDP", *Arch Pharm Res*, 31(8), pp.1023-1028.
- [4] Kim E.J, Chun M.K, Jang J.S, Lee I.H, Lee K.R, Choi H.K (2006), "Preparation of a solid dispersion of FDP using a solvent wetting method", *Eur J Pharm Biopharm*, 64, pp.200-205.
- [5] USP32-NF27 (2009), "FDP", "FDP Extended-release tablets", pp.2346-2350.
- [6] Friesen D.T, et al (2008), "Hydroxypropyl Methylcellulose Acetate Succinate-Based Spray-Dried Dispersions: An verview", *Molecular Pharmaceutics*, 5(6), pp.1003-1019.
- [7] Fars K.A, et al (2007), "Improvement of Albendazole Dissolution by Preparing Microparticles Using Spray-Drying Technique", *Scientia Pharmaceutica*, 75, pp.63-79.
- [8] Nollenberger K, et al (2009), "Using polymers to enhance solubility of poorly soluble drugs", *Pharmaceutical Technology*, <http://www.pharmtech.com/using-polymers-enhance-solubility-poorly-soluble-drugs?id=&pageID=1&sk=&date=>.
- [9] Trademark of The Dow Chemical Company (2000), *Using METHOCEL cellulose ethers for controlled release of drugs in hydrophilic matrix systems*, Dow., pp.1-36.

Nghiên cứu độc tính cấp của viên nang cứng tỏi đen trên động vật thực nghiệm

Vũ Bình Dương*, Hồ Anh Sơn

Học viện Quân y, Bộ Quốc phòng

Ngày nhận bài 21.12.2015, ngày chuyển phản biện 24.12.2015, ngày nhận phản biện 25.1.2016, ngày chấp nhận đăng 29.1.2016

Trong nghiên cứu này, viên nang cứng tỏi đen đã được nghiên cứu và đánh giá độc tính cấp trên động vật thực nghiệm là chuột. Kết quả cho thấy, không phát hiện được độc tính cấp ở liều tối đa 10 g/kg thể trọng sau khi chuột uống liều duy nhất bột viên nang tỏi đen có nguồn gốc từ tỏi Việt Nam. Các kết quả kiểm tra cũng cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể về sự thay đổi tình trạng toàn thân, số lượng tế bào máu, chức năng gan thận của chuột thực nghiệm so với nhóm đối chứng.

Từ khóa: chuột thực nghiệm, độc tính cấp, viên nang cứng tỏi đen.

Chỉ số phân loại 3.4

Study on the acute toxicity of black garlic capsule on experimental mice

Summary

The acute toxicity of black garlic capsule was studied and assessed on mice for this study. The results showed that there was no animal to be died at a dose of 10 g/kg body weight after taking a single dose of black garlic. The exam results also showed no significant difference in blood cell counts, kidney and liver function between the control group and the black garlic treated group.

Keywords: acute toxicity, black garlic capsule, experimental mice.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Tỏi đen là sản phẩm lên men từ tỏi tươi (*Allium sativum* L.) ở nhiệt độ và độ ẩm thích hợp. Sản phẩm thu được có màu đen, vị ngọt, không còn mùi vị hăng cay của tỏi tươi. Các nghiên cứu cho thấy, dịch chiết tỏi đen có một số tác dụng vượt trội so với tỏi tươi như: tác dụng chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch, ức chế tế bào ung thư... [1, 2]. Ở Việt Nam, Học viện Quân y đã nghiên cứu lên men tỏi đen từ tỏi có nguồn gốc Việt Nam và đánh giá một số tác dụng sinh học của dịch chiết tỏi đen thu được [3, 4]. Từ tỏi đen đã nghiên cứu chiết xuất và bào chế cao khô tỏi đen, từ đó bào chế được viên nang cứng tỏi đen [5, 6]. Để có cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về đánh giá tác dụng sinh học của viên nang tỏi đen, tiến tới có thể sử dụng sản phẩm trên người, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá độc tính cấp trên động vật thực nghiệm của viên nang tỏi đen (đây cũng là sản phẩm của đề tài cấp nhà nước mã số KC10.37/11-15).

Thực nghiệm

Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

Viên nang cứng tỏi đen đạt Tiêu chuẩn cơ sở do Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Sản xuất thuốc - Học viện Quân y cung cấp (số lô 010813).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

60 chuột nhắt trắng BALB/c, không phân biệt giống, khỏe mạnh, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, cân nặng $20,0 \pm 2,0$ g. Chuột được nuôi trong điều kiện nhiệt độ $24 \pm 2^\circ\text{C}$, ánh sáng tự nhiên, nước và thức ăn được nấu chín, bảo đảm theo nhu cầu. Quá trình nuôi được bắt đầu trước khi tiến hành thí nghiệm ít nhất 3 ngày. Trước khi cho chuột dùng tỏi đen, chuột bị bỏ đói trong 12 giờ.

*Tác giả liên hệ: Email: vbduong2978@gmail.com

Chuột được chia thành 6 nhóm, mỗi nhóm 10 chuột, được uống bột thuốc trong viên nang tối đen với mức độ giảm dần liều. Liều cao nhất tương ứng với khả năng hòa tan tốt nhất của bột viên nang tối đen vào nước và chuột được uống với liều 0,1 ml/10 g thể trọng chuột. Theo thực nghiệm của chúng tôi, bột viên nang tối đen có thể tan tối đa với nồng độ 100 mg/1 ml nước cất. Chúng tôi cho chuột uống với liều tương ứng 0,1 ml/10 g thể trọng chuột (liều 10 g tối đen/kg cân nặng). Chuột được phân thành 6 nhóm với mức liều giảm dần:

- + Nhóm 1: chuột được uống liều duy nhất 10 g/kg cân nặng.
- + Nhóm 2: chuột được uống liều duy nhất 8 g/kg cân nặng.
- + Nhóm 3: chuột được uống liều duy nhất 6 g/kg cân nặng.
- + Nhóm 4: chuột được uống liều duy nhất 4 g/kg cân nặng.
- + Nhóm 5: chuột được uống liều duy nhất 2 g/kg cân nặng.
- + Nhóm 6: chuột được uống liều duy nhất 1 g/kg cân nặng.

Cách cho uống tối đen: lấy bột thuốc trong nang tối đen, hòa trong nước cất, và cho chuột uống vào các buổi sáng với thể tích thuốc tương ứng 0,1 ml/10 g thể trọng. Chuột được uống dung dịch tối đen bằng cách đưa trực tiếp vào dạ dày chuột qua sonde chuyên dụng.

Các chỉ tiêu quan sát:

- Sau khi chuột được uống thuốc, quan sát tình trạng lông, phân, tiêu thụ thức ăn, cân nặng và số lượng chuột chết (nếu có). Thời gian theo dõi trong vòng 7 ngày. Số chuột chết (nếu có) được tính theo nhóm.

- Chuột bị giết sau 7 ngày bằng kéo giãn đột sống cổ, lấy máu đánh giá chỉ số huyết học, chức năng gan thận, đối với lô dùng liều cao nhất.

+ Đánh giá ảnh hưởng tới chức năng tạo máu: máu chuột được chống đông bằng EDTA, đếm số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, bạch cầu, tiểu cầu.

+ Đánh giá chức năng gan, thận: đánh giá biến đổi về nồng độ SGOT, SGPT, Ure và Creatinin huyết thanh bằng phương pháp quang động học đo hoạt tính enzym.

Kết quả và bàn luận

Tình trạng toàn thân

Sau khi uống liều duy nhất tối đen, nhóm uống liều cao nhất tương ứng với 10 g/kg thể trọng và các nhóm uống với liều thấp hơn, tất cả chuột thí nghiệm ở các lô đều ăn uống bình thường, tình trạng phân, nước tiểu bình thường, quan sát hoạt động của chuột thấy bình thường.

Bảng 1: số lượng chuột sống sau khi uống liều duy nhất tối đen

Nhóm	Liều sử dụng (g/kg /24 h)	n	Số lượng chuột chết (sau 72 h)	Số lượng chuột sống (sau 72 h)
1	10	10	0	10
2	8	10	0	10
3	6	10	0	10
4	4	10	0	10
5	2	10	0	10
6	1	10	0	10

Theo dõi sau 7 ngày, không có chuột thí nghiệm bị chết ở tất cả các nhóm, phẫu tích nội tạng chuột cho thấy hình ảnh các cơ quan bình thường. Tối đen được lên men từ tối Việt Nam, được đánh giá có mùi thơm, ngọt và lành tính. Bản thân tối đã được người dân sử dụng hàng ngày như một loại thực phẩm nên có tính an toàn cao.

Phạm vi nghiên cứu nhằm khẳng định một lần nữa tính an toàn của tối đen có nguồn gốc tối Việt Nam khi được sử dụng với liều rất cao. Chúng tôi không tìm được liều gây chết của tối đen khi đã hòa tan tối đa tối đen vào nước, tới nồng độ 100 mg/ml nước.

Sự biến đổi các chỉ số huyết học

Chuột thuộc nhóm sử dụng tối đen liều cao nhất (10 g/kg) được lấy máu, kiểm tra số lượng tế bào máu để so sánh với nhóm chứng không uống chế phẩm.

Bảng 2: số lượng tế bào máu ngoại vi trong máu chuột

Nhóm	Nhóm chứng (n=10)	Nhóm uống tối đen (n=10)	p
Hồng cầu (T/l)	8,4±1,71	7,9±1,22	p>0,05
Bạch cầu (G/l)	8,8±1,96	9,1±2,04	p>0,05
Tiểu cầu (G/l)	448±160,8	502,3±202,6	p>0,05

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, số lượng tế bào máu ngoại vi của nhóm chuột uống tối đen liều cao 10 g/kg không có sự khác biệt đáng kể với nhóm chứng (p>0,05).

Số lượng hồng cầu dao động quanh khoảng 8 G/l; số lượng bạch cầu dao động quanh 9 G/l và số lượng tiểu cầu khoảng trên 500 G/l.

Theo dõi chức năng gan thận

Bảng 3: nồng độ ure, creatinin, SGOT và SGPT trong máu chuột

Các chỉ số	Nhóm chứng (n=10)	Nhóm uống tỏi đen (n=10)	p
Ure (mmol/l)	22,67±2,11	20,67±2,44	p>0,05
Creatinin (mmol/l)	0,55±0,07	0,65±0,08	p>0,05
SGOT (U/l)	32,5±2,59	31±0,90	p>0,05
SGPT (U/l)	27,6±3,56	35,5±8,92	p>0,05

Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy, nồng độ các chất ure, creatinin trong máu ngoại vi của chuột nhóm chứng không có sự khác biệt đáng kể với nhóm uống tỏi đen liều cao. Điều này cho thấy, chức năng thận ổn định sau khi chuột uống liều duy nhất tỏi đen 10 g/kg. Tương tự, nồng độ hai enzym là SGOT và SGPT của gan không có sự khác biệt giữa nhóm sử dụng tỏi đen và nhóm chứng.

Nhiều nghiên cứu cho thấy, tỏi đen không những an toàn trong quá trình sử dụng vì giảm được độ cay, nó còn kích thích hệ miễn dịch của cơ thể. Tỏi đen được tạo ra từ tỏi tươi (*Allium sativum* L.) bình thường bằng cách lên men ở nhiệt độ 65-80°C và độ ẩm 70-80% được kiểm soát trong khoảng một tháng. Chất chiết xuất từ tỏi đen giàu S-allyl-L-cystein (SAC) và hoạt tính chống khối u với tỷ lệ chữa khỏi 50% chuột nhắt BALB/c bị sarcoma, tuy nhiên, cơ chế của tỏi đen vẫn còn chưa được làm rõ. Wang (2010) [1] đã tiến hành làm rõ cơ chế chống khối u khi sử dụng dịch chiết tỏi đen để điều trị chuột. Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch chiết tỏi đen có tác dụng tăng cường miễn dịch tế bào bằng cách tăng hoạt động của các tế bào NK (tế bào giết tự nhiên), loại tế bào được cho là đóng vai trò quan trọng trong việc tiêu diệt các tế bào u trong

cơ thể. Cytokin, đặc biệt là NO (nitric oxid), IFN- (interferon-J), IL-2 (interleukin-2) và TNF (yếu tố hoại tử khối u) được tế bào lách chuột sản xuất nhiều, tuy nhiên, số lượng IL-4 (Interleukin-4), được xem là có liên quan đến khả năng miễn dịch dịch thể (sản xuất kháng thể như kháng thể IgG và IgE), giảm trong các môi trường nuôi cấy tế bào lách chuột.

Kết luận

Không phát hiện được độc tính cấp ở liều tối đa 10 g/kg thể trọng sau khi chuột uống liều duy nhất bột viên nang tỏi đen có nguồn gốc từ tỏi Việt Nam.

Chuột uống tỏi đen với liều duy nhất không làm thay đổi tình trạng toàn thân, số lượng tế bào máu, chức năng gan, thận.

Tài liệu tham khảo

- [1] Danan Wang, Yonghui Feng, Jun Liu, Jianzhong Yan, Meiru Wang, Jin-ichi Sasaki, Changlong Lu (2010), "Black Garlic (*Allium sativum*) Extracts Enhance the Immune System", *Med. Aro. Plant. Sci Bio.*, Vol.4, pp.37-40.
- [2] Shin J.H, Choi D.J, Lee S.J, Cha J.Y, Kim J.G, Sung N.J (2008), "Changes of physicochemical components and antioxidant activity of garlic during its processing", *Journal of Life Science*, 18, pp.1123-1131.
- [3] Vũ Bình Dương, Trịnh Nam Trung (2014), "Phân lập S-Allyl-L-Cystein từ tỏi đen Việt Nam", *Tạp chí Dược học*, số 455, tr.28-30.
- [4] Vũ Bình Dương, Hồ Anh Sơn, Vũ Xuân Nghĩa, Trịnh Nam Trung (2013), "Đánh giá tác dụng bảo vệ cơ quan miễn dịch của dịch chiết tỏi đen Lý Sơn trên chuột bị chiếu xạ", *Tạp chí Dược học*, số 411, tr.51-56.
- [5] Vũ Đình Tiến, Vũ Bình Dương, Nguyễn Trọng Điệp, Phan Đình Châu, Nguyễn Văn Bạch (2014), "Xây dựng quy trình chiết xuất SAC từ tỏi đen", *Tạp chí Y dược học quân sự*, 39(1), tr.58-62.
- [6] Vũ Bình Dương, Nguyễn Trọng Điệp (2014), "Nghiên cứu điều chế bột cao khô tỏi đen bằng phương pháp phun sấy", *Tạp chí Y dược học quân sự*, 39(5), tr.13-18.

Đánh giá hiệu quả điều trị xơ gan của việc ghép tế bào gốc trung mô tủy xương trên mô hình chuột

Trương Hải Nhung^{1,2*}, Lê Văn Trình¹, Nguyễn Hải Nam¹, Ngô Quốc Đạt³, Lê Minh Huy³
Huỳnh Nghĩa³, Nguyễn Văn Thanh⁴, Phạm Văn Phúc^{1,2}, Phan Kim Ngọc^{1,2}

¹Phòng thí nghiệm Nghiên cứu và ứng dụng tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

⁴Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 3.11.2015, ngày chuyển phản biện 10.11.2015, ngày nhận phản biện 11.12.2015, ngày chấp nhận đăng 21.12.2015

Trên thế giới, liệu pháp tế bào gốc cho thấy tiềm năng lớn trong các nghiên cứu điều trị bệnh xơ gan. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa thống nhất phác đồ điều trị về nguồn tế bào, phương pháp tiêm, đồng thời ở nước ta chưa có các công bố về lĩnh vực này. Nhằm mục đích nghiên cứu phát triển liệu pháp mới trong điều trị xơ gan ở nước ta, các tác giả tiến hành gây tạo mô hình chuột xơ gan bằng CCl_4 và thử nghiệm tiêm 10^6 tế bào gốc trung mô tủy xương để điều trị. Kết quả cho thấy, sau 21 ngày tiêm 10^6 tế bào vào tĩnh mạch đuôi của chuột bị bệnh xơ gan, nhóm chuột điều trị phục hồi chỉ số Albumin từ $1,753 \pm 0,042$ lên $2,116 \pm 0,120$, giảm 9 lần biểu hiện các gen xơ hóa như *TGF*, giảm 13 lần *Procollagen*, giảm 3000 lần *Integrin*, giảm sự biểu hiện của collagen-1, SMA α và giảm diện tích các dải xơ trên hình thái mô học so với nhóm đối chứng.

Từ khóa: bệnh xơ gan, liệu pháp tế bào gốc, mô hình chuột xơ gan, tế bào gốc trung mô, tế bào gốc tủy xương.

Chỉ số phân loại 3.5

Giới thiệu

Xơ gan là tình trạng tổn thương gan mạn tính, dẫn tới hình thành những mô xơ xâm chiếm không gian của tế bào gan. Theo số liệu thống kê của Mokdad và cộng sự [1], chỉ trong năm 2010, xơ gan là nguyên nhân gây tử vong cho hơn một triệu người. Đồng thời, xơ gan còn là yếu tố nguy cơ cao của ung thư gan [2]. Hiện nay, y học vẫn chưa có liệu pháp điều trị khỏi bệnh xơ gan vì: (1) xơ hóa gan là quá trình kéo dài và rất khó phục hồi khi mô gan xuất hiện dải xơ [3]; (2) liệu pháp hóa trị phải duy trì sử dụng lâu dài và không mang lại hiệu quả cao do dùng thuốc giúp ức chế quá trình xơ hóa (anti-TGF, anti-PDGF) thì hoạt động chức năng gan khó hồi phục, dùng thuốc có tác dụng ức chế miễn dịch bảo vệ gan thì khó ngăn chặn sự tiến triển của xơ hóa [4], và dùng cả hai loại thuốc trên vẫn chưa cho thấy hiệu quả [5]; (3) ghép gan vẫn chưa giải quyết được do tình trạng thiếu hụt nguồn mô, nguy cơ thải loại sau ghép cao, chi phí điều trị cao và gây xâm lấn [6].

Ghép tế bào gốc là liệu pháp mới đang được nghiên cứu trong điều trị bệnh xơ gan. Liệu pháp tế bào gốc

có thể thay thế các phương pháp điều trị xơ gan truyền thống như trên vì: (1) tế bào gốc có thể thu nhận từ nhiều nguồn như mô mỡ, tủy xương, máu dây rốn [7]; (2) ghép tế bào gốc tự thân giảm nguy cơ thải loại miễn dịch; (3) tế bào gốc khi ghép giúp ức chế quá trình xơ hóa nhờ tiết các cytokine, cải thiện hoạt động chức năng gan vì tế bào gốc đã được chứng minh khả năng biệt hóa thành tế bào chức năng giống tế bào gan, kích thích sự phân chia của tế bào gan trưởng thành [8-12]. Do đó, tế bào gốc đang được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu lâm sàng điều trị bệnh xơ gan và mang lại hiệu quả tích cực [4, 13]. Tế bào gốc trung mô từ tủy xương (BM-MSC) đang được sử dụng nhiều trên lâm sàng (26/31 nghiên cứu sử dụng tế bào gốc) để điều trị xơ gan [14]. Kết quả ghi nhận, ghép BM-MSC giúp bệnh nhân cải thiện chức năng gan và chỉ số MELD [14, 15]. Đồng thời, BM-MSC dễ thu nhận và có thể cấy ghép tự thân. Do đó, BM-MSC là một nguồn tế bào tiềm năng lớn trong điều trị bệnh xơ gan.

Việt Nam là vùng có tỷ lệ bệnh gan rất cao [16]. Nhằm góp phần nghiên cứu tìm ra liệu pháp hiệu quả cho điều trị bệnh xơ gan, cung cấp cơ sở cận lâm sàng cho các nghiên cứu xa hơn trên lâm sàng, chúng tôi

*Tác giả liên hệ: Email: thnhung@hcmus.edu.vn

Effectiveness of the treatment of liver cirrhosis by using bone marrow mesenchymal stem cell in a mouse model

Summary

In the world, stem cell therapy has shown a potential in liver cirrhosis treatment. Up to now, we have not found out the best regimen of cell types, injection methods, while Vietnam has not yet published any result in this field. For that reason, this research aims to developing a new therapy for liver cirrhosis treatment in Vietnam. The authors conducted experiments using bone marrow mesenchymal stem cell for treatment in the mouse model with liver cirrhosis by CCl_4 . The result showed that 21 days after injected 10^6 stem cells into tail vein, the treatment group was improved with the Albumin index from 1.753 ± 0.042 to 2.116 ± 0.120 ; the expression of genes related to fibrosis was decreased such as *TGF* (by 9 times), *Procollagen* (by 13 times), *Integrin* (by 3000 times); and the result also showed the reduction in the presence of collagen-1, SMA- α and the smaller fibrotic areas in histology compared with the control group.

Keywords: bone marrow derived stem cells, liver cirrhosis, mouse model of liver cirrhosis, mesenchymal stem cells, stem cell therapy.

Classification numbers 3.5

tiến hành thử nghiệm điều trị bệnh xơ gan bằng BM- MSC trên mô hình chuột bị xơ gan bởi CCl_4 .

Vật liệu và phương pháp

Mô hình chuột xơ gan: thực hiện theo quy trình của Trương Hải Nhung và cộng sự [17], chuột được uống CCl_4 bằng cách pha với dầu olive (3:7 v/v), thông qua đường thực quản, liều lượng 1 ml CCl_4/kg , 3 lần/tuần trong 11 tuần. Đánh giá các chỉ tiêu thực hiện mô hình gồm men (AST, ALT, Albumin, Bilirubin), biểu hiện gen (*Fibronectin*, *Integrin*, *TGF*, *Procollagen*, *Nt5e*), mô học nhuộm H&E và Trichrome, biểu hiện collagen-1 và SMA- α .

Chuẩn bị BM-MSC: chuột nhất trắng (*Mus*

musculus var. albino) đực, 4 tuần tuổi, cân nặng khoảng 5 g, khỏe mạnh được mua từ Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh. Tiến hành thu đuôi chuột, loại bỏ phần cơ đuôi, thu tủy từ xương đuôi và xương cẳng chân chuột, nuôi cấy tăng sinh và chọn lọc BM-MSC trong môi trường DMEM/F12 (Gibco) bổ sung 10% FBS (Sigma) và 1% Antibiotic (Gibco), trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 .

Ghép tế bào: chuột mô hình bệnh xơ gan được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: nhóm đối chứng ($n=5$) tiêm 0,15 ml PBS, nhóm thí nghiệm ($n=5$) tiêm 10^6 huyền phù tế bào đơn trong 0,15 ml PBS/con qua tĩnh mạch đuôi, chuột bình thường được sử dụng làm đối chứng dương. Sau 21 ngày ghép, hiệu quả điều trị bệnh sẽ được đánh giá dựa trên các chỉ tiêu:

Men gan: thu 0,2 ml huyết tương, đo các chỉ tiêu như AST/ALT bằng KIT GOT(ASAT)/GPT(ALT) IFCC Mod.liquiUV test (GERMANY), Albumin và Billirubin bằng Kit QuantiChrom BCG Albumin/Bilirubin Assay (Bioassay Systems, CA, USA) theo quy trình của nhà sản xuất.

Đánh giá mức độ biểu hiện các gen xơ hóa bằng qRT-PCR: sinh thiết mô gan chuột, tách mRNA tổng từ mô gan bằng bộ Kit Easy-BLUE Total RNA Extraction (iNtON Biotechnology, Korea). Đánh giá mức độ biểu hiện gen bằng qRT-PCR (qRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step Agilent, CA, USA), gồm các gen:

Bảng trình tự các mồi sử dụng trong phản ứng qRT-PCR của nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự
<i>Fibronectin</i>	3'-TGAAGAGGGGCACATGCTGA-5' 5'-GTGGGAGTTGGGCTGACTCG-3'
<i>Procollagen</i>	3'-CCTGGACGCCATCAAGGTCTAC-5' 5'-CAAGTTCGGGTGTGACTCG-3'
<i>Integrin</i>	3'-GCCAGGGCTGGTTATACAGA-5' 5'-TCACAATGGCACACAGGTTT-3'
<i>Nt5e</i>	3'-TTTGAAGGTGGATTTCCTG-5' 5'-CCTCTCAAATCCAGGGACAA3-'
TGF- β	3'-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC-5' 5'-CACAATCATGTTGGACAAGCTGCC-3'
<i>GAPDH</i> (chứng nội)	3'-AAGTTGTCATGGATGACC-5' 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGC-3'

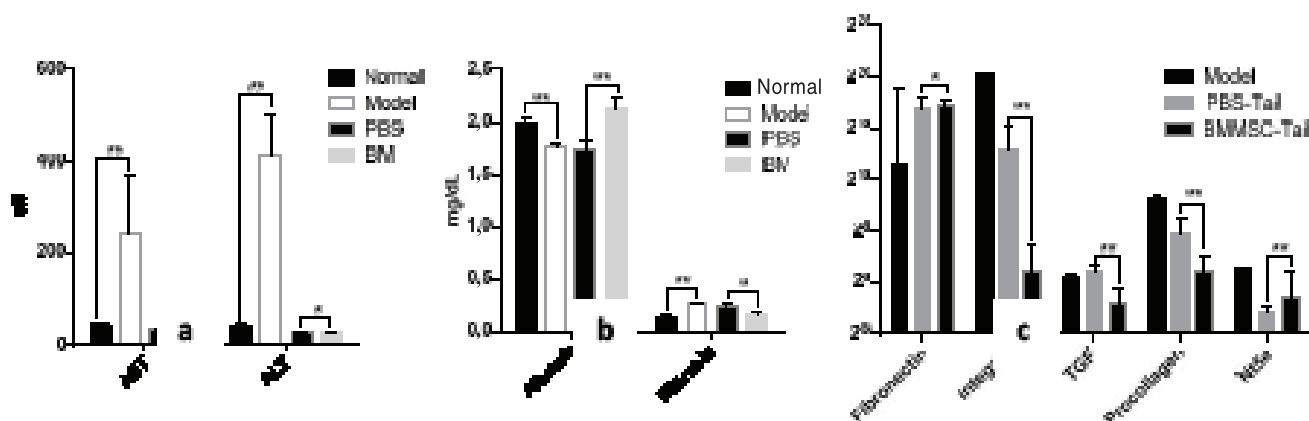
Đánh giá mô học: cố định mô gan trong Paraformaldehyde 4% (Merck Millipore, Germany), nhuộm H&E và Trichrome theo quy trình của Bệnh viện Chợ Rẫy (TP Hồ Chí Minh).

Đánh giá biểu hiện collagen-1 và SMA- α bằng nhuộm hóa mô miễn dịch: mô gan được cố định trong

4% paraformaldehyde (Merck Millipore, Đức). Lát cắt (slide) paraffin được khử paraffin và tái hydrate hóa bằng sodium citrate (10mM, pH 6) ở 95-100°C trong 20 phút. Các slide được làm lạnh xuống khoảng 20-30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các slide được block trong 30 phút ở nhiệt độ phòng với blocking buffer (2% huyết thanh dê, 1% BSA, 0,1% Triton X100, 0,05% Tween 20, 0,01M PBS pH 7,2-7,4, 0,05% sodium azide). Slides được nhuộm kháng thể kháng collagen I (Santa Cruz Biotechnology, Inc) hoặc anti-sma-Anfa (Santa Cruz Biotechnology, Inc) với nồng độ pha loãng 1:100 trong TBS 1% BSA qua đêm ở 4°C. Peroxidase nội sinh được block bằng peroxidase blocking buffer (3% H₂O₂ trong PBS) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Horseradish peroxidase-conjugated secondary goat-anti-rabbit antibody trong TBS 1% BSA được nhuộm trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết quả nhuộm kháng thể được kiểm tra bằng cách sử dụng ACE kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) theo hướng dẫn. Nhân tế bào được nhuộm bằng hematoxylin-Gill

sự giảm nồng độ Albumin huyết tương so với chuột thường ($p<0,05$). So sánh các chỉ tiêu sinh hóa nhóm chuột xơ gan được điều trị bằng tế bào và nhóm đối chứng (tiêm PBS): chuột xơ gan giảm tình trạng tổn thương gan thông qua các chỉ số AST, ALT, Bilirubin giảm về mức bình thường. Tuy nhiên, chức năng sản xuất Albumin trên nhóm được điều trị bằng BM-MSC được phục hồi về mức bình thường và cao hơn nhóm đối chứng ($p<0,05$).

Kết quả chỉ tiêu mức độ biểu hiện gen gây xơ hóa (hình 1c): chuột mô hình tăng biểu hiện mạnh các gen xơ hóa (mức độ biểu hiện các gen của chuột thường là 2⁰), dẫn tới hình thành mô xơ ở chuột mô hình. Sau khi được thử nghiệm điều trị bằng BM-MSC chuột tăng biểu hiện *Fibronectin* (kết quả tương tự ở nhóm đối chứng), giảm biểu hiện mạnh các gen *Integrin*, *TFG*, *Procollagen* và *Nt5e* khi so với chuột mô hình và chuột đối chứng ($p<0,05$). Do đó, ghép tế bào làm giảm sự sản xuất mô xơ ở chuột xơ gan.



Hình 1: biểu đồ so sánh chỉ tiêu sinh hóa và biểu hiện gen trên các nhóm chuột
 (a) Biểu đồ so sánh giá trị AST và ALT; (b) Biểu đồ so sánh giá trị Albumin và Bilirubin; (c) Biểu đồ so sánh mức biểu hiện gen
 model: nhóm mô hình xơ gan, PBS-tail: nhóm tiêm giả được PBS, BM-MSC tail: nhóm ghép tế bào

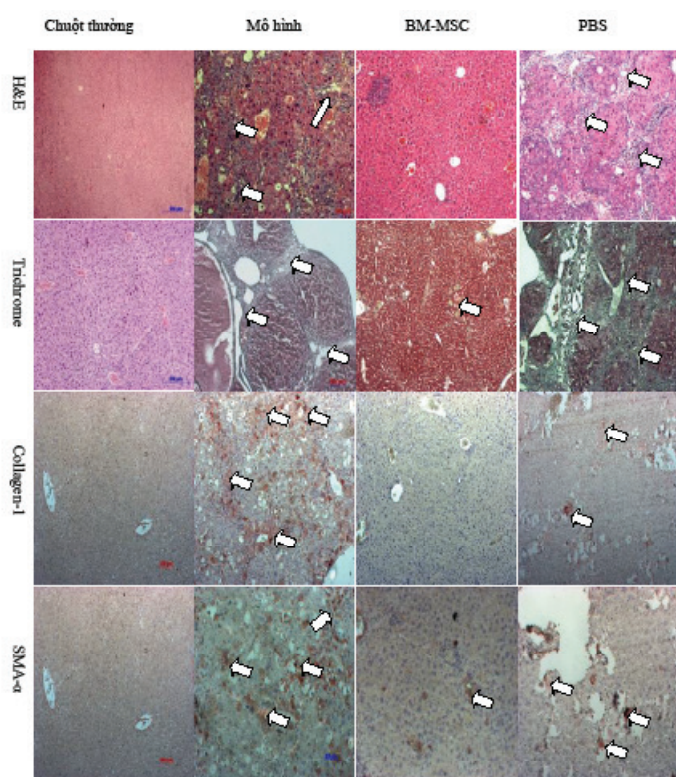
III (Merck Millipore, Đức). Slides được rửa sạch bằng Tween 20 TBS (2-3 lần) giữa mỗi bước.

Phương pháp xử lý thống kê: kiểm định thống kê student t-test, phân tích kết quả bằng Microsoft Excel 2010 và Prism 6.

Kết quả

Kết quả chỉ tiêu sinh hóa (hình 1a, 1b) của các nhóm chuột sau thời gian gây mô hình thể hiện tình trạng gan bị tổn thương nặng bởi sự gia tăng mạnh các chỉ số như AST (tăng 5 lần), ALT (tăng 10 lần) và Bilirubin (2 lần) trong huyết tương so với chuột thường. Đồng thời, hoạt động chức năng gan suy giảm thể hiện qua

Kết quả chỉ tiêu hình thái mô học: đánh giá sự khác biệt về tình trạng bệnh giữa các nhóm chuột ở cấp độ mô học (hình 2): chuột mô hình dưới tác động của CCl₄, mô gan biểu hiện tình trạng tổn thương mạnh như viêm, cấu trúc mô thay đổi, nhiều tế bào gan chết hoặc nhiễm mỡ (nhuộm H&E) so với nhóm đối chứng. Xuất hiện các dải xơ, thành phần chính là collagen bao quanh mạch, khu vực cửa và xơ bắc cầu (nối liền hai khu vực cửa) khi nhuộm Trichrome. Trong cấu trúc mô xơ collagen type-1 chiếm một lượng lớn [18], thể hiện trên hình thái mô học khi nhuộm với kháng thể kháng collagen type-1. Ngoài ra, chuột mô hình còn cho thấy



Hình 2: kết quả nhuộm mô gan với H&E, Trichrome, collagen-1, SMA- α (X100)
Mũi tên chỉ các vị trí viêm, xơ và dương tính kháng thể

số lượng lớn SMA- α là dấu hiệu trên bề mặt tế bào nguyên bào sợi cơ [19].

Sau thời gian được điều trị với BM-MSc, cấu trúc mô gan chuột mô hình được hồi phục nhanh hơn nhóm đối chứng thể hiện qua các đặc điểm: cấu trúc mô học ổn định (nhuộm H&E, Trichrome), giảm tế bào chết và nhiễm mỡ, giảm sự bắt màu với thuốc nhuộm Trichrome, đồng nghĩa với việc các dải xơ trên mô học đã tiêu biến dần, tương đồng với hình ảnh nhuộm hóa mô miễn dịch collagen type 1 và SMA- α .

Thảo luận

Chuột được gây mô hình bệnh xơ gan bằng CCl_4 biểu hiện tình trạng tổn thương gan cấp tính thể hiện qua các chỉ số sinh hóa, tăng biểu hiện mạnh các gen gây xơ hóa, xuất hiện các dải xơ trên cấu trúc mô. Trong thời gian điều trị bằng cấy ghép tế bào, chuột không bị gây độc bởi CCl_4 , nên chuột có thể tự cải thiện tình trạng bệnh như: phục hồi chỉ số AST, ALT, Bilirubin, giảm biểu hiện các gen xơ hóa *Integrin*, *TGF*, *Procollagen* và *Nt5e*. Kết quả này ghi nhận tương đồng với Kuo và cộng sự, Carvalho và cộng sự [8, 20]. Tuy nhiên, mức độ phục hồi là khác biệt giữa hai nhóm được điều trị tế bào và nhóm chứng.

Mức độ phục hồi ở lô chuột được điều trị bằng BM-MSc là tốt hơn so với nhóm đối chứng vì: khác biệt về chỉ số Albumin nhóm điều trị cao hơn so với nhóm đối chứng cho thấy hoạt động chức năng gan ở lô đối chứng vẫn chưa hồi phục, ghi nhận tương đồng về cải thiện chỉ số Albumin ở bệnh nhân sau ghép BM-MSc trong báo cáo của Terao và cộng sự [21]. Các gen xơ hóa như *TGF*, *Procollagen*, *Integrin* giảm mạnh ở nhóm điều trị so với đối chứng, dẫn tới kết quả giảm mạnh biểu hiện mô xơ trên cấu trúc mô học nhuộm Trichrome, collagen type 1 ở nhóm điều trị so với nhóm đối chứng. Kết quả nhuộm SMA- α cho thấy nhóm điều trị giảm mạnh chỉ số này. SMA- α biểu hiện đặc trưng trên nguyên bào sợi cơ. Trong xơ gan, nguyên bào sợi cơ đóng vai trò chính trong việc sản xuất mô xơ [18, 22]. Do đó, nhóm chuột được điều trị bằng BM-MSc không còn biểu hiện nguyên bào sợi cơ, dẫn tới giảm biểu hiện các gen xơ hóa và giảm hình thành mô xơ trên hình thái mô học. Ngoài ra, các nghiên cứu khác như Jang và cộng sự [23] tiến hành ghép BM-MSc trên mô hình chuột Rat xơ gan cũng ghi nhận nhóm điều trị giảm biểu hiện *TGF*, collagen-1 và SMA α so với đối chứng.

So sánh với các cơ chế đã được chứng minh về hiệu quả của BM-MSc trong việc điều trị bệnh xơ gan như: tế bào gốc góp phần ức chế sự phát triển của tế bào hình sao, là nguồn tế bào chính chuyển dạng thành nguyên bào sợi cơ [24], làm giảm sản xuất yếu tố gây xơ của Krizhanovsky và cộng sự [25], cải thiện chức năng gan và giảm xơ thông qua sự tăng hoạt động của enzyme phân giải chất nền ngoại bào hóa [26, 27], dung hợp với tế bào gan trưởng thành giúp tế bào gan phân chia trong báo cáo của Wang và cộng sự [28], ức chế phosphoryl hóa Smad2/3, giảm sản xuất yếu tố xơ hóa ở nguyên bào sợi cơ của Jang và cộng sự [23]. Kết quả của nghiên cứu này ủng hộ giả thiết BM-MSc góp phần ức chế tế bào hình sao và ức chế quá trình sinh xơ bởi vì các kết quả ghi nhận tương đồng với các nghiên cứu khác về sự giảm số lượng HSC trong gan, giảm biểu hiện các gen gây xơ hóa và dải xơ trên hình thái mô học.

Kết luận

Tiêm 10^6 tế bào BM-MSc thông qua tĩnh mạch đuôi lên mô hình chuột bị xơ gan do CCl_4 cho thấy: BM-MSc góp phần phục hồi chức năng gan thể hiện ở chỉ số Albumin, tăng cường quá trình phục hồi mô gan tổn thương thông qua sự giảm biểu hiện nguyên bào

sợi cơ, giảm quá trình xơ hóa gan.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí từ Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, trong khuôn khổ đề tài mã số B2012-18-07/TĐ/08.

Tài liệu tham khảo

- [1] Mokdad A, et al (2014), “Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis”, *BMC Medicine*, **12**(1), pp.1-24.
- [2] Schuppan D, Afdhal N.H (2008), “Liver cirrhosis”, *The Lancet*, **371**(9615), pp.838-851.
- [3] Ellis E.L, Mann D.A (2012), “Clinical evidence for the regression of liver fibrosis”, *J Hepatol*, **56**(5), pp.1171-1180.
- [4] Schuppan D, Kim Y.O (2013), “Evolving therapies for liver fibrosis”, *J Clin Invest*, **123**(5), pp.1887-1901.
- [5] Wu J, Zern M.A (2000), “Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis”, *J Gastroenterol*, **35**(9), pp.665-672.
- [6] Saidi R.F, et al (2015), “Competition in liver transplantation: Helpful or harmful?”, *Liver Transplantation*, **21**(2), pp.145-150.
- [7] Da Silva Meirelles L, Caplan A.I, Nardi N.B (2008), “In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells”, *Stem Cells*, **26**(9), pp.2287-2299.
- [8] Kuo T.K, et al (2008), “Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells”, *Gastroenterology*, **134**(7), pp.21-2111, p.2121.
- [9] Vassilopoulos G, Wang P.R, Russell D.W (2003), “Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion”, *Nature*, **422**(6934), pp.901-904.
- [10] Dan Y (2012), “Clinical Uses of Liver Stem Cells”, *Liver Stem Cells*, T Ochiya Editor, Springer New York, pp.11-23.
- [11] Ong S.Y, Dai H, Leong K.W (2006), “Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells”, *Tissue Eng*, **12**(12), pp.85-3477.
- [12] Zhang Z, et al (2013), “Generation, characterization and potential therapeutic applications of mature and functional hepatocytes from stem cells”, *J Cell Physiol*, **228**(2), pp.298-305.
- [13] Qi X, Guo X, Su C (2015), “Clinical Outcomes of the Transplantation of Stem Cells from Various Human Tissue Sources in the Management of Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *Current Stem Cell Research & Therapy*, **10**(2), pp.166-180.
- [14] Chen G, et al (2015), “Adipose derived stem cell-based treatment for acute liver failure”, *Stem Cell Research & Therapy*, **6**(1), p.40.
- [15] Terai S, et al (2014), “Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells”, *Tissue Eng Part B Rev*, **20**(3), pp.206-210.
- [16] Toan N.L, et al (2006), “Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam”, *Hepatology*, **43**(6), pp.1375-1384.
- [17] Truong H.N, et al (2014), “Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research”, *Biomedical Research and Therapy*, **1**(2), pp.1-7.
- [18] Friedman S (2000), “Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury”, *J Biol Chem*, **275**, pp.2247-2250.
- [19] Hinz B (2007), “Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair”, *J Invest Dermatol*, **127**(3), pp.526-537.
- [20] Carvalho A.B, et al (2008), “Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury”, *Stem Cells*, **26**(5), pp.1307-1314.
- [21] Terai S, et al (2006), “Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy”, *Stem Cells*, **24**(10), pp.8-2292.
- [22] Aziz-Seible R.S, Casey C.A (2011), “Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease”, *World J Gastroenterol*, **17**(20), pp.2482-2499.
- [23] Jang Y, et al (2014), “Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model”, *BMC Gastroenterol*, **14**(1), p.198.
- [24] Mederacke I, et al (2013), “Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology”, *Nat Commun*, **4**, p.2823.
- [25] Krizhanovsky V, et al (2008), “Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis”, *Cell*, **134**(4), pp.657-667.
- [26] Iwamoto T, et al (2013), “Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice”, *Cell Tissue Res*, **351**(3), pp.95-487.
- [27] Sakaida I, et al (2004), “Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice”, *Hepatology*, **40**(6), pp.1304-1311.
- [28] Wang X, et al (2003), “Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes”, *Nature*, **422**(6934), pp.897-901.

Nghiên cứu ứng dụng axit poly gamma glutamic trong cải thiện chất lượng giò lụa

Nguyễn Chí Dũng^{1*}, Đặng Thị Thu², Nguyễn Văn Cách¹, Trần Liên Hà¹

¹Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

²Hội Hóa sinh Việt Nam

Ngày nhận bài 30.7.2015, ngày chuyển phản biện 3.8.2015, ngày nhận phản biện 29.8.2015, ngày chấp nhận đăng 8.9.2015

Giò lụa là một sản phẩm truyền thống của người Việt Nam. Sự phát triển theo xu hướng công nghiệp hóa, hiện đại hóa dẫn đến sự thay đổi trong phương thức sản xuất giò lụa, trong đó có việc bổ sung một số phụ gia độc hại vào giò lụa với mục đích tạo cấu trúc sản phẩm, tăng thời hạn bảo quản... Do vậy, đã có nhiều nghiên cứu về các sản phẩm phụ gia thực phẩm thay thế các hóa chất độc hại, trong đó, poly gamma glutamic (γ -PGA) được biết đến như một polyme sinh học sản xuất từ quá trình lên men của vi khuẩn *Bacillus subtilis*, được sử dụng làm phụ gia trong chế biến thực phẩm và một số lĩnh vực khác. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu cho thấy, khi sử dụng γ -PGA với nồng độ 0,10-0,20% trong sản phẩm giò lụa, chất lượng sản phẩm tăng rõ rệt so với sử dụng các loại phụ gia khác, cụ thể: lực cắt (2294,6 g) và lực nén (902,05 g), cường lực gel (8802,5 g.mm), giá trị cảm quan màu sắc và mùi vị đều tốt. Nồng độ γ -PGA tốt nhất sử dụng trong sản xuất giò là 0,20%.

Từ khóa: an toàn thực phẩm, axit poly gamma glutamic (γ -PGA), giò lụa, phụ gia thực phẩm.

Chỉ số phân loại 3.5

Applying poly gamma glutamic acid for better “Giò lụa” production quality

Summary

This paper presents the results of applying poly gamma glutamic (γ -PGA) to replace dangerous chemical additives in “Giò lụa” production method. γ -PGA is known as a biopolymer produced from the fermentation of bacteria *Bacillus subtilis*, which is used as an food additive in food processing sector and some other fields. The development under the industrialisation and modernisation tendency leads to changes in production methods of “Giò lụa”, including some toxic food additives which are added to modify structure, increase the preservation period... Therefore, it is necessary to study on healthy food additives for replacing toxic ones. This study’s results showed that, when using γ -PGA with 0.1% concentration in Gio lua, the product quality is better in comparison with using other additives, cutting force (2294.6 g) and compress force (902.05 g), gel strength (8802.5 g.mm), and good organoleptic value of color and taste. The best γ -PGA concentration for “Giò lụa” production is 0.2%.

Keywords: food additive, “Giò lụa”, poly gamma glutamic acid (γ -PGA), safe food.

Classification number 3.5

Đặt vấn đề

Giò lụa là một sản phẩm truyền thống được sử dụng nhiều trong bữa ăn của người Việt Nam. Nguyên liệu chính của giò lụa được làm từ thịt nạc thăn còn tươi của lợn (heo) được giã nhuyễn với nước mắm và một số gia vị khác. Chất lượng của giò lụa giòn và dẻo hay không đều phụ thuộc vào chất lượng của thịt lợn nguyên liệu, thịt càng tươi, chất lượng giò càng ngon. Theo một số kinh nghiệm truyền thống của người Việt Nam, để có sản phẩm giò ngon mà thịt nguyên liệu không cần tươi, giò có thời gian bảo quản dài, người sản xuất thường thêm vào giò một chút hàn the (borac), một chất độc có ảnh hưởng đến sức khỏe nay đã bị cấm sử dụng. Tuy nhiên, do thói quen sử dụng và ý thức của người sản xuất chưa nhận thức hết tính chất nguy hiểm của borac đến sức khỏe của người tiêu dùng nên hàn the vẫn

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

được sử dụng lên lút trong chế biến thực phẩm như một bí quyết gia truyền của người sản xuất. Để giảm bớt, tiến tới loại bỏ việc sử dụng hàn the trong chế biến thực phẩm nói chung và sản phẩm giò lụa nói riêng, cần có những nghiên cứu tạo ra những chất thay thế hàn the. Nghiên cứu trong lĩnh vực công nghệ sinh học và thực phẩm đã tạo ra nhiều chất mới có thể thay thế hàn the trong chế biến sản phẩm thịt như tinh bột biến tính (TBBT), các hợp chất phát phat, các hợp chất polyme sinh học chiết xuất từ vỏ tôm - chitosan... Gần đây nhất là những nghiên cứu về hợp chất polyme sinh học: axit poly gamma glutamic (γ -PGA) thu được từ quá trình lên men bởi chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập trong các sản phẩm thực phẩm như tương Bần, Chao, Natto, ThuaNao [1-5]. Do bản chất là một sản phẩm được tạo thành từ quá trình lên men nhờ chủng vi khuẩn phân lập từ thực phẩm nên γ -PGA rất an toàn [6, 7]. Vì vậy, γ -PGA không chỉ được ứng dụng trong lĩnh vực chế biến thực phẩm mà còn được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác như y tế, dược phẩm, mỹ phẩm, môi trường bởi tính chất không độc hại và có khả năng phân hủy trong môi trường [8-10]. Hiện nay, γ -PGA đã được ứng dụng trong sản xuất bánh mỳ để cải thiện độ xốp, giảm mức độ hư hỏng của bánh, giữ ẩm cho bánh, tăng thời gian bảo quản. Từ những nghiên cứu về cải thiện chất lượng bánh mỳ, sản phẩm có hàm lượng protein thực vật cao, nhóm nghiên cứu tiến hành thử nghiệm ổn định chất lượng giò lụa - một sản phẩm có hàm lượng protein động vật cao. Khi chứng minh được γ -PGA có khả năng cải thiện chất lượng sản phẩm giò lụa, sẽ khuyến khích người sản xuất sử dụng γ -PGA, thay thế dần các phụ gia độc hại, đem lại lợi ích cho người tiêu dùng.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Thịt nạc thăn của lợn (yêu cầu kỹ thuật sạch, tỷ lệ nạc/mỡ = 80/20), các gia vị khác gồm nước mắm cao đậm, muối, hạt tiêu, bột ngọt, γ -PGA thành phẩm.

Phụ gia thực phẩm: hàn the, sodium triphosphat (stpp) - Prayphos (Bi), TBBT - Vedan.

Thiết bị: thiết bị xay giò, đùn ép định hình (Việt Nam), thiết bị đo cấu trúc Texture Analyser TA.XT Plus (Anh).

Quy trình chế biến

Thịt lợn $\rightarrow$ Sơ chế $\rightarrow$ Xay thô $\rightarrow$ Xay nhuyễn $\rightarrow$ Bao gói $\rightarrow$ Luộc $\rightarrow$ Sản phẩm. Gia vị, nguyên liệu phụ và các chất nghiên cứu được bổ sung trong công đoạn xay thô. Các chất nghiên cứu γ -PGA nồng độ 0,1%, hàn the nồng độ 0,1%, TBBT 0,2%, stpp nồng độ 0,1% được bổ sung trong công đoạn xay nhuyễn. Giò lụa được bao gói trong bao bì ống collagen đường kính 30 mm, được định lượng 100 g/chiếc với chiều dài như nhau.

Phương pháp nghiên cứu và đánh giá

So sánh chất lượng giò khi sử dụng các loại phụ gia thực phẩm và γ -PGA: tiến hành thực nghiệm với các mẫu có bổ sung các loại phụ gia khác nhau. Đo các thông số về lực nén và lực cắt của sản phẩm, đồng thời tiến hành đánh giá cảm quan về màu sắc, mùi vị và hình dạng.

Xác định nồng độ γ -PGA: tiến hành thực nghiệm với các mẫu có tỷ lệ bổ sung γ -PGA vào nguyên liệu chính khác nhau. Điều chỉnh tỷ lệ bổ sung vào nguyên liệu với các nồng độ γ -PGA tăng dần từ 0,05 đến 0,25% theo bước nhảy 0,05%. Sau đó, đo các thông số về lực nén và lực cắt của sản phẩm, đồng thời tiến hành đánh giá cảm quan về màu sắc, mùi vị và hình dạng.

Đo độ nén: đánh giá độ rắn chắc của các loại gel protein cá, thịt sử dụng đầu đo hình cầu P/5S - đường kính 5 mm. Các thông số lựa chọn trên máy đo cấu trúc TA.HD Plus theo hướng dẫn sử dụng của máy.

Đo độ cắt: để đánh giá tính thống nhất của các sợi cơ, sự có mặt của mô liên kết và thành phần chất béo, nhiệt độ mẫu và tốc độ cắt. Đo độ cắt được mô phỏng dựa trên hành động cắn của con người khi sử dụng thực phẩm. Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả cắt được đánh giá qua việc sử dụng dao cắt Warner-Bratzler.

Đo cường lực gel: đánh giá chất lượng giò được đo theo 3 thông số: lực nén (phá vỡ), lực cắt và "cường lực gel". Cường lực gel là lực cao nhất, tính bằng gam, nhân với khoảng cách bị phá vỡ đo bằng cm và tương đương với cường lực gel [11]. Các chỉ tiêu lực nén, lực cắt, cường lực gel của giò được xử lý theo các hình dạng đồng nhất trước khi đem đi đo lực nén và được cắt theo các hình hộp có kích thước: dài 3 cm, rộng 2 cm, cao 2 cm và đo bằng máy đo cấu trúc Texture

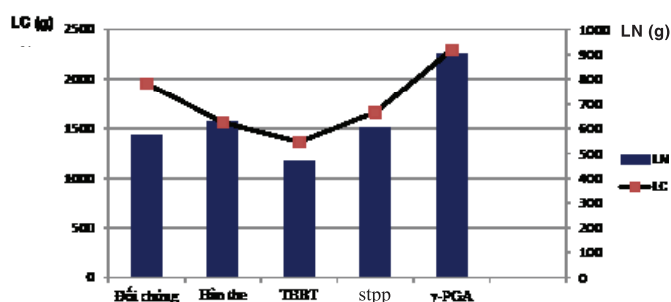
Analyser TA.XT Plus của Phòng thí nghiệm công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

Đánh giá cảm quan: theo tiêu chuẩn TCVN 3215-79 quy định phương pháp kiểm tra chất lượng sản phẩm thực phẩm bằng cảm quan cho điểm, áp dụng để kiểm tra tất cả các chỉ tiêu cảm quan hoặc từng chỉ tiêu riêng biệt (trạng thái, màu sắc, mùi, vị...) của từng loại sản phẩm và hàng hóa [12].

Kết quả và thảo luận

Đánh giá chất lượng giò lụa qua thông số lực nén và lực cắt

Đánh giá sự ảnh hưởng của các loại phụ gia đến chất lượng giò lụa tiến hành với các mẫu thí nghiệm có dùng hàn the, stpp, γ -PGA, TBBT với các nồng độ đã nêu, mẫu đối chứng trong nghiên cứu là các mẫu không sử dụng các loại phụ gia này. Các mẫu giò nghiên cứu được chế biến trong cùng một điều kiện (bao gói tiêu chuẩn, nhiệt độ, thời gian chế biến, thành phần phụ như nhau), các mẫu thành phẩm sau khi bảo ôn, được đem đi phân tích trên máy đo cấu trúc cho kết quả trong hình 1.



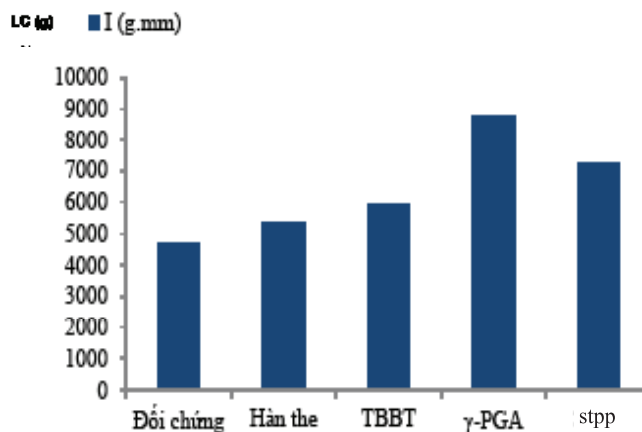
Hình 1: đồ thị lực nén (LN) và lực cắt (LC) của giò thành phẩm

Lực nén và lực cắt là 2 thông số đánh giá mức độ giòn và dai của sản phẩm giò lụa. Đồ thị hình 1 cho thấy, lực nén của các mẫu có sử dụng γ -PGA là lớn nhất, đồng nghĩa với độ đàn hồi và độ cứng của giò thành phẩm là tốt nhất, các mẫu có lực nén tương đương nhau là mẫu đối chứng, mẫu bổ sung hàn the và mẫu sử dụng stpp, các mẫu này có lực nén trung bình từ 1400-1600 g. Mẫu có lực nén thấp nhất là mẫu sử dụng TBBT, lực nén đo được từ mẫu này phản ánh đúng bản chất của tinh bột khi bổ sung vào các sản phẩm giò. Mẫu bổ sung tinh bột tạo cho giò bờ, cấu trúc bề mặt mịn kém xốp, TBBT thường được bổ sung vào giò như

một chất độn, làm giảm giá thành sản phẩm và thường được kết hợp cùng hàn the nhằm cải thiện cấu trúc giò. Đồ thị lực cắt thể hiện độ dai, dẻo của sản phẩm, lực cắt của các mẫu chứa γ -PGA (2294,6 g) cao nhất, mẫu sử dụng TBBT vẫn là mẫu có lực cắt kém nhất (1364,2 g), sự liên kết rời rạc trong cấu trúc giò của mẫu TBBT ảnh hưởng lớn đến việc tạo cấu trúc trong giò thành phẩm. Các mẫu sử dụng hàn the (1563,2 g) và stpp (1664,8 g) có lực cắt thấp hơn so với mẫu đối chứng, bởi hàn the và stpp được sử dụng trong thực phẩm chủ yếu để tăng độ giòn của sản phẩm, còn đối với mẫu giò trong nghiên cứu làm từ thịt lạnh đông nên việc cải thiện cấu trúc của giò bởi stpp và hàn the có ảnh hưởng không đáng kể.

Đánh giá chất lượng giò lụa qua thông số cường độ lực gel của sản phẩm

Thông số cường độ lực gel của sản phẩm được thể hiện bởi lực nén đầu đâm xuyên cách mẫu sản phẩm 15 mm. Cường độ lực gel là thông số đánh giá mức độ đồng nhất và khả năng liên kết của khối sản phẩm khi sử dụng các loại phụ gia khác nhau, kết quả thể hiện trong đồ thị hình 2.

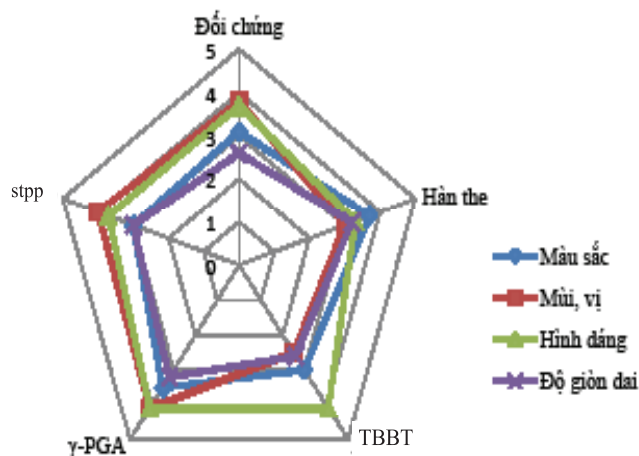


Hình 2: đồ thị đánh giá cường độ lực gel của các mẫu giò lụa

Đánh giá mức độ đồng nhất, độ đàn hồi của khối giò khi lực nén ở một khoảng cách nhất định đi qua khối giò trong đồ thị hình 2 cho thấy, cường độ lực gel lớn nhất ở mẫu có sử dụng γ -PGA, tiếp theo là các mẫu có stpp và TBBT, thấp nhất là hàn the và mẫu đối chứng. Qua phân tích về cường độ lực gel một lần nữa khẳng định việc sử dụng γ -PGA làm phụ gia cải thiện cấu trúc trong sản phẩm giò lụa là ưu việt nhất.

Đánh giá chất lượng giò lụa thông qua các thông số cảm quan

Các mẫu giò sau khi đo lực nén, lực cắt và cường độ gel, tiến hành đánh giá cảm quan, kết quả thu được như sau:

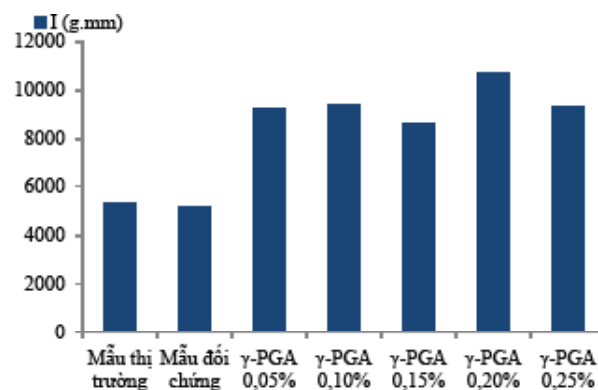


Hình 3: biểu đồ đánh giá điểm cảm quan các mẫu giò sử dụng phụ gia

Sản phẩm được chia làm 2 nhóm chính: nhóm sản phẩm có màu hồng nhạt là các sản phẩm sử dụng hàn the, γ -PGA; nhóm có màu trắng nhạt gồm có mẫu đối chứng, TBBT và mẫu chứa stpp. Về mùi vị, mẫu có sử dụng γ -PGA đạt giá trị cảm quan cao nhất và khác biệt không nhiều so với mẫu đối chứng và mẫu sử dụng stpp. Mẫu sử dụng hàn the, TBBT thể hiện sự khác biệt rõ so với các mẫu đối chứng và sử dụng γ -PGA. Khả năng sử dụng các loại phụ gia thực phẩm trong việc ổn định và cải thiện chất lượng của giò được thử nghiệm so sánh giữa γ -PGA và 3 loại phụ gia khác hiện đang được sử dụng rộng rãi trên thị trường, cho thấy γ -PGA có khả năng ổn định trạng thái, cho màu sắc đặc trưng của giò tươi, có thể thay thế các phụ gia độc hại như hàn the, tạo cấu trúc trong sản phẩm giò tốt hơn khi sử dụng các hợp chất photphat và các loại TBBT.

Khảo sát nồng độ γ -PGA đến chất lượng của giò lụa

Tiến hành thử nghiệm tại các nồng độ γ -PGA từ 0,05 đến 0,25%, trong đó mẫu đối chứng là mẫu không sử dụng γ -PGA (0%), các mẫu còn lại γ -PGA sử dụng với bước nhảy nồng độ là 0,05%. Sau khi thử nghiệm, tiến hành đánh giá cảm quan và đo cường độ gel của từng mẫu nghiên cứu cho kết quả như trên hình 4.



Hình 4: đồ thị so sánh các mẫu giò sử dụng γ -PGA với các nồng độ khác nhau

So sánh các mẫu có sử dụng γ -PGA với các nồng độ khác nhau và có thêm một mẫu được thu thập ngoài thị trường để so sánh đánh giá chất lượng của các mẫu giò qua thông số cường độ gel cho thấy, mẫu giò đối chứng và mẫu giò hiện đang bán trên thị trường của một công ty chế biến thực phẩm an toàn có cường độ gel tương đương nhau. Khi đem so sánh với các mẫu có bổ sung γ -PGA cho thấy sự khác nhau rõ rệt giữa các mẫu sử dụng và không sử dụng γ -PGA. Ở các nồng độ γ -PGA từ 0,05% đến 0,15%, cường độ gel của các mẫu này có giá trị dao động từ 8582 g.mm đến 9356 g.mm. Cường độ gel của mẫu giò đạt giá trị cao nhất ở mẫu có sử dụng γ -PGA với nồng độ 0,20% và có xu hướng giảm ở nồng độ 0,25%. Nhìn vào đồ thị có thể thấy cường độ gel của các mẫu giò đạt cực đại ở nồng độ 0,20% γ -PGA.

Trên phương diện đánh giá cảm quan cho thấy: mẫu đối chứng và mẫu sử dụng γ -PGA nồng độ 0,05% có màu sắc trắng sáng, lỗ hút vừa, bề mặt cắt khá mịn, có mùi thơm và vị ngọt của thịt, bị rạn khi gấp đôi miếng giò. Mẫu sử dụng γ -PGA từ nồng độ 0,10% đến nồng độ 0,20% đều có màu sắc hồng nhạt, đều màu, lỗ hút nhỏ, bề mặt khá mịn, giò có độ giòn và dai, gấp đôi và gấp đôi lát cắt giò đều không bị rạn, có hương vị thơm ngon đặc trưng. Mẫu sử dụng γ -PGA nồng độ 0,25% có màu hồng sáng, không đều màu, lỗ hút nhỏ, bề mặt cắt khá mịn, giò hơi dai, gấp làm 3 lát cắt giò hơi rạn.

Tuy đã có nhiều nghiên cứu về ứng dụng γ -PGA trong sản xuất bánh, mỳ sợi [12]..., nhưng đây là nghiên cứu đầu tiên sử dụng γ -PGA đối với sản phẩm thịt theo phương pháp truyền thống, các kết quả cho thấy γ -PGA có khả năng làm thay đổi cấu trúc sản phẩm, cho chất lượng sản phẩm tốt hơn các sản phẩm hiện có trên thị

trường. Từ nghiên cứu thực tế cho thấy, có thể sử dụng γ -PGA nồng độ 0,20% làm phụ gia trong chế biến giò, nhằm cải thiện một số chỉ tiêu chất lượng giò, thay thế cho hàn the đang sử dụng tràn lan trên thị trường.

Kết luận

Trong sản xuất giò lụa có thể sử dụng γ -PGA với nồng độ từ 0,10 đến 0,20%, một số chỉ tiêu chất lượng sản phẩm tăng rõ rệt so với sử dụng các loại phụ gia khác: lực cắt (2294,6 g), lực nén (902,05 g), cường lực gel (8802,5 g.mm), giá trị cảm quan màu sắc và mùi vị đều tốt.

Trong quá trình sử dụng γ -PGA vào sản phẩm giò, tùy thuộc vào chất lượng nguyên liệu đầu vào có thể tăng giảm hàm lượng γ -PGA theo đúng quy định về sinh an toàn thực phẩm cho phép.

Tài liệu tham khảo

[1] Nguyễn Chí Dũng và các cộng sự (2014), “Nghiên cứu công nghệ sinh tổng hợp, thu nhận poly gamma glutamic axit (PGA) ứng dụng trong các sản phẩm thực phẩm và nông nghiệp”, *Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ*.

[2] Nguyễn Chí Dũng, Trần Liên Hà, Nguyễn Văn Cách (2013), “Khảo sát các điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp axit poly γ glutamic của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B5”, *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2013*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr.133.

[3] Nguyễn Chí Dũng, Trần Liên Hà, Nguyễn Văn Cách (2013),

“Phân lập, tuyển chọn các chủng *Bacillus subtilis* có khả năng sinh tổng hợp axit poly γ glutamic”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **12(2)**.

[4] Trần Liên Hà (2010), *Nghiên cứu sản xuất các thực phẩm chức năng từ đậu tương*, Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội.

[5] Sawamura S (1913), “On *Bacillus Natto*”, *J. Coll. Agric. Tokyo*, **Vol.5**, pp.189-191.

[6] Yang L.C, et al (2008), “Effects of Poly- γ -glutamic Acid on Calcium Absorption in Rats”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **72(12)**, pp.3084-3090.

[7] Yung S.S, Wen C.S (2010), “Improving The Emulsion Stability of Sponge Cake by The Addition of γ -Polyglutamic Acid”, *Journal of Marine Science and Technology*, **18(6)**, pp.895-900.

[8] Hiroyuki T (2010), “Food Applications of Poly-Gamma-Glutamic Acid”, *Amino-Acid Homopolymers Occurring in Nature*, Microbiology Monographs, pp.155-168.

[9] Ho G.H, et al (2006), “ γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus Subtilis* (Natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities”, *Journal of the Chinese Chemical Society*, **53(6)**, pp.1363-1384.

[10] Shih I.L, Van Y.T (2001), “The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications”, *Bioresource Technology*, **79(3)**, pp.207-225.

[11] Yamazawa M (1990), “Effect of heating temperature on structure and gelreinforcing ability of starch granules in kamaboko-gel”, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **Vol.56**, pp.505-510.

[12] Hà Duyên Tư (2006), *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

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 58 - Number 4 - April 2016

Nghiên cứu ứng dụng PET/CT sử dụng ^{18}F -FDG trong nhồi máu cơ tim, ung thư hạch và ung thư đại - trực tràng.

Lê Ngọc Hà, Mai Hồng Sơn, Phạm Nguyên Sơn, Nguyễn Cường Thịnh, Nguyễn Thị Minh Phương và cộng sự

Phát hiện gen kháng erythromycin và tetracycline ở các chủng *Streptococcus suis* gây bệnh ở người.

Lê Văn Duyệt, Trần Thị Giáng Hương, Nguyễn Vũ Trung

Đánh giá kết quả sớm điều trị hoá chất bổ trợ trước bằng phác đồ Taxanes - doxorubicin (TA) kết hợp phẫu thuật bảo tồn trên bệnh nhân ung thư vú giai đoạn II (T2;N0,1;M0).

Hoàng Anh Dũng, Lê Hồng Quang, Lê Thanh Đức, Trần Văn Thuận

Phẫu thuật nội soi một cửa điều trị ung thư trực tràng: kinh nghiệm của Bệnh viện Trung ương Huế.

Phạm Như Hiệp và cộng sự

Xác định loài nấm candida phân lập từ máu người bằng bộ kit PCR-RFLP do học viện quân y sản xuất.

Đỗ Ngọc Ánh, Lê Trần Anh, Nguyễn Lê Huyền Trang, Hoàng Cao Sa, Nguyễn Khắc Lực

Nghiên cứu tổng hợp (S)-clopidogrel bisulfat từ DL-2-clorophenyl glycin.

Phan Thị Trang, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Văn Tài

Nghiên cứu quy trình sản xuất viên nang mềm chứa cao dược liệu đinh lăng và bạch quả.

Nguyễn Huy Văn, Trần Quang Luc, Lâm Thị Bích Hồng

Nghiên cứu tổng hợp Gefitinib làm thuốc điều trị bệnh ung thư.

Nguyễn Văn Tài, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Thị Hà, Vũ Đức Nam, Nguyễn Tiên Phong

Nghiên cứu bao chế hệ phân tán rắn Felodipin bằng phương pháp phun sấy.

Hoàng Văn Đức, Nguyễn Thị Thanh Duyên, Võ Xuân Minh

Nghiên cứu độc tính cấp của viên nang cứng tòi đen trên động vật thực nghiệm.

Vũ Bình Dương, Hồ Anh Sơn

Đánh giá hiệu quả điều trị xơ gan của việc ghép tế bào gốc trung mô tủy xương trên mô hình chuột.

Trương Hải Nhung, Lê Văn Trinh, Nguyễn Hải Nam, Ngô Quốc Đạt, Lê Minh Huy, Huỳnh Nghĩa, Nguyễn Văn Thanh, Phạm Văn Phúc, Phan Kim Ngọc

Nghiên cứu ứng dụng axit poly gamma glutamic trong cải thiện chất lượng giò lụa.

Nguyễn Chí Dũng, Đặng Thị Thu, Nguyễn Văn Cách, Trần Liên Hà

1 Application of PET/CT using ^{18}F -FDG in myocardial infarction, lymphoma and colorectal cancer patients.

Le Ngoc Ha, Mai Hong Son, Pham Nguyen Son, Nguyen Cuong Thinh, Nguyen Thi Minh Phuong et al.

6 Detection of erythromycin and tetracycline resistant genes in *Streptococcus suis* causing human infections.

Le Van Duyet, Tran Thi Giang Huong, Nguyen Vu Trung

11 Evaluating the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer patient by Taxanes - doxorubicin regimen.

Hoang Anh Dung, Le Hong Quang, Le Thanh Duc, Tran Van Thuan

17 Single port laparoscopic surgery in rectal cancer treatment: experience of Hue Central Hospital.

Pham Nhu Hiep et al.

17 Distribution of candida species collected from blood of Vietnamese patients based on PCR-RFLP kit.

Do Ngoc Anh, Le Tran Anh, Nguyen Le Huyen Trang, Hoang Cao Sa, Nguyen Khac Luc

23 Study on synthesis of (S)-clopidogrel bisulfate from DL-2-clorophenyl glycin.

Phan Thi Trang, Nguyen Thi Thu Trang, Nguyen Van Tai

27 Research into the manufacturing process of soft capsules containing Ginkgo biloba and Polyscias fructicosa extracts.

Nguyen Huy Van, Tran Quang Luc, Lam Thi Bich Hong

33 Study on synthesis of Gefitinib for cancer drug.

Nguyen Van Tai, Nguyen Thi Thu Trang, Nguyen Thi Ha, Vu Duc Nam, Nguyen Tien Phong

38 A study on preparing solid dispersion system of Felodipine by spray drying method.

Hoang Van Duc, Nguyen Thi Thanh Duyên, Vo Xuan Minh

44 Study on the acute toxicity of black garlic capsule on experimental mice.

Vũ Bình Dương, Hồ Anh Sơn

49 Effectiveness of the treatment of liver cirrhosis by using bone marrow mesenchymal stem cell in a mouse model.

Trương Hải Nhung, Lê Văn Trinh, Nguyễn Hải Nam, Ngô Quốc Đạt, Lê Minh Huy, Huỳnh Nghĩa, Nguyễn Văn Thanh, Phạm Văn Phúc, Phan Kim Ngọc

54 Applying poly gamma glutamic acid for better “Gio lụa” production quality.

Nguyễn Chí Dũng, Đặng Thị Thu, Nguyễn Văn Cách, Trần Liên Hà