

Phân tích đột biến EGFR trong mẫu mô phủ paraffin và một số yếu tố liên quan ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ trên 60 tuổi

Dương Thanh Hiền¹, Phạm Cẩm Phương², Nguyễn Thuận Lợi², Lê Thị Luyến^{1*}

¹Khoa Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai

Ngày gửi bài 27/3/2020; ngày chuyển phản biện 31/3/2020; ngày nhận phản biện 25/4/2020; ngày chấp nhận đăng 5/5/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định được tỷ lệ và phân tích một số yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) trên 60 tuổi. Phương pháp và đối tượng nghiên cứu: phát hiện đột biến EGFR bằng kỹ thuật Strip Assay từ mẫu mô của 351 bệnh nhân UTPKTBN điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018. Kết quả cho thấy, tỷ lệ đột biến gen EGFR là 38,2%, bao gồm: đột biến mất đoạn exon 19 (48,6%), đột biến điểm trên exon 21 (41,6%), đột biến điểm trên exon 18 (4,9%) và đột biến kháng thuốc T790M trên exon 20 (4,9%). Tỷ lệ đột biến ở nữ (66,7%) cao hơn ở nam (27,5%), ở người không hút thuốc lá (53,3%) cao hơn ở người hút thuốc (30,3%). Kết luận: tỷ lệ đột biến EGFR ở bệnh nhân UTPKTBN trên 60 tuổi tương đối cao, trong đó vị trí hay đột biến nhất là exon 19 và 21. Đột biến thường hay gặp ở nữ giới, người không hút thuốc lá, giá trị maxSUV khối u phổi nguyên phát của nhóm bệnh nhân có đột biến gen thấp hơn so với nhóm không đột biến.

Từ khóa: đột biến gen EGFR, trên 60 tuổi, ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Phần lớn các trường hợp UTPKTBN được chẩn đoán ở bệnh nhân cao tuổi, hơn 50% các trường hợp được chẩn đoán khi bệnh nhân trên 65 tuổi [1]. Chẩn đoán sớm UTPKTBN thường khó khăn do triệu chứng lâm sàng hạn chế và không đặc hiệu. Do đó, hầu hết bệnh nhân UTPKTBN khi được chẩn đoán đã ở giai đoạn muộn, có di căn xa, phương pháp điều trị chủ yếu là hóa trị và điều trị triệu chứng. Bệnh nhân cao tuổi có xu hướng dung nạp hóa trị kém vì thường mắc các bệnh kèm theo và sự suy yếu các cơ quan trong cơ thể, vì vậy phần lớn không thể hóa trị liệu tích cực, các lựa chọn thay thế cho hóa trị thông thường như điều trị nhắm trúng đích rất đáng được quan tâm [1].

Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì EGFR mang hoạt tính tyrosine kinase có vai trò quan trọng trong việc điều hòa các quá trình sinh trưởng, phát triển, trao đổi chất và sinh lý của tế bào. Khi EGFR hoạt hóa quá mức do đột biến gen có thể dẫn đến tăng sinh bất thường cũng như sự chuyển dạng tế bào gây ra bệnh lý ác tính [2]. Nhiều công trình nghiên cứu về liệu pháp điều trị đích bằng TKI (tyrosine kinase

inhibitor) [3] đã chứng tỏ hiệu quả tốt, đồng thời tác dụng phụ tương đối nhẹ so với những tác nhân gây độc tế bào thông thường nên các thuốc đích được coi là phù hợp cho bệnh nhân UTPKTBN cao tuổi có đột biến gen. Tuy nhiên, hiệu quả của TKI phụ thuộc vào tình trạng đột biến gen EGFR. Vì vậy, bệnh nhân UTPKTBN nên được xét nghiệm đột biến EGFR một cách thường quy để giúp các bác sĩ lâm sàng có thể lựa chọn phác đồ phù hợp, nâng cao hiệu quả điều trị và chất lượng sống của bệnh nhân.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 351 bệnh nhân UTPKTBN có chỉ định xét nghiệm đột biến gen EGFR mẫu mô, điều trị tại Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 1/2017 đến tháng 8/2018 đáp ứng các tiêu chuẩn chọn lựa và tiêu chuẩn loại trừ.

Tiêu chuẩn chọn lựa:

- Bệnh nhân trên 60 tuổi, được chẩn đoán xác định UTPKTBN dựa vào kết quả mô bệnh học.

*Tác giả liên hệ: Email: luyenle66@gmail.com

Analysis of EGFR mutations in paraffin-covered tissue samples and some related factors from non-small cell lung cancer patients over 60 years old

Thanh Hien Duong¹, Cam Phuong Pham²,
Thuan Loi Nguyen², Thi Luyen Le^{1*}

¹School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi
²The Nuclear Medicine and Oncology Center, Bach Mai Hospital

Received 27 March 2020; accepted 5 May 2020

Abstract:

Objective: to describe EGFR mutation status detected in tissue samples and analyse some related factors in NSCLC patients over 60 years old. **Methodology:** detecting EGFR mutations by Strip Assay Kit from 351 tissue samples of NSCLC patients at Bach Mai Hospital 2017-2018. **Results:** ratio of EGFR is 38.2%, including exon 19 deletion mutation (48.6%), exon 21 point mutation (41.6%), exon 18 point mutation (4.9%), and T790M resistant mutation on exon 20 (4.9%). The mutant rate in females (66.7%) is higher than in males (27.5%), and shows a higher rate in non-smokers (53.3%) compared to smokers (30.3%). **Conclusions:** the EGFR mutation ratio in NSCLC patients over 60 years is relatively high, the frequent mutant sites are exon 19 and 21. Mutations are more common in women and non-smokers. The maxSUV value of primary lung tumors in patients with gene mutations is lower than in the non-mutant group.

Keywords: EGFR mutation, non-small cell lung cancer, over 60 years old.

Classification number: 3.2

- Bệnh nhân có đầy đủ hồ sơ bệnh án bao gồm: thông tin hành chính, kết quả mô bệnh học, giai đoạn bệnh và một số xét nghiệm cận lâm sàng.

Tiêu chuẩn loại trừ: loại trừ những trường hợp không xác định được đột biến EGFR do chất lượng mẫu bệnh phẩm kém.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả hồi cứu.

Mẫu nghiên cứu: được chọn theo phương pháp chọn mẫu thuận tiện.

Các biến số, chỉ số trong nghiên cứu: thông tin chung của đối tượng nghiên cứu (tuổi, giới tính, địa chỉ, tiền sử hút thuốc lá, vị trí và phương pháp lấy mẫu, kết quả xét nghiệm mô bệnh học, giai đoạn bệnh, kết quả CEA, Cyfra 21-1, maxSUV); kết quả xét nghiệm đột biến gen EGFR mẫu mô (có hay không có đột biến, loại đột biến, vị trí đột biến); xác định mối liên quan giữa đột biến gen với các đặc điểm của đối tượng nghiên cứu.

Tách chiết DNA: tách DNA từ mẫu mô vùi paraffin sử dụng bộ kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen - Mỹ).

Phát hiện, phân tích kết quả đột biến EGFR mẫu mô: đầu tiên khuếch đại đoạn gen quan tâm bằng phản ứng PCR sử dụng bộ kit EGFR XL StripAssay® (ViennaLab - Áo). Sau đó, lai sản phẩm khuếch đại với đầu dò đặc hiệu sử dụng bộ kit EGFR XL StripAssay® (ViennaLab - Áo). Sau quá trình lai, các test strip được so sánh với thang chuẩn để đánh giá kết quả thông qua phần mềm StripAssay Evaluator® được cung cấp bởi ViennaLab.

Phân tích thống kê: số liệu được thu thập, nhập và mã hóa bằng phần mềm Excel 2013. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0 với các test thống kê y học, các yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR có ý nghĩa khi giá trị $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm nhóm bệnh nhân nghiên cứu

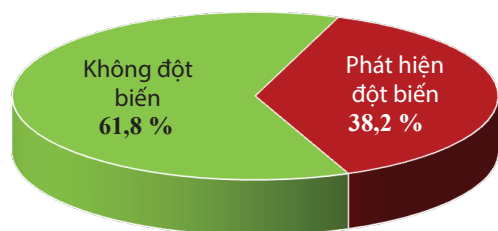
Tỷ lệ bệnh nhân nam trong nghiên cứu cao gấp 2,6 lần nữ. Phần lớn có hút thuốc lá (chiếm 65%). Mô bệnh học chủ yếu là ung thư biểu mô tuyến. Bệnh nhân phát hiện bệnh ở giai đoạn muộn, đã có di căn chiếm tỷ lệ cao hơn hẳn các giai đoạn trước (bảng 1).

Bảng 1. Một số đặc điểm của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm	Tổng số		
	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)	
Giới tính	Nam	255	72,6
	Nữ	96	27,4
Tiền sử hút thuốc lá	Không	120	34,2
	Đã hoặc đang hút	231	65,8
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	339	96,6
	Ung thư biểu mô vảy	11	3,1
	Ung thư biểu mô dạng sarcom	1	0,3
Giai đoạn	Giai đoạn I	4	1,1
	Giai đoạn II	26	7,4
	Giai đoạn III	55	15,7
	Giai đoạn IV	266	75,8

Tỷ lệ đột biến EGFR

Trong tổng số 351 đối tượng nghiên cứu, có 134 trường hợp phát hiện đột biến gen EGFR, chiếm tỷ lệ 38,2%, thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Tỷ lệ phát hiện đột biến.

Bảng 2. Tỷ lệ các loại đột biến.

Đặc điểm đột biến EGFR	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)		
Số lượng đột biến (134 bệnh nhân)	01	126	94,0	
	02	8	6,0	
Vị trí đột biến (142 đột biến)	Exon 18	G719A	4	4,9
		G719C	2	
		G719S	1	
	Exon 19	E746_A750del	48	48,6
		L747_A750delinsP	10	
		L747_T751del	2	
		L747_P753delinsS	9	
	Exon 20	T790M	7	4,9
		L858R	58	41,6
	Exon 21	L861Q	1	

Trong 134 bệnh nhân phát hiện đột biến, có 8 bệnh nhân mang hai đột biến nên tổng số đột biến phát hiện được là 142. Trong đó, các đột biến xóa đoạn trên exon 19 là hay

gặp nhất (48,6%), đặc biệt là đột biến xóa đoạn E746_A750. Đột biến điểm trên exon 21 cũng rất thường gặp (41,6%), điển hình là đột biến L858R. Các đột biến điểm trên exon 18 tương đối hiếm gặp (4,9%). Đột biến kháng thuốc chiếm tỷ lệ 4,9% đều là T790M trên exon 20 (bảng 2).

Phân tích một số yếu tố liên quan

Bảng 3. Một số yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR.

Đặc điểm	Số bệnh nhân nghiên cứu	Phát hiện đột biến		P	
		Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)		
Giới tính	Nam	255	70	27,5	<0,001
	Nữ	96	64	66,7	
Tiền sử hút thuốc lá	Không	120	64	53,3	<0,001
	Đã hoặc đang hút	231	70	30,3	
Mô bệnh học	Ung thư biểu mô tuyến	339	132	38,9	0,119
	Ung thư biểu mô vảy	11	2	18,2	
	Ung thư biểu mô dạng sarcom	1	0	0	
Vị trí lấy mẫu	U phổi	215	81	37,7	0,298
	Tổ chức di căn hạch	30	13	43,3	
	Tổ chức di căn xa	77	25	32,5	
	Dịch màng phổi/màng tim	29	15	51,7	
Phương pháp lấy mẫu	Sinh thiết	298	114	38,3	0,081
	Phẫu thuật	29	7	24,1	
	Chọc dịch	24	13	54,2	
Giai đoạn	Giai đoạn I, II, III	85	31	36,5	0,710
	Giai đoạn IV	266	103	38,7	
CEA	Bình thường (<4,3 ng/ml)	115	43	37,4	0,833
	Tăng (≥4,3 ng/ml)	236	91	38,6	
Cyfra 21-1	Bình thường (<3,3 ng/ml)	145	58	40,0	0,555
	Tăng (≥3,3 ng/ml)	206	76	36,9	
maxSUV u phổi	Có đột biến EGFR	134	9,9±5,1	0,046	
	Không đột biến	217	12,2±7,3		
maxSUV hạch	Có đột biến EGFR	134	8,4±5,1	0,761	
	Không đột biến	217	8,7±5,8		
maxSUV tổ chức di căn	Có đột biến EGFR	134	8,0±6,0	0,442	
	Không đột biến	217	9,0±6,8		

Kết quả phân tích ở bảng 3 cho thấy, tỷ lệ đột biến gen có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giới tính và tiền sử hút thuốc lá, đột biến thường gặp ở nữ giới, người không hút thuốc lá; không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ đột biến với mô bệnh học, giai đoạn bệnh, vị trí hay phương pháp lấy mẫu xét nghiệm cũng như giá trị định lượng CEA và Cyfra 21-1; maxSUV trung bình ở nhóm có đột biến EGFR thấp hơn so với nhóm không đột biến, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê đối với maxSUV tại khối u nguyên phát.

Bàn luận

Kết quả phân tích đột biến gen EGFR

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 38,2% trường hợp phát hiện đột biến gen EGFR, phù hợp với một số nghiên cứu trước đây tại Việt Nam [4, 5]. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn nhiều nghiên cứu khác tại khu vực châu Á, nghiên cứu PIONEER [6] cho thấy tỷ lệ đột biến gen EGFR tại Việt Nam là 64,2%, cao nhất trong bảy nước tham gia nghiên cứu. Sự khác biệt này là do tiêu chuẩn lựa chọn không giống nhau. Chúng tôi chỉ tập trung nghiên cứu đối tượng UTPKTBN trên 60 tuổi, trong khi đó đã có nhiều công bố trên thế giới cũng như trong nước cho thấy bệnh nhân nữ, trẻ tuổi, không hút thuốc lá, khu vực Đông Á thường có tỷ lệ đột biến EGFR cao. Ngoài ra, phương pháp xét nghiệm đột biến khác nhau (giải trình tự gen, PCR kết hợp lai đầu dò, Scorpion ARMS, realtime PCR,...) cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phân tích.

Trong 142 đột biến phát hiện được ở 134 bệnh nhân (8 bệnh nhân mang 2 đột biến), đa số các đột biến phát hiện trên exon 19 (48,6%) và exon 21 (41,6%). Đột biến kháng thuốc T790M trên exon 20 chiếm 4,9%, thường kết hợp với một đột biến trên exon khác. Xét về tính đáp ứng với thuốc TKI, 95,1% đột biến trong nghiên cứu làm tăng tính nhạy cảm của khối u với TKI, chỉ có 7 trường hợp mang đột biến T790M liên quan đến kháng thuốc TKI thế hệ 1. Kết quả này phù hợp với đa số các nghiên cứu trên thế giới cũng như tại Việt Nam [4-6] với đột biến mất đoạn trên exon 19 và đột biến điểm (L858R) trên exon 21 là hai loại đột biến hay gặp nhất.

Một số yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR

Tình trạng đột biến gen EGFR có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giới tính và tiền sử hút thuốc lá, tỷ lệ đột biến ở nữ giới cao hơn ở nam giới (66,7 so với 27,5%), ở nhóm bệnh nhân không hút thuốc lá cao hơn nhóm có tiền sử hút thuốc lá (53,3% so với 30,3%). Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu khác [5, 6].

Không có sự khác biệt về vị trí hay phương pháp lấy mẫu bệnh phẩm xét nghiệm giữa nhóm có đột biến và không đột biến. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Lan Anh (2017) [4].

Tỷ lệ đột biến EGFR ở bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến là 38,9%, tương đồng với nghiên cứu trong nước của Nguyễn Thị Lan Anh (2017), Mai Trọng Khoa và cs (2016) [4, 5]. Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ đột biến gen ở nhóm ung thư biểu mô tuyến và nhóm ung thư biểu mô khác (vây và dạng sarcom) là do cỡ mẫu của hai nhóm chênh lệch khá lớn (339 trường hợp ung thư biểu mô tuyến nhưng chỉ có 11 trường hợp ung thư biểu mô vây và

1 trường hợp ung thư biểu mô dạng sarcom). Tuy nhiên, có thể thấy xu hướng gia tăng tỷ lệ đột biến ở nhóm bệnh nhân mô bệnh học là ung thư biểu mô tuyến (38,9%) so với nhóm ung thư biểu mô khác (18,2% ở nhóm ung thư biểu mô vây và 0% ở nhóm ung thư biểu mô dạng sarcom).

Xét về mối liên quan giữa đột biến với giai đoạn bệnh, chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ đột biến gen ở nhóm bệnh nhân giai đoạn IV so với nhóm bệnh nhân các giai đoạn còn lại. Nhận xét này phù hợp với kết quả của Y. Liu và cs (2016) không thấy mối liên quan giữa đột biến gen EGFR với giai đoạn bệnh [7]. Từ đó có thể thấy đột biến gen đã xuất hiện từ rất sớm, ảnh hưởng tới tiên lượng và điều trị bệnh.

Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị maxSUV trung bình tại khối u phổi nguyên phát với tỷ lệ đột biến gen, cụ thể là giá trị maxSUV trung bình tại u phổi thấp hơn ở bệnh nhân UTPKTBN có đột biến gen EGFR, nhận định này tương đồng với một số nghiên cứu của tác giả I.L. Na và cs (2010), R.H. Mak và cs (2011) [8, 9].

Ngoài maxSUV, các chất chỉ điểm khối u cũng là một xét nghiệm hay sử dụng trên lâm sàng trong việc đánh giá mức độ tiến triển, theo dõi đáp ứng điều trị ung thư. Nghiên cứu của E.Y. Romero-Ventosa và cs (2015) [10] cho rằng CEA là một chỉ số tiên lượng độc lập trong việc tiên lượng đáp ứng của khối u với thuốc TKI. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi không nhận thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ CEA và Cyfra 21-1 với tình trạng đột biến gen EGFR. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu tại Việt Nam của Nguyễn Thị Lan Anh (năm 2017) [4].

Hiện nay, xét nghiệm thường quy đột biến gen EGFR gặp một số khó khăn, đặc biệt trong những trường hợp khối u ở những vị trí khó sinh thiết, hoặc bệnh nhân từ chối sinh thiết. Vì vậy, trên thực hành lâm sàng, các chỉ số như maxSUV, chất chỉ điểm khối u, đặc điểm mô bệnh học, cũng như đặc điểm về giới tính, tình trạng hút thuốc lá có thể góp phần dự đoán khả năng đột biến gen EGFR ở bệnh nhân UTPKTBN trên 60 tuổi.

Kết luận

Qua nghiên cứu phát hiện đột biến EGFR bằng kỹ thuật Strip Assay từ mẫu mô của 351 bệnh nhân UTPKTBN trên 60 tuổi điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018, chúng tôi rút ra những kết luận sau:

- Tỷ lệ đột biến gen EGFR chiếm 38,2% số bệnh nhân UTPKTBN trên 60 tuổi.

- Trong số những đột biến, đột biến xóa đoạn exon 19 chiếm 48,6%; đột biến điểm trên exon 21 chiếm 41,6% và trên exon 18 chiếm 4,9%; đột biến kháng thuốc T790M trên exon 20 chiếm 4,9%.

- Tỷ lệ đột biến ở nữ (66,7%) cao hơn ở nam (27,5%), ở người không hút thuốc lá (53,3%) cao hơn ở người hút thuốc (30,3%).

- Giá trị maxSUV khối u phổi nguyên phát của nhóm bệnh nhân có đột biến gen thấp hơn so với nhóm không đột biến.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự giúp đỡ của các bác sĩ, điều dưỡng, kỹ thuật viên tại Đơn vị Gen - Tế bào gốc, Trung tâm Y học hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C. Gridelli, E. Massarelli, P. Maione, et al. (2004), "Potential role of molecularly targeted therapy in the management of advanced nonsmall cell lung carcinoma in the elderly", *Cancer*, **101(8)**, pp.1733-1744.

[2] Nguyễn Minh Hà (2012), "Vai trò đột biến gen EGFR trong liệu pháp điều trị đích bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **16(1)**, tr.1-6.

[3] A. Daste, C. Chakiba, C. Domblides, et al. (2016), "Targeted therapy and elderly people: a review", *European Journal of Cancer*, **69**, pp.199-215.

[4] Nguyễn Thị Lan Anh (2017), *Nghiên cứu đặc điểm đột biến gen EGFR và mối liên quan với lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân*

ung thư phổi biểu mô tuyến, Luận án TS y học, Học viện Quân y.

[5] Mai Trọng Khoa, Trần Đình Hà, Phạm Cẩm Phương và cộng sự (2016), "Xác định đột biến gen EGFR trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ tại Bệnh viện Bạch Mai", *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, **3**, tr.271-277.

[6] Y. Shi, J.S. Au, S. Thongprasert, et al. (2014), "A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER)", *J. Thorac. Oncol.*, **9(2)**, pp.154-162.

[7] Y. Liu, J. Kim, F. Qu, et al. (2016), "CT Features associated with epidermal growth factor receptor mutation status in patients with lung adenocarcinoma", *Radiology*, **280(1)**, pp.271-280.

[8] I.L. Na, B.H. Byun, K.M. Kim, et al. (2010), "18F-FDG uptake and EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer: a single-institution retrospective analysis", *Lung Cancer*, **67(1)**, pp.76-80.

[9] R.H. Mak, S.R. Digumarthy, A. Muzikansky, et al. (2011), "Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in predicting epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer", *Oncologist*, **16(3)**, pp.319-336.

[10] E.Y. Romero-Ventosa, S. Blanco-Prieto, A.L. Gonzalez-Pineiro, et al. (2015), "Pretreatment levels of the serum biomarkers CEA, CYFRA 21-1, SCC and the soluble EGFR and its ligands EGF, TGF-alpha, HB-EGF in the prediction of outcome in erlotinib treated non-small-cell lung cancer patients", *SpringerPlus*, **4**, DOI: 10.1186/s40064-015-0891-0.

Đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ của tế bào lympho máu ngoại vi người bằng kỹ thuật phân tích sai hình nhiễm sắc thể do tổn thương phân tử DNA ở pha G2

Phạm Ngọc Duy*, Chế Quang Tuấn, Trần Thanh Mai, Lê Thị Thùy Linh,
Hán Huỳnh Diễm, Lê Thị Bích Thy, Phạm Xuân Hải

Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

Ngày nhận bài 13/1/2020; ngày chuyển phản biện 16/1/2020; ngày nhận phản biện 12/3/2020; ngày chấp nhận đăng 18/3/2020

Tóm tắt:

Phương pháp xạ trị bên cạnh tác động tiêu diệt tế bào ung thư, còn ảnh hưởng không chọn lọc đến các tế bào thường xung quanh. Kỹ thuật phân tích sai hình nhiễm sắc thể do tổn thương phân tử DNA ở pha G2 của chu trình tế bào được kỳ vọng ứng dụng để đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ nhằm nâng cao hiệu quả điều trị và an toàn bức xạ. Trong nghiên cứu này, các mẫu tế bào lympho máu ngoại vi người được nuôi cấy in vitro và chiếu xạ bằng nguồn phát tia X với các liều 0,5; 1,0; 2,0 và 4,0 Gy ở thời điểm 69 giờ sau nuôi cấy, khi tế bào đang ở pha G2. Mẫu tiếp tục được xử lý với caffeine nồng độ 4 mM, thu hoạch tế bào và tiêu bản hiển vi được phân tích để xác định tần số sai hình kiểu nhiễm sắc thể ở mẫu có và không xử lý caffeine. Độ nhạy cảm phóng xạ được đánh giá dựa trên chỉ số IRS = $(G2/G2_{\text{caffeine}}) \times 100\%$. Kết quả cho thấy phương pháp này có tiềm năng ứng dụng trong đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ cá nhân và triển vọng đánh giá cho các bệnh nhân ung thư trước xạ trị.

Từ khóa: caffeine, chu trình tế bào, điểm kiểm soát G2, độ nhạy cảm phóng xạ cá nhân, sai hình nhiễm sắc thể, xạ trị.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Xạ trị là một trong những phương pháp phổ biến và hiệu quả để điều trị ung thư. Mục đích của xạ trị là loại bỏ toàn bộ tế bào ung thư trong khối u nguyên phát hoặc một số hạch di căn nhất định, đồng thời giảm thiểu tổn thương cho các tế bào hoặc mô lành xung quanh. Có 2 chiến lược được quan tâm nghiên cứu nhằm nâng cao hiệu quả xạ trị: phát triển các thiết bị xạ trị tiên tiến và nghiên cứu các hiệu ứng sinh học thích hợp có thể hỗ trợ cá nhân hóa điều trị (personalized treatment) [1]. Các kỹ thuật tiên tiến được sử dụng trong xạ trị chính xác bao gồm xạ trị điều biến liều (IMRT) dưới sự hỗ trợ của kỹ thuật hình ảnh và sử dụng các chùm hạt proton hoặc ion nặng như carbon (particle therapy) đã giúp nâng cao hiệu quả điều trị cho bệnh nhân. Ngoài ra, việc kết hợp giữa phương pháp xạ trị tiên tiến và đánh giá các hiệu ứng sinh học cũng được kỳ vọng mang lại kết quả tốt hơn trong điều trị ung thư. Có nhiều yếu tố sinh học có thể ảnh hưởng đến tính kháng xạ hay nhạy xạ của tế bào khối u, như độ nhạy cảm của tế bào, khả năng sửa sai tổn thương phân tử DNA; kích thước khối u, môi trường xung quanh khối u (nồng độ oxy, nhiệt độ...). Có đến 70%

trường hợp khác biệt về độ nhạy cảm phóng xạ lâm sàng là do yếu tố di truyền [2, 3]. Những yếu tố này đều liên quan đến cả tế bào khối u và tế bào bình thường [4]. Nghiên cứu hiệu ứng tác động in vitro của bức xạ ion hóa ở cấp độ tế bào nhằm đánh giá mức độ tổn thương và khả năng sửa sai phân tử DNA của tế bào được kỳ vọng sẽ mang lại một phương pháp tiên lượng tính nhạy cảm phóng xạ cho bệnh nhân trước xạ trị. Một trong các phương pháp phân tích được sử dụng phổ biến hiện nay là phân tích sai hình nhiễm sắc thể (NST) do tổn thương phân tử DNA ở pha G2 của chu trình tế bào (G2-assay). Phương pháp này được đánh giá là một phương pháp dự đoán đáng tin cậy về độ nhạy và có tương quan tốt khi dùng để nghiên cứu ở bệnh nhân ung thư [5].

Hầu hết các nghiên cứu độ nhạy cảm phóng xạ tế bào đều thực hiện trên tế bào lympho hoặc nguyên bào sợi, trong đó tế bào lympho có ưu thế hơn do quần thể tế bào này bình thường không phân chia và luôn đồng bộ ở pha G0 của chu trình tế bào. Chu trình phân chia của tế bào bình thường qua các pha G0-G1, S, G2 và M. Khi tế bào bị chiếu xạ ở pha G0, phân tử DNA có thể bị tổn thương dạng chuỗi đơn (single-strand break - SSB) hoặc chuỗi đôi (double-strand

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

Assessing individual radiosensitivity in human peripheral blood lymphocytes by the method for analysing chromosome aberrations induced by DNA damage in G2 phase

Ngoc Duy Pham*, Quang Tuan Che, Thanh Mai Tran, Thi Thuy Linh Le, Huynh Dien Han, Thi Bich Thy Le, Xuan Hai Pham

Da Lat Nuclear Research Institute, Vietnam Atomic Energy Institute

Received 13 January 2020; accepted 18 March 2020

Abstract:

Radiotherapy not only kills the cancer cells but also non-selectively affects the surrounding normal cells. The method for analysing chromosome aberrations induced by DNA damage in G2 phase of the cell cycle is expected to be used to assess the radiosensitivity for improving treatment efficacy and radiation safety. In this study, the human peripheral blood lymphocytes samples were cultured in vitro and irradiated by X-ray sources with the doses of 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 Gy after 69 hours' cultivation, when most of the lymphocyte cells were in G2 phase. The samples were continued to be treated with 4 mM caffeine, cells harvesting and scoring of microscope slides for determining the chromatid break frequency in the samples with and without caffeine treatment. The radiosensitivity was evaluated by $IRS = (G2/G2_{\text{caffeine}}) \times 100\%$. The results exhibited that this method has greatly potential application in assessing individual radiosensitivity, especially for cancer patients before radiation therapy.

Keywords: caffeine, cell cycle, chromosome aberrations, G2 checkpoint, individual radiosensitivity, radiation therapy.

Classification number: 3.2

break - DSB). Trong đó, tổn thương SSB có thể được sửa sai dễ dàng nhờ cơ chế bắt cặp bổ sung; tổn thương DSB thì phức tạp hơn, nếu không được phục hồi hoặc phục hồi nhằm sẽ hình thành các sai hình kiểu NST (mảnh, đa tâm...) và có thể quan sát được khi tế bào ở pha M. Khi tế bào bị chiếu xạ ở pha G2, pha tế bào đã sinh tổng hợp và nhân đôi phân tử DNA nên ở pha này chủ yếu có tổn thương dạng DSB hình thành sai hình kiểu đứt gãy nhiễm sắc tử (NSTừ) có thể quan sát được khi tế bào ở pha M. Phân tích xác định tần số sai hình dạng đứt gãy NSTừ khi chiếu xạ ở pha G2 của chu trình tế bào (G2-assay) có thể đánh giá được độ nhạy cảm phóng xạ của tế bào. Kết quả nghiên cứu của Poggioli và cộng sự (2010) [6] cho thấy, nhóm bệnh nhân ung thư vú nhạy xạ hơn nhóm đối chứng và phương pháp phân tích G2-CA-assay phù hợp để phân tích độ nhạy cảm phóng xạ hơn G0-assay. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra sự khác biệt về độ nhạy cảm phóng xạ trong nhóm đối tượng mắc các bệnh ung thư và nhóm đối chứng khi nghiên cứu bằng kỹ thuật này. Điều đó theo những phát hiện của Pantelias và Terzoudi (2011) [7], phản ánh việc bệnh nhân có mang đột biến hoặc đa hình ở các gen điều hòa nhân tố cyclin-B/CDK1 và điểm kiểm soát G2 (G2-checkpoint) gây ảnh hưởng đến khả năng sửa sai phân tử DNA. Khi phân tử DNA bị tổn thương do chiếu xạ ở pha G2 thì tế bào hoạt hóa G2-checkpoint và tạm dừng chu trình để tế bào có thời gian huy động các nhân tố sửa sai DNA trước khi tế bào đến pha M. Như vậy, khi G2-checkpoint hoạt động bình thường thì hiệu quả sửa sai DNA cao nên sai hình NSTừ có thể quan sát được ở pha M sẽ giảm, do đó không phản ánh đúng hiệu quả tác động của bức xạ ion hóa. Trong khi đó, ở nhóm bệnh nhân ung thư có mang gen đột biến liên quan đến điều hòa chu trình tế bào nên biểu hiện của những gen này sẽ tác động đến G2-checkpoint ở các mức độ khác nhau làm cho sai hình NSTừ quan sát được ở pha M cũng sẽ khác biệt giữa các bệnh nhân. Để giải quyết vấn đề này, Pantelias và Terzoudi đã bổ sung caffeine (4 mM) khi nuôi cấy để tế bào không dừng ở G2-checkpoint, khi đó những tổn thương DNA do bức xạ ion hóa gây ra ở pha G2 sẽ không được sửa sai ở G2-checkpoint nên kết quả phân tích sai hình NSTừ ở pha M sẽ phản ánh đúng tác động của bức xạ ion hóa đối với từng đối tượng.

Bài báo này trình bày về quy trình kỹ thuật G2-assay và kết quả nghiên cứu thử nghiệm đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ đối với nhóm người bình thường, làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo trên đối tượng bệnh nhân ung thư với kỳ vọng nâng cao hiệu quả của phương pháp xạ trị.

Đối tượng và phương pháp

10 mẫu tế bào lympho máu ngoại vi người bình thường (8 nữ, 2 nam từ 24-52 tuổi).

Phương pháp chiếu xạ in vitro: mẫu máu được đựng trong các lọ thủy tinh trung tính (thể tích 1 ml/lọ) để chiếu xạ. Chiếu xạ in vitro bằng nguồn phát tia X (200 kV) ở các liều 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 Gy tại vị trí có suất liều khoảng 0,5 Gy/phút và đối chứng không chiếu xạ.

Nuôi cấy tế bào lympho ngoại vi toàn phần: 0,6 ml máu toàn phần được nuôi cấy trong 5,4 ml môi trường RPMI-1640 (Sigma Aldrich) có bổ sung huyết thanh, Phytohemagglutinin (Invitrogen), Kanamycine sulfate, ủ tại điều kiện 37°C và 5% CO₂. Sau 69 giờ, tiến hành ly tâm, loại bỏ môi trường, chiếu xạ mẫu tế bào với các liều được thiết kế như trên. Thể tích mỗi mẫu tế bào sau chiếu xạ được chia đôi, bổ sung lại môi trường RPMI-1640 (Sigma Aldrich), 1 phần không xử lý caffeine, 1 phần xử lý caffeine nồng độ 4 mM, ủ tế bào ở 37°C/5% CO₂ trong 20 phút, sau đó xử lý Colcemid 1 giờ trước thu hoạch. Thu hoạch tế bào và làm tiêu bản hiển vi nhuộm Giemsa.

Phân tích tiêu bản hiển vi: sử dụng kính hiển vi AXIO Imager Z2 kết hợp phần mềm Metafer 4.0 để tự động quét và chụp ảnh metaphase, phân tích xác định tần số sai hình NST từ trên hình ảnh metaphase từ các mẫu nuôi cấy.

Tính chỉ số MI (Mitotic Index %):

$$MI (\%) = \frac{\text{Số tế bào nguyên phân}}{\text{Số tế bào nguyên phân} + \text{số nhân lympho}} \times 100$$

Đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ (Individual radiosensitivity - IRS) thông qua chỉ số: $IRS = (G2/G2_{\text{caffeine}}) \times 100\%$. Nếu $IRS < 30\%$: kháng xạ; $30\% \leq IRS \leq 50\%$: bình thường; $IRS > 50\%$: nhạy xạ (Pantelias và Terzoudi, 2011).

Phương pháp xử lý số liệu: sử dụng phần mềm Excel phân tích thống kê và Sigmaplot 12.0 để vẽ đồ thị.

Kết quả

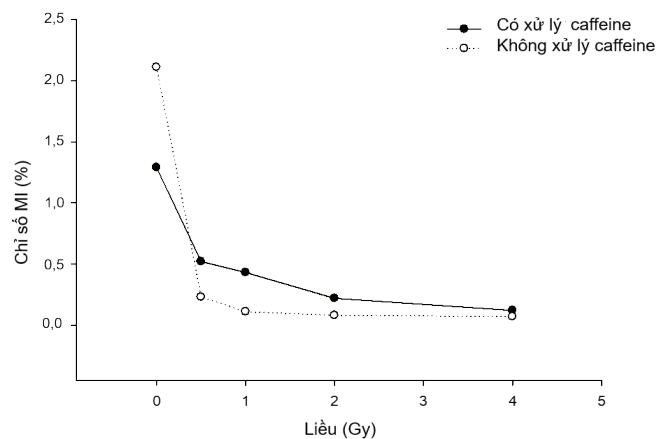
Chỉ số phân bào Mitotic Index (MI %) - Đánh giá khả năng sinh trưởng của tế bào

10 mẫu tế bào lympho máu ngoại vi toàn phần từ 10 người khỏe mạnh đã được thu thập để nuôi cấy in vitro và chiếu xạ các liều 0; 0,5; 1,0; 2,0 và 4,0 Gy, sau đó mỗi mẫu được chia làm 2 phần, 1 phần xử lý caffeine, 1 phần không xử lý caffeine. Chỉ số MI (%) ở mỗi mẫu tương ứng được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Chỉ số MI (%) của các mẫu tương ứng không và có xử lý caffeine.

Mẫu không caffeine	MI (%)					Mẫu có caffeine	MI (%)				
	0 Gy	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy		0 Gy	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy
W1	4,19	0,21	0,15	0,11	0,14	C1	2,40	1,28	1,30	0,43	0,25
W2	3,37	0,21	0,16	0,14	0,22	C2	2,63	1,19	0,88	0,68	0,42
W3	1,52	0,05	0,03	0,03	0,03	C3	1,20	0,26	0,20	0,07	0,07
W4	2,98	0,06	0,03	0,05	0,04	C4	1,32	0,26	0,16	0,09	0,06
W5	2,39	0,07	0,04	0,06	0,07	C5	1,62	0,30	0,42	0,10	0,12
W6	2,58	0,12	0,07	0,03	0,10	C6	1,06	0,51	0,37	0,12	0,10
W7	1,05	0,24	0,08	0,04	0,01	C7	0,36	0,16	0,11	0,03	0,02
W8	0,67	0,65	0,40	0,21	0,03	C8	0,44	0,23	0,19	0,35	0,03
W9	1,71	0,46	0,05	0,03	0,06	C9	1,53	0,74	0,51	0,30	0,11
W10	0,64	0,22	0,10	0,07	0,00	C10	0,37	0,29	0,16	0,04	0,01
Trung bình	2,11	0,23	0,11	0,08	0,07	Trung bình	1,29	0,52	0,43	0,22	0,12
SD	0,91	0,07	0,06	0,05	0,07	SD	0,66	0,48	0,45	0,25	0,14

Chỉ số MI trung bình khi không chiếu xạ ở các mẫu không xử lý caffeine là cao hơn ở các mẫu có xử lý caffeine (p=0,09). Còn đối với mẫu chiếu xạ thì ngược lại, khi chiếu xạ liều 0,5 và 1,0 Gy thì chỉ số MI trung bình ở các mẫu có xử lý caffeine là cao hơn ở các mẫu không xử lý caffeine (tương ứng p=0,06 và p=0,03). Khi chiếu xạ các liều 2,0 và 4,0 Gy thì chỉ số MI càng thấp và ở các mẫu có xử lý caffeine cũng có khuynh hướng cao hơn ở các mẫu không xử lý caffeine (hình 1).



Hình 1. Sự khác biệt chỉ số MI trung bình ở các mẫu có và không được xử lý caffeine khi chiếu xạ in vitro liều 0,5-4,0 Gy.

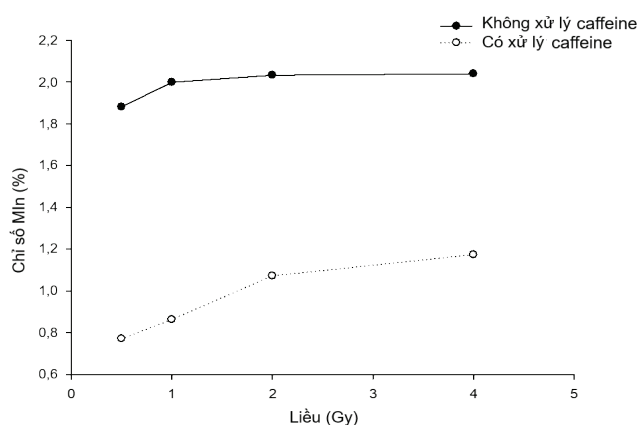
Chỉ số ức chế phân bào Mitotic Inhibition (MI_n %) - Đánh giá mức độ đáp ứng của G2-checkpoint của chu trình tế bào với bức xạ ion hóa

Chỉ số MI_n là hiệu số của chỉ số MI ở liều 0 Gy với chỉ số MI ở mỗi liều chiếu tương ứng, được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Chỉ số MIn (%) của các mẫu tương ứng không và có xử lý caffeine.

Mẫu không caffeine	MIn (%)				Mẫu có caffeine	MIn (%)			
	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy		0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy
W1	3,98	4,04	4,08	4,05	C1	1,12	1,10	1,97	2,15
W2	3,16	3,21	3,23	3,15	C2	1,44	1,75	1,95	2,21
W3	1,47	1,49	1,49	1,49	C3	0,94	1,00	1,13	1,13
W4	2,92	2,95	2,93	2,94	C4	1,06	1,16	1,23	1,26
W5	2,32	2,35	2,33	2,32	C5	1,32	1,20	1,52	1,50
W6	2,46	2,51	2,55	2,48	C6	0,55	0,69	0,94	0,96
W7	0,81	0,97	1,01	1,04	C7	0,20	0,25	0,33	0,34
W8	0,02	0,27	0,46	0,64	C8	0,21	0,25	0,09	0,41
W9	1,25	1,66	1,68	1,65	C9	0,79	1,02	1,23	1,42
W10	0,42	0,54	0,57	0,64	C10	0,08	0,21	0,33	0,36
Trung bình	1,88	2,00	2,03	2,04	Trung bình	0,77	0,86	1,07	1,17
SD	1,29	1,22	1,20	1,14	SD	0,49	0,51	0,66	0,68

Chỉ số MIn trung bình ở các mẫu không xử lý caffeine cao hơn ở các mẫu có xử lý caffeine tương ứng ($p=0,0005$). Đối với mẫu không xử lý caffeine, chỉ số MIn trung bình không khác biệt khi so sánh giữa các liều chiếu xạ khác nhau. Đối với mẫu có xử lý caffeine, chỉ số MIn trung bình càng tăng khi tăng liều chiếu, chứng tỏ mức độ đáp ứng của G2-checkpoint càng tăng, làm cho tế bào càng bị ức chế (hình 2).

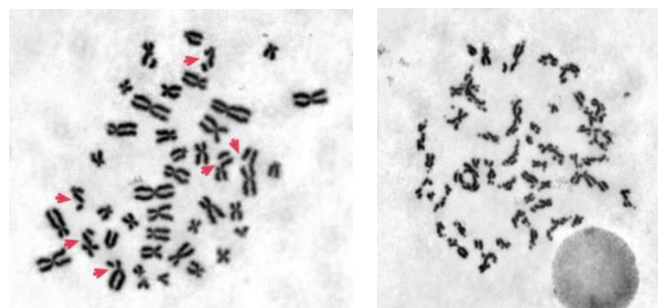


Hình 2. Khả năng đáp ứng của tế bào ở các mẫu có và không được xử lý caffeine khi chiếu xạ in vitro liều 0,5-4,0 Gy.

Sai hình dạng đứt gãy NSTừ do chiếu xạ ion hóa ở pha G2 của chu trình tế bào

Bức xạ ion hóa tác động vào tế bào đang ở pha G0 thì dạng tổn thương phân tử DNA chính được tạo ra là DSB, từ

đó hình thành các sai hình kiểu NST như mảnh NST, NST đa tâm, NST vòng..., có thể quan sát được khi tế bào ở pha M. Trong khi đó, nếu tế bào bị chiếu xạ ở pha G2, khi mà tế bào đã sinh tổng hợp và nhân đôi phân tử DNA, những tổn thương dạng DSB sẽ hình thành sai hình kiểu đứt gãy NSTừ khi quan sát tế bào ở pha M (hình 3A). Ngoài ra, khi chiếu xạ với liều cao (4,0 Gy) thì xuất hiện các tế bào có NST bị đứt gãy nghiêm trọng, có thể gọi là các “rough cell - tế bào hỗn loạn” (hình 3B).

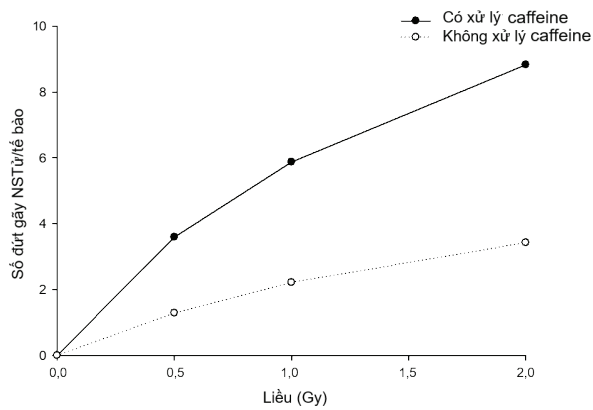


Hình 3A. Tế bào có đứt gãy NSTừ. Hình 3B. “Rough cell”.

Số đứt gãy NSTừ trung bình trong tế bào càng tăng khi tăng liều chiếu và ở mẫu có xử lý caffeine cao hơn mẫu không xử lý caffeine. Khi chiếu xạ liều 4,0 Gy thì rough cell chiếm tỷ lệ cao trong số tế bào phân tích được, số liệu và đồ thị được thể hiện ở bảng 3 và hình 4.

Bảng 3. Số đứt gãy NSTừ và rough cell (%) của các mẫu tương ứng không xử lý caffeine và có xử lý caffeine khi được chiếu xạ.

Mẫu không caffeine	Đứt gãy NSTừ/tế bào				Mẫu có caffeine	Đứt gãy NSTừ/tế bào			
	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy		0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy	4,0 Gy
W1	1,35	1,91	5,39	80,00	C1	3,15	6,05	10,76	84,00
W2	1,30	1,72	2,68	62,00	C2	3,24	4,66	6,44	62,00
W3	1,10	2,58	1,94	57,69	C3	3,04	5,64	6,32	43,86
W4	1,62	2,42	2,55	74,00	C4	4,12	6,98	8,80	74,00
W5	1,26	2,50	2,41	67,31	C5	4,08	8,48	7,64	82,00
W6	1,54	3,14	5,72	86,00	C6	3,70	6,74	12,46	82,00
W7	1,16	3,03	4,58	66,67	C7	3,82	7,00	11,81	84,21
W8	0,98	2,18	4,11	62,50	C8	2,90	4,84	8,12	52,00
W9	1,10	1,44	2,70	70,00	C9	3,58	4,46	7,78	72,00
W10	1,45	1,24	2,16	76,00	C10	4,32	3,92	8,16	86,00
Trung bình	1,29	2,22	3,42	70,22	Trung bình	3,60	5,88	8,83	72,21
SD	0,21	0,64	1,40	8,80	SD	0,50	1,43	2,14	14,85

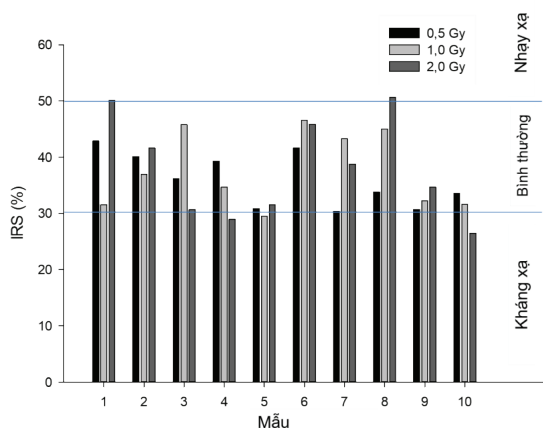


Hình 4. Biến động số đứt gãy NST/tế bào của các mẫu tương ứng không xử lý caffeine và có xử lý caffeine khi được chiếu xạ.

Chỉ số IRS (%) được xác định theo công thức $IRS = (G2/G2_{caffeine}) \times 100\%$, kết quả thể hiện trong bảng 4. Tất cả các mẫu được chiếu trong dải liều 0,5-2,0 Gy đa số có $30\% \leq IRS \leq 50\%$ (hình 5).

Bảng 4. Chỉ số IRS (%) các mẫu được chiếu trong dải liều 0,5-2,0 Gy.

Mẫu	IRS (%)		
	0,5 Gy	1,0 Gy	2,0 Gy
1	42,90	31,56	50,10
2	40,12	36,91	41,66
3	36,18	45,80	30,67
4	39,32	34,69	28,93
5	30,88	29,48	31,59
6	41,62	46,59	45,91
7	30,37	43,32	38,79
8	33,79	45,04	50,63
9	30,73	32,29	34,65
10	33,56	31,63	26,47



Hình 5. Biến động chỉ số IRS (%) các mẫu được chiếu trong dải liều 0,5-2,0 Gy.

Bàn luận

Chỉ số phân bào MI (%) phản ánh khả năng sinh trưởng và phân chia của tế bào lympho được nuôi cấy in vitro. Ở loạt mẫu không chiếu xạ, chỉ số MI (%) trung bình của các mẫu không xử lý caffeine (W) là cao hơn các mẫu có xử lý caffeine (C). Điều đó cho thấy caffeine là một yếu tố có thể ảnh hưởng đến quá trình tế bào đi vào pha M nên caffeine được thêm vào trong thời gian ngắn (20 phút). Còn ở loạt mẫu có chiếu xạ, chỉ số MI (%) trung bình của các mẫu C lại cao hơn ở các mẫu W và chỉ số này càng giảm khi tăng liều chiếu. Chỉ số MI (%) là số liệu để tính chỉ số MIn (%), qua đó đánh giá được khả năng đáp ứng của G2-checkpoint trong chu trình tế bào với bức xạ ion hóa. Trong nghiên cứu này, chỉ số MIn (%) trung bình ở các mẫu W là không khác nhau giữa các liều chiếu, còn ở các mẫu C thì chỉ số MIn (%) trung bình tăng khi tăng liều chiếu và chúng cũng thấp hơn ở các mẫu W. Qua đây cho thấy mức độ đáp ứng khác nhau của G2-checkpoint trong chu trình tế bào. Ở các mẫu W, khi được chiếu xạ ở pha G2, giá trị MIn (%) cao hơn ở các mẫu C là do ở tế bào người bình thường khi bị chiếu xạ sẽ hoạt hóa các điểm checkpoint trong chu trình tế bào, trong đó có điểm G2-checkpoint. Trong điều kiện bình thường, G2-checkpoint hoạt hóa CDC25 có chức năng ức chế CDC2 và cho phép chu trình tế bào diễn ra bình thường. Khi có tác nhân gây tổn thương phân tử DNA, để hoạt hóa CHK1 bằng ATM, Wee1 được phosphoryl hóa nhằm ức chế CDC25 làm cho không kết hợp được với CDC2, kết quả là chu trình tế bào bị dừng ở G2 [1]. Tế bào dừng ở pha G2 để thực hiện chức năng sửa sai các tổn thương ở phân tử DNA, chỉ khi phân tử DNA được phục hồi hoàn toàn thì tế bào mới tiếp tục đi vào pha M để tiếp tục được phân chia, nếu những tổn thương DNA nghiêm trọng không thể phục hồi được thì tế bào đi vào con đường chết theo chu trình (apoptosis - programmed cell death). Giá trị MIn (%) cao và giá trị MI (%) thấp ở các mẫu W khi chiếu xạ ở pha G2 cho thấy tế bào bình thường đáp ứng cao với tác động của bức xạ ion hóa, chúng hoạt hóa các cơ chế để bảo vệ tế bào, hạn chế gây tổn thương cho tế bào ở thế hệ sau. Còn ở các mẫu C, giá trị MIn (%) thấp hơn và có tăng khi tăng liều chiếu xạ, đồng thời giá trị MI (%) cũng cao hơn các mẫu W, điều này được giải thích là do caffeine là một yếu tố làm giảm khả năng hoạt động của G2-checkpoint, làm cho các tế bào bị tổn thương do bức xạ ở pha G2 tiếp tục đi vào pha M để phân chia. Do đó, việc sử dụng caffeine là một yếu tố để ức chế G2-checkpoint, giúp đánh giá được khả năng đáp ứng của tế bào khi chiếu xạ ở pha G2, đồng thời phân tích mức độ tổn thương của tế bào với chỉ thị sai hình NSTừ có thể đánh giá được độ nhạy cảm phóng xạ của tế bào [7].

Phân tích tối thiểu 100 metaphase đối với mỗi mẫu ở mỗi liều chiếu để xác định số lượng sai hình NSTừ. Đối với các mẫu không chiếu xạ, tần số sai hình NSTừ không

khác biệt so với kết quả nghiên cứu về sai hình NST từ ngẫu nhiên trong dân chúng mà phòng thí nghiệm đã thực hiện trước đây [8]. Trong dải liều 0,5-2,0 Gy, số đứt gãy NST từ trung bình trong tế bào càng tăng khi tăng liều chiếu cho thấy khả năng gây tổn thương DSB có tương quan với liều lượng bức xạ. Khi chiếu xạ liều 4,0 Gy là liều tương đối cao đã gây ra những tổn thương nghiêm trọng cho tế bào mà có thể quan sát được dưới dạng các “rough cell” nên rất khó để định lượng được số đứt gãy NST từ, tỷ lệ “rough cell” ở các mẫu W và C phân tích được là tương đương nhau. Như vậy, để nghiên cứu độ nhạy cảm phóng xạ ở tế bào lympho máu ngoại vi thì dải liều thích hợp có thể sử dụng là $\leq 2,0$ Gy, trong đó có thể xem xét sử dụng liều 2,0 Gy vì mức liều này cũng phù hợp với liều SF₂ trong nghiên cứu tỷ lệ sống sót in vitro có thể dự đoán đáp ứng của khối u khi chiếu xạ in vivo [2]. Khi chiếu xạ các mẫu với liều 0,5; 1,0 và 2,0 Gy khi tế bào ở pha G2 ta thấy, số đứt gãy NST từ trung bình trong tế bào ở nhóm mẫu C là cao hơn ở nhóm mẫu W, điều này cũng cho thấy khả năng đáp ứng của G2-checkpoint với bức xạ. Với nhóm mẫu W, vì không xử lý caffeine nên G2-checkpoint vẫn hoạt động với chức năng dừng chu trình để tế bào sửa chữa, giảm thiểu tổn thương DNA trước khi chuyển qua pha M nên số đứt gãy NST từ trung bình trong tế bào ở nhóm này là thấp hơn. Với nhóm mẫu C, caffeine đã gây ức chế G2-checkpoint nên tế bào không dừng ở G2 để sửa sai trước khi đến pha M, do vậy số đứt gãy NST từ trung bình trong tế bào ở nhóm này cao hơn. Để hạn chế khác biệt liên quan đến sự điều hòa chu trình tế bào ở G2-checkpoint, chỉ số IRS (%) đã được sử dụng [7]. 10 mẫu được chiếu trong dải liều 0,5-2,0 Gy thì đa số có $30\% \leq \text{IRS} \leq 50\%$, cho thấy độ nhạy cảm phóng xạ nằm trong khoảng bình thường. Để đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ dựa vào chỉ số IRS (%), Pantelias và Terzoudi [7] đã nghiên cứu nhóm đối tượng gồm 78 người bình thường và 6 bệnh nhân AT (Ataxia Telangiectasia), trong đó bệnh nhân AT là đối tượng mất khả năng điều hòa dừng chu trình tế bào ở pha G2 khi có tác động của bức xạ ion hóa. Chỉ số IRS (%) của nhóm người bình thường tuân theo luật phân bố chuẩn với giá trị trung bình $\text{MV}=40,1\%$ và độ lệch chuẩn $\text{SD}=9,8\%$. Dựa trên các giá trị này, độ nhạy cảm phóng xạ cá nhân được phân loại gồm $\text{IRS} < \text{MV} - \text{SD}$ là kháng xạ, $\text{IRS} > \text{MV} + \text{SD}$ là nhạy xạ và $\text{MV} - \text{SD} \leq \text{IRS} \leq \text{MV} + \text{SD}$ là bình thường. Với cách phân loại như vậy, nghiên cứu đã chỉ ra trong nhóm người bình thường có 6/78 người nhạy xạ ($\text{IRS} > 50\%$), 8/78 người kháng xạ ($\text{IRS} < 30\%$) và 64/78 người bình thường ($30\% \leq \text{IRS} \leq 50\%$), trong khi đó tất cả 6 bệnh nhân AT đều có $\text{IRS} > 70\%$ thể hiện rất nhạy xạ. Trong nhóm người bình thường mà chúng tôi nghiên cứu thì kết quả cho thấy độ nhạy cảm phóng xạ cũng ở mức bình thường, phù hợp với sự phân loại như trên. Nghiên cứu tiếp theo sẽ thực hiện trên đối tượng bệnh nhân ung thư, điển hình là bệnh nhân ung thư vú trước xạ trị nhằm đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ, giúp nâng cao hiệu quả điều trị cho bệnh nhân.

Kết luận

Kỹ thuật phân tích sai hình NST do bức xạ ion hóa làm tổn thương phân tử DNA ở pha G2 của chu trình tế bào kết hợp với xử lý caffeine là kỹ thuật tiềm năng sử dụng để đánh giá độ nhạy cảm phóng xạ nội tại của tế bào. Mở rộng ứng dụng kỹ thuật này nói riêng và các kỹ thuật phân tích tế bào nói chung là cần thiết để phát triển các công cụ thích hợp nhằm đánh giá, dự đoán độ nhạy cảm phóng xạ, qua đó nâng cao được hiệu quả trong chiến lược cá nhân hóa điều trị cho bệnh nhân.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các đồng nghiệp trong quá trình thực hiện các thí nghiệm tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân. Nghiên cứu này được thực hiện từ sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.R. Cuddihy, M.J. O’Connell (2003), “Cell-cycle responses to DNA damage in G2”, *International Review of Cytology*, **222**, pp.99-140.
- [2] IAEA-TECDOC-1297 (2002), *Predictive assays and their role in selection of radiation as the therapeutic modality*, IAEA, VIENNA.
- [3] I. Turesson, J. Nyman, E. Holmberg, A. Odén (1996), “Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients”, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **36**, pp.1065-1075.
- [4] W. Dorr (1998), “Radiobiological models of normal tissue reactions”, *Strahlentherapie und Onkologie*, **174**, pp.4-7.
- [5] K. Baria, C. Warren, S. Roberts, C.M. West, D. Scott (2001), “Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers?”, *British Journal of Cancer*, **84**, pp.892-896.
- [6] T. Poggioli, S. Sterpone, S. Palma, R. Cozzi, A. Testa (2010), “G0 and G2 chromosomal assays in the evaluation of radiosensitivity in a cohort of Italian breast cancer patients”, *Journal of Radiation Research*, **51**, pp.615-619.
- [7] G.E. Pantelias, G.I. Terzoudi (2011), “A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity”, *Radiotherapy and Oncology*, **101**, pp.28-34.
- [8] N.D. Pham, M.H. Nguyen, Q. Tran, Q.T. Che, V.H. Nguyen, V.T. Phan, V.D. Pham, S.E. Lee, T.L.T. Vo (2018), “Determination of spontaneous dicentric frequencies and establishment of dose-response curves after expose of human peripheral blood lymphocytes to low and high dose rate ⁶⁰Co gamma rays - The basis for cytogenetic biodosimetry in Vietnam”, *International Journal of Radiation Biology*, **95**, pp.307-313.

Chế tạo nano berberin và đánh giá khả năng kháng nấm *Candida albicans*

Nguyễn Hữu Tuyền^{1*}, Phan Thị Kim Ngân¹, Mai Ngọc Tuấn Anh¹, Hoàng Thùy Dương¹, Lâm Hoàng Anh Thu¹, Phạm Tiến Dũng¹, Phạm Thanh Hồng², Ngô Võ Kế Thành¹

¹Trung tâm Nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Văn Lang

Ngày nhận bài 2/3/2020; ngày chuyển phân biên 5/3/2020; ngày nhận phân biên 3/4/2020; ngày chấp nhận đăng 20/4/2020

Tóm tắt:

Berberin là một alkaloid thực vật có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, kháng ung thư, hạ đường huyết... Tuy nhiên, việc ứng dụng berberin trong dược phẩm vẫn còn hạn chế do ít tan trong nước và sinh khả dụng thấp. Trong nghiên cứu này, nhằm cải thiện sinh khả dụng và tăng tiềm năng ứng dụng của berberin trong dược phẩm; nano berberin được tạo ra bằng phương pháp nghiền quay với sự hỗ trợ của bi Zirconium. Tính chất hạt nano berberin tạo ra được khảo sát bằng phương pháp chụp FE-SEEM, TEM, DLS và XRD. Hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* được đánh giá trong điều kiện invitro. Kết quả cho thấy, nano berberin được tạo ra với kích thước hạt trung bình khoảng 60 nm sau 120 giờ nghiền quay và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) ghi nhận đối với nấm *Candida albicans* là 1024 µg/ml.

Từ khóa: berberin, *Candida albicans*, kháng sinh thực vật, phương pháp nghiền quay.

Chỉ số phân loại: 3.4

Fabrication of berberine nanoparticles and evaluation of antifungal activity on *Candida albicans*

Huu Tuyen Nguyen^{1*}, Thi Kim Ngan Phan¹, Ngoc Tuan Anh Mai¹, Thuy Duong Hoang¹, Hoang Anh Thu Lam¹, Tien Dung Pham¹, Thanh Hong Pham², Vo Ke Thanh Ngo¹

¹Saigon Hi-Tech Park Research Laboratories

²Van Lang University

Received 2 March 2020; accepted 20 April 2020

Abstract:

Berberine is a plant alkaloid with antibacterial, anti-inflammatory, anti-cancer, and hypolipidemic activities, etc. However, the application of berberine in pharmaceuticals has still limited due to its less solubility in water and poor bioavailability. In this study, to improve the bioavailability and increase the potential application of berberine in medicine, berberine nanoparticles were fabricated by roll milling method with the support of zirconium balls. The characterisation of berberine nanoparticles was evaluated by Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and X-ray Diffraction (XRD). The anti-*Candida albicans* activity was tested in-vitro. The results showed that the average particle size of berberine nanoparticles was about 60 nm after 120 hours roll milling and the minimal inhibitory concentration on *Candida albicans* was 1024 µg/ml.

Keywords: berberine, *Candida albicans*, plant antibiotics, roll milling method.

Classification number: 3.4

Đặt vấn đề

Ngày nay, bên cạnh việc nghiên cứu sử dụng các dược chất có nguồn gốc hóa tổng hợp thì việc nghiên cứu sử dụng các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên ngày càng được

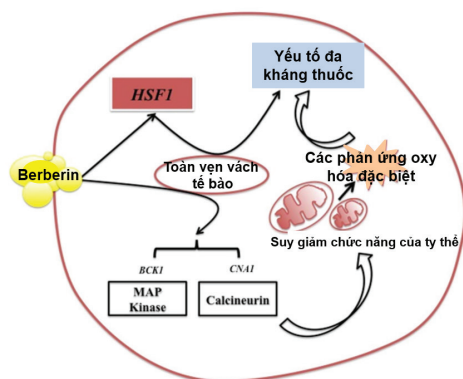
các nhà khoa học quan tâm. Berberin là một alkaloid thuộc nhóm isoquinoline có thể được chiết xuất dễ dàng từ thực vật hay tổng hợp hóa học. Trong tự nhiên, berberin được chiết xuất từ các loại cây thuộc chi *Berberis*, *Hydrastis canadensis*,

*Tác giả liên hệ: Email: tuyen.nguyenhuu@shtplabs.org

Coptis với hàm lượng khoảng 1,5-3% [1]. Berberin đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền, thường được dùng nhiều để trị các bệnh đường ruột, bệnh gan mật, bệnh ngoài da... Berberin đã thu hút được sự chú ý trong những năm gần đây do có tác dụng dược lý như chống ung thư, kháng virus, kháng khuẩn và chống viêm [2, 3]. Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng berberin bị hạn chế trong sử dụng lâm sàng do ít tan trong nước, khó hấp thu qua ruột và đặc biệt tính sinh khả dụng rất thấp (chỉ khoảng 5%) [4]. Hướng nghiên cứu bào chế berberin thành dạng kích thước nano có thể cải thiện độ tan, tốc độ hòa tan, từ đó nâng cao sinh khả dụng là hướng đi được quan tâm nghiên cứu hiện nay.

Trong dược liệu, có 2 phương pháp chính để tạo hạt nano thuốc: phương pháp từ dưới lên (bottom-up) và phương pháp từ trên xuống (top-down). Phương pháp bottom-up ít được sử dụng vì cần phải hòa tan dược liệu trong dung môi hữu cơ và khó phân bố được ở kích thước hẹp. Phương pháp top-down được sử dụng phổ biến hơn với các kỹ thuật như nghiền bi, đồng nhất hóa, đồng nhất hóa áp suất cao. Trong đó, kỹ thuật nghiền bi có nhiều ưu điểm như nghiền được hạt có kích thước tiểu phân bé, duy trì trạng thái vô khuẩn của nguyên liệu [5]. Đã có nhiều nghiên cứu chế tạo nano berberin với nhiều phương pháp khác nhau như: gắn berberin trên nano polymer, trên silica từ tính, trên lipid, gắn vào các dendrimer, graphene hay trên các nano vàng, nano bạc... [3] nhằm giúp tăng khả năng phân tán của chúng, tạo điều kiện cho cơ thể hấp thụ tốt hoạt chất berberin để phát huy hết tác dụng dược lý của chúng.

Candida albicans là mầm bệnh nấm cơ hội, đặc biệt quan sát thấy ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch. *Candida albicans* chiếm 50-70% các trường hợp nhiễm nấm candida xâm lấn trong phần lớn các cơ sở lâm sàng [6]. Đối với *Candida albicans*, berberin tác động và làm suy giảm chức năng của ty thể, tạo các phản ứng oxy hóa đặc biệt, ảnh hưởng đến con đường toàn vẹn vách tế bào và các yếu tố phiên mã sức nhiệt HSF1 [7, 8], từ đó ức chế và tiêu diệt nấm (hình 1).



Hình 1. Các con đường tác động của berberin đến *Candida albicans* [8].

Đã có nhiều nghiên cứu được công bố với tiềm năng lớn của berberin trong việc kiểm soát và điều trị bệnh viêm nhiễm do *Candida albicans* gây ra [6, 7, 9]. Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm tạo sản phẩm berberin ở kích thước nano và đánh giá hiệu quả ức chế nấm *Candida albicans*, kết quả của nghiên cứu là tiền đề cho quá trình tạo các sản phẩm thương mại ứng dụng trong phòng và điều trị bệnh do nấm *Candida albicans* gây ra.

Đối tượng và phương pháp

Vật liệu

Nấm *Candida albicans* - thu nhận từ mẫu bệnh phẩm được cung cấp bởi Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh. Môi trường sử dụng nuôi cấy chủng nấm - Sabouraud: D-glucose 40 g, peptone 10 g, agar 20 g, nước cất vừa đủ 1 lít. Chính về pH 6,2.

Berberin 95% chuẩn dược phẩm được cung cấp bởi Công ty Cổ phần dược phẩm Vĩnh Kim - số 186 Định Công Hạ (Định Công, Hoàng Mai, Hà Nội).

Bi Zirconium: kích thước hạt 0,4-0,6 mm, 95% ZrO_2 , 5% Y_2O_5 . Độ cứng 1000 Hv. Tỷ lệ hạt cầu 95%.

Phương pháp chế tạo nano berberin

Nano berberin được chế tạo bằng phương pháp nghiền quay với bi Zirconium. Chuẩn bị hỗn dịch với 2,4 g berberin; 0,6 g tween 80; 3 g etanol tuyệt đối và nước cất vô trùng vừa đủ 60 g tổng khối lượng. Cho tiếp 120 g bi Zirconium vào lọ và đặt trên máy quay trục lăn ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 120 giờ. Mẫu được lọc loại bi và thu được hỗn dịch chứa berberin ở kích thước nano. Thu nhận nano berberin dạng bột bằng cách đông khô trong 48 giờ ở $-55^\circ C$ trong điều kiện chân không.

Phương pháp phân tích mẫu nano berberin

Các mẫu nano berberin được phân tích bằng phương pháp chụp ảnh FE-SEM (Hitachi S-4800, Nhật Bản) và TEM (JEM-1400, Nhật Bản): thực hiện bằng cách nhỏ giọt mẫu lưới đồng đường kính 3 mm, để khô ở nhiệt độ phòng và tiến hành phân tích ở điện thế 10 kV với FE-SEM và 100 kV với TEM.

Phương pháp DLS (Horiba SZ-100, Nhật Bản): trong phương pháp này, mẫu được pha loãng trong dung môi là nước và tiến hành phân tích ở góc 90° .

Mẫu bột nano berberin sau khi đông khô được phân tích XRD (Bruker D8-Advance, Đức) ở góc quét từ 4-40°.

Phương pháp xác định hàm lượng berberin trong mẫu nano berberin

Dụng cụ chuẩn berberin: cân 10 mg bột nguyên liệu berberin (chuẩn HPLC - Sigma) hòa tan hoàn toàn trong 10 ml metanol. Từ dung dịch trên tiến hành pha loãng ra các nồng độ ở 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml và 0,025 mg/ml. Đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn tại bước sóng cực đại 430 nm với mẫu trắng là metanol, sử dụng cuvet thạch anh với độ dày 1 cm.

Đo nồng độ berberin trong mẫu nano berberin: hòa tan hoàn toàn lượng bột nano berberin sau đông khô trong 10 ml metanol. Lấy 1 ml dung dịch trên pha loãng trong 19 ml metanol (pha loãng 20 lần). Tiến hành đo độ hấp thụ của dung dịch nano berberin tương tự như dung dịch chuẩn.

Tính toán nồng độ berberin trong mẫu nano berberin sau khi đông khô:

$$C_{nano} = C_{mẫu đo} \times a$$

Trong đó: C_{nano} là nồng độ berberin trong mẫu nano berberin sau đông khô (mg/ml); $C_{mẫu đo}$ là nồng độ berberin trong mẫu đo tính được từ phương trình đường chuẩn berberin HPLC; a là hệ số pha loãng trong quá trình đo (a=20).

Tính toán hiệu suất thu nhận berberin từ mẫu nano berberin:

$$H = \frac{C_{nano}}{C_{nguyên liệu}} \times 100\%$$

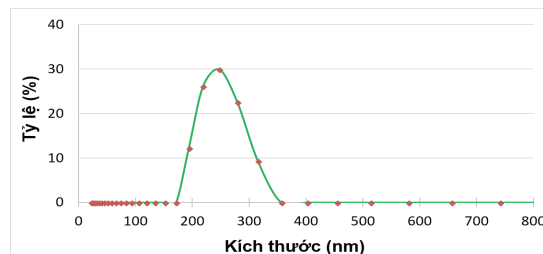
Trong đó: $C_{nguyên liệu}$ là nồng độ berberin ban đầu trước khi nghiền quay.

Phương pháp đánh giá khả năng kháng nấm Candida albicans

Khả năng kháng nấm *Candida albicans* của dung dịch nano berberin được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Chủng nấm bệnh được trải đều trên đĩa Sabouraud với nồng độ 10^6 cfu/ml. Dùng ống đục vô trùng (đường kính 5 mm) đục tạo các giếng trên đĩa (5 giếng/đĩa). Hút 100 µl dịch nano berberin ở các nồng độ 512 µg/ml, 1024 µg/ml, 2048 µg/ml, 4096 µg/ml và 8192 µg/ml cho vào giếng với đối chứng âm là nước cất vô trùng và đối chứng dương là nystatin 200 µg/ml.

Kết quả và thảo luận

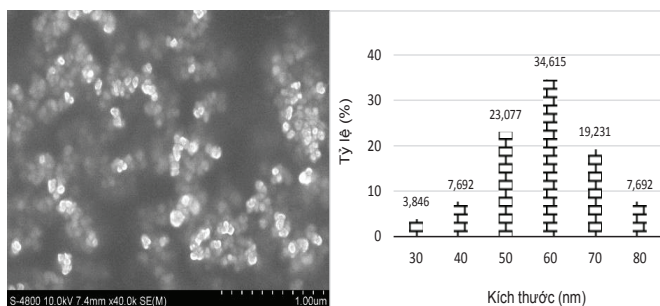
Chế tạo nano berberin



Hình 2. Kết quả DLS của mẫu nano berberin.

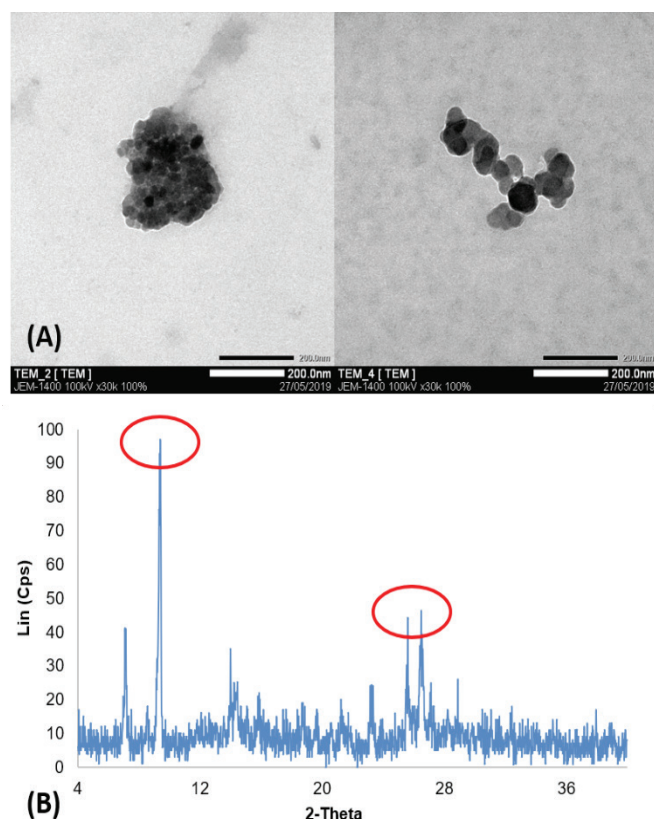
Kết quả DLS cho thấy ở nồng độ 4% berberin, quá trình va chạm với bi Zirconium tạo ra các hạt chủ yếu phân bố trong khoảng 180-300 nm (hình 2). Tiếp tục phân tích mẫu bằng phương pháp chụp FE-SEEM cho thấy kích thước hạt nano chủ yếu trong khoảng 50-70 nm (hình 3). Kích thước hạt nano berberin được ghi nhận trong phân tích DLS và FE-SEEM có sự khác biệt. Lý giải cho việc này là do phương pháp DLS thực hiện đo trong dung dịch và các hạt có kích thước khoảng 60 nm kết tụ lại với nhau tạo thành khối với kích thước khoảng 300 nm. Trong khi đó ở phương pháp FE-SEM, mẫu được sấy khô nên có thể quan sát được các hạt nano nhỏ trong khối kết tụ và có thể quan sát được các hạt nano rời.

Kết quả cho thấy, đã chế tạo thành công mẫu nano berberin với hàm lượng berberin ban đầu là 4%. So với một số nghiên cứu khác, phương pháp nghiền quay trong nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy hiệu quả tốt hơn trong quá trình tạo hạt berberin kích thước nano. Năm 2018, Sahibzada và cộng sự đã bào chế nano berberin bằng 2 phương pháp kết tủa bay hơi dung môi (EPN) và kết tủa bằng thay đổi dung môi (APSP). Kết quả cho thấy hạt nano berberin có kích thước tiểu phân là 71,53 và 102,62 nm (lần lượt đối với phương pháp EPN và APSP) [10]. Năm 2015, Wang và cộng sự sử dụng phương pháp đồng nhất hóa áp suất cao đã tạo được hạt nano berberin với kích thước trung bình khoảng 72,4 nm [11].



Hình 3. Kết quả FE-SEEM và đồ thị sự phân bố kích thước hạt của mẫu nano berberin.

Tiếp tục phân tích ảnh TEM (hình 4A), một lần nữa khẳng định kích thước hạt nano berberin ghi nhận trong phân tích DLS lớn là do chúng kết tụ lại với nhau. Kết quả đo XRD của mẫu (hình 4B) cho thấy xuất hiện peak có cường độ mạnh trong khoảng 9,5° và các peak có cường độ yếu hơn trong khoảng 25,5° và 26,5°. Kết quả này cho thấy mẫu nano berberin có cấu trúc tinh thể, điều này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Sahibzada và cộng sự [10]; Zou và cộng sự [12].



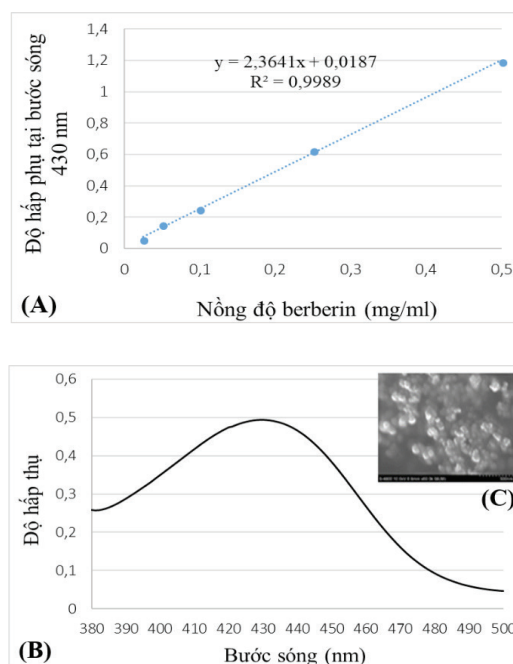
Hình 4. Kết quả chụp TEM (A) và giản đồ XRD (B) của mẫu nano berberin.

Hàm lượng berberin trong mẫu nano berberin

Phổ UV-Vis của mẫu nano berberin sau khi đông khô hòa tan lại trong metanol cho thấy sự hiện diện của đỉnh (peak) đặc trưng của berberin tại bước sóng 430 nm với độ hấp thụ là 0,49437 (hình 5B). Dựa vào phương trình nồng độ đường chuẩn của berberin chuẩn HPLC (hình 5A) suy ra hàm lượng berberin trong mẫu nano berberin đạt 1,1874 mg/ml trong mẫu đo (tương đương 23,748 mg/ml trong mẫu sau đông khô). So với ban đầu chế tạo từ nguyên liệu thô 4%, hiệu suất berberin có trong mẫu nano sau đông khô đạt 59,37%.

Mặt khác, ảnh FE-SEM ở hình 5C, được thực hiện bằng

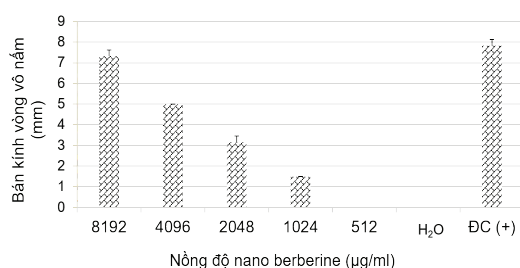
cách đo trực tiếp bột trên lưới đồng cho thấy trong mẫu bột sau khi đông khô vẫn tồn tại các hạt có kích thước khoảng 60 nm với hình dạng rõ ràng.



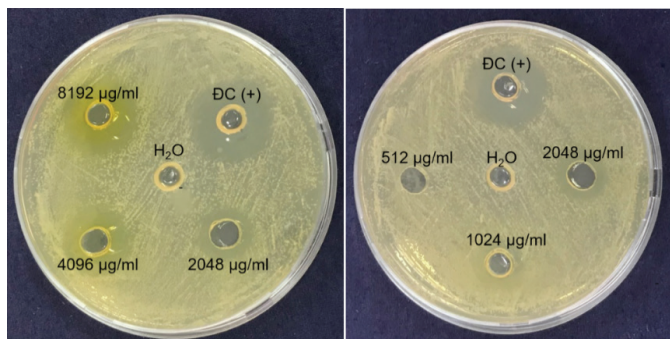
Hình 5. Mối tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ của dung dịch berberin chuẩn (A); phổ UV-Vis của mẫu nano berberin trong metanol (B) và ảnh FE-SEM bột nano berberin sau khi đông khô (C).

Hoạt tính kháng *Candida albicans* của mẫu nano berberin

Cơ chế tác động và giết chết tế bào nấm *Candida albicans* của berberin là làm suy giảm chức năng của ty thể, tạo các phản ứng oxy hóa tái hoạt hóa, ảnh hưởng đến con đường toàn vẹn vách tế bào và các yếu tố phiên mã sốc nhiệt HSF1 [7, 8]. Hạt nano berberin được bào chế trong nghiên cứu của Sahibzada và cộng sự đã ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm [10]. Ngoài ra, quá trình tạo hạt nano berberin còn được nhiều nhà nghiên cứu ứng dụng trong việc tạo các hệ thuốc ức chế phát triển của khối u [13], trong quá trình điều trị tiểu đường [14]... Hoạt tính và cơ chế kháng nấm *Candida albicans* của berberin và nano berberin đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu và công bố [6, 9, 15]. Trong nghiên cứu này, nano berberin cũng đã ghi nhận được hoạt tính kháng nấm *Candida albicans*. Kết quả cho thấy hoạt tính kháng nấm của nano berberin giảm dần theo nồng độ. Điều đó được thể hiện qua bán kính vòng vô nấm giảm từ $7 \pm 0,29$ mm ở nồng độ 8192 $\mu\text{g/ml}$ xuống $1,5 \pm 0,00$ mm ở nồng độ 1024 $\mu\text{g/ml}$. Ở nồng độ thấp (512 $\mu\text{g/ml}$) không ghi nhận vòng vô nấm. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được ghi nhận ở 1024 $\mu\text{g/ml}$ (hình 6 và 7).



Hình 6. Hoạt tính kháng nấm của nano berberin ở các nồng độ.



Hình 7. Vòng vô nấm trên đĩa môi trường thạch sabouraud.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chế tạo thành công nano berberin bằng phương pháp nghiền quay với bi Zirconium. Kết quả kiểm tra bằng các phân tích DLS, FE-SEM, TEM và XRD cho thấy hạt nano tạo ra có kích thước trung bình khoảng 60 nm. Kiểm tra hoạt tính sinh học cho thấy nano berberin ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Candida albicans* với giá trị MIC ghi nhận tại nồng độ 1024 µg/ml. Dịch nano berberin tạo ra trong nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng tạo các sản phẩm sử dụng trong phòng và trị bệnh do nấm *Candida albicans* gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Q. Hou, W.J. He, Y.S. Wu, H.J. Hao, X.Y. Xie, and X.B. Fu (2019), "Berberine: A traditional natural product with novel biological activities", *Altern. Ther. Health. Med.*, PMID: 31634873.
- [2] A.H. Amin, T.V. Subbaiah, and K.M. Abbasi (1969), "Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action", *Can. J. Microbiol.*, **15**(9), pp.1067-1076.
- [3] E. Mirhadi, M. Rezaee, and B. Malaekheh-Nikouei (2018), "Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of Berberis", *Biomed. Pharmacother.*, **104**, pp.465-473.
- [4] Z. Wang, Y.S. Wang, Z.M. Chang, L. Li, Y. Zhang, M.M. Lu, X. Zheng, M. Li, D. Shao, J. Li, L. Chen, and W.F. Dong (2017), "Berberine-loaded Janus nanocarriers for magnetic field-enhanced therapy against hepatocellular carcinoma", *Chem. Biol. Drug Des.*, **89**(3), pp.464-469.

[5] V. Nekkanti, V. Venkateswarlu, and R. Pillai (2012), *Drug Nanoparticles - An Overview*, p.111-132.

[6] N. Zorić, I. Kosalec, S. Tomić, I. Bobnjarić, M. Jug, T. Vlanić, and J. Vlanić (2017), "Membrane of *Candida albicans* as a target of berberine", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **17**(1), DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1773-5>.

[7] P. Lam, S.H.L. Kok, K.K.H. Lee, K.H. Lam, D.K.P. Hau, W.Y. Wong, Z. Bian, R. Gambari, and C.H. Chui (2016), "Sensitization of *Candida albicans* to terbinafine by berberine and berberrubine", *Biomedical Reports*, **4**(4), pp.449-452.

[8] S. Dhamgaye, F. Devaux, P. Vandeputte, N.K. Khandelwal, D. Sanglard, G. Mukhopadhyay, and R. Prasad (2014), "Molecular mechanisms of action of herbal antifungal alkaloid berberine, in *Candida albicans*", *PLoS One*, **9**(8), pe.104554.

[9] Y. ZhaoDan, D. Yan, J.-B. Wang, P. Zhang, and X. Xiao (2010), "Antifungal effect of berberine on *Candida albicans* by microcalorimetry with correspondence analysis", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **102**, pp.49-55.

[10] M.U.K. Sahibzada, A. Sadiq, H.S. Faidah, M. Khurram, M.U. Amin, A. Haseeb, and M. Kakar (2018), "Berberine nanoparticles with enhanced in vitro bioavailability: characterization and antimicrobial activity", *Drug Design, Development and Therapy*, **12**, p.303.

[11] Z. Wang, J. Wu, Q. Zhou, Y. Wang, and T. Chen (2015), "Berberine nanosuspension enhances hypoglycemic efficacy on streptozotocin induced diabetic C57BL/6 mice", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID: 239749.

[12] Q. Zou, Y. Li, L. Zhang, Y. Zuo, J. Li, and J. Li (2009), "Antibiotic delivery system using nano-hydroxyapatite/chitosan bone cement consisting of berberine", *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and The Korean Society for Biomaterials*, **89**(4), pp.1108-1117.

[13] Y.-C. Lin, J.-Y. Kuo, C.-C. Hsu, W.-C. Tsai, W.-C. Li, M.-C. Yu, and H.-W. Wen (2013), "Optimizing manufacture of liposomal berberine with evaluation of its antihepatoma effects in a murine xenograft model", *International Journal of Pharmaceutics*, **441**(1-2), pp.381-388.

[14] T. Wang, N. Wang, H. Song, X. Xi, J. Wang, A. Hao, and T. Li (2011), "Preparation of an anhydrous reverse micelle delivery system to enhance oral bioavailability and anti-diabetic efficacy of berberine", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **44**(1-2), pp.127-135.

[15] R. Iwazaki, E. Endo, T. Ueda-Nakamura, C. Nakamura, L. Garcia, and B. Filho (2010), "In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole", *Antonie Van Leeuwenhoek*, **97**, pp.201-205.

Phân tích thực trạng tuân thủ quy trình giám sát trị liệu áp dụng cho phác đồ methotrexat liều cao tại Bệnh viện K

Vũ Minh Hà¹, Nguyễn Thị Thanh Minh², Nguyễn Thị Hồng Hạnh¹,
Đương Khánh Linh¹, Nguyễn Thị Liên Hương^{1*}

¹Trường Đại học Dược Hà Nội

²Bệnh viện K Tân Triều

Ngày nhận bài 20/3/2020; ngày chuyển phản biện 23/3/2020; ngày nhận phản biện 19/4/2020; ngày chấp nhận đăng 4/5/2020

Tóm tắt:

Methotrexat (MTX) là thuốc điều trị ung thư nằm trong danh mục thuốc thiết yếu của Tổ chức Y tế thế giới. Phác đồ MTX liều cao (High dose MTX - HDMTX) kèm giải cứu bằng leucovorin thường xuyên được sử dụng tại Bệnh viện K Tân Triều. Để đảm bảo tính hiệu quả và an toàn trong sử dụng MTX, quy trình giám sát trị liệu (therapeutic drug monitoring - TDM) cho HDMTX đã được bộ phận Dược lâm sàng tại Bệnh viện K xây dựng và được Giám đốc Bệnh viện phê duyệt vào tháng 11/2018.

Mục tiêu của nghiên cứu này là phân tích mức độ tuân thủ TDM trong thực hành lâm sàng thường quy tại Bệnh viện K. Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7/2019 đến tháng 2/2020. Tổng cộng có 174 chu kỳ HDMTX, bao gồm các chu kỳ điều trị u lympho không Hodgkin (66,7%), ung thư xương (30,4%) và bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (2,9%) đã được đưa vào nghiên cứu, trong đó 137 chu kỳ dùng phác đồ HDMTX truyền trong 4 h và 37 chu kỳ dùng phác đồ HDMTX truyền trong 24 h. Kết quả cho thấy, không có chu kỳ nào tuân thủ đầy đủ các bước trong quy trình TDM. Phân tích sự tuân thủ trên từng khía cạnh của quy trình, tỷ lệ tuân thủ là: 47,1% cho đánh giá bệnh nhân trước truyền, 14,9% cho quy trình bù dịch và kiểm hóa nước tiểu, 58,6% cho định lượng MTX và 19,0% cho quy trình giải cứu bằng leucovorin. Từ thực trạng tuân thủ quy trình TDM áp dụng cho HDMTX tại Bệnh viện K còn thấp, cần có thêm những nghiên cứu khác để tìm ra lý do, những khó khăn trong việc tuân thủ quy trình hoặc các biến cố bất lợi xảy ra trên bệnh nhân khi không tuân thủ quy trình TDM để có thể cải thiện chất lượng sử dụng thuốc HDMTX tại Bệnh viện.

Từ khóa: giải cứu leucovorin, giám sát trị liệu, methotrexat liều cao.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

MTX là thuốc điều trị ung thư nằm trong danh mục thuốc thiết yếu của Tổ chức Y tế thế giới. MTX ức chế quá trình chuyển hóa acid folic thành acid tetrahydrofolic, có vai trò trong quá trình tổng hợp ADN của tế bào và từ đó ức chế hình thành tế bào mới. Các mô đang có quá trình tăng sinh mạnh như các tế bào ung thư, tủy xương, tế bào bào thai, biểu mô và niêm mạc đường tiêu hóa thường nhạy cảm nhất với MTX. HDMTX là dùng MTX với liều ≥ 1000 mg/m² (1 g/m²) [1]. Với liều cao này, MTX có thể đạt nồng độ điều trị trong dịch não tủy và được sử dụng để dự phòng thâm nhiễm thần kinh trung ương trong điều trị cả khối u ác tính và huyết học, bao gồm ung thư xương, vú, phổi, dạ dày, bàng quang, ung thư đầu và cổ, cũng như bệnh bạch cầu cấp dòng lympho và u lympho không Hodgkin. Tuy nhiên, khi sử dụng liều cao, nguy cơ độc tính của MTX cũng gia tăng, bao gồm nhiễm độc thận, nhiễm độc gan, viêm niêm mạc đường tiêu hóa, ức chế tủy xương và nhiễm độc thần kinh, dẫn đến việc ngừng điều trị, tổn thương các cơ quan không

hồi phục, thậm chí tử vong [2].

Sau khi dùng, 90% MTX được thải trừ qua nước tiểu ở dạng chưa chuyển hóa; do đó, chức năng thận của bệnh nhân có vai trò quan trọng trong thải trừ MTX. Độ hòa tan của MTX và chất chuyển hóa phụ thuộc vào pH nước tiểu. MTX kết tinh trong nước tiểu có tính acid (pH 5,5) có thể dẫn đến tắc nghẽn ống thận, tổn thương độc hại trực tiếp đến biểu mô ống thận và giảm tưới máu do co động mạch chủ. Độc tính trên thận dẫn đến suy giảm độ thanh thải MTX và kéo dài thời gian phơi nhiễm thuốc ở nồng độ gây độc. pH nước tiểu tăng từ 6,0 lên 7,0 làm tăng độ hòa tan của MTX và các chất chuyển hóa lên 5-8 lần, đây chính là một phát hiện làm cơ sở cho khuyến cáo bù dịch và kiểm hóa nước tiểu trước, trong và sau khi dùng HDMTX [1].

Tác dụng độc tế bào của MTX có thể được đối kháng một phần bởi leucovorin - một chất tương tự acid folic. Leucovorin được chỉ định sử dụng như một liệu pháp giải cứu sau khi sử dụng HDMTX do có thể hoạt động như chất

*Tác giả liên hệ: Email: huongntl@hup.edu.vn

Compliance with the hospital protocol of therapeutic drug monitoring for high-dose MTX in National Cancer Hospital

Minh Ha Vu¹, Thi Thanh Minh Nguyen²,
Thi Hong Hanh Nguyen¹,
Khanh Linh Duong¹, Thi Lien Huong Nguyen^{1*}

¹Hanoi University of Pharmacy

²Tan Trieu K Hospital

Received 20 March 2020; accepted 4 May 2020

Abstract:

Methotrexate is an important anti-cancer drug, which is listed in the World Health Organization's essential drugs. The therapies using high dose methotrexate (HDMTX) have been commonly used at the National Cancer Hospital (K Hospital) in Vietnam. In order to ensure the effectiveness and safety of this important drug, a therapeutic drug monitoring (TDM) protocol for HDMTX has been formulated by the Pharmacy department at K Hospital and was then approved by the Hospital Director in November 2018.

The objective of this study was to examine the level of compliance with this TDM protocol in clinical practice at the hospital. The study was conducted from July 2019 to February 2020. A total of 174 cycles of HDMTX, including the ones of the treatment for non-hodgkin lymphoma (66.7%), osteosarcoma (30.4%), and acute lymphoblastic leukemia (2.9%), were included in the study. The administrations of 137 cycles were 4-hour transfusion and the remaining cycles were 24-hour transfusion. The results showed that there was no cycle fully complied with the protocol. When considering steps in the protocol individually, the compliance percentages were 47.1% for pre-transfusion evaluation, 14.9% for the rehydration and urine alkalization procedure, 58.6% for methotrexate quantification, and 19.0% for rescue procedure with leucovorin. The research results indicated that the compliance proportions with the TDM protocol at K Hospital were low. More studies should be conducted to find out the reasons and difficulties in the adherence to the protocol, or the consequences on patients' outcomes of the non-compliance to protocol practice so that its adherence can be improved.

Keywords: high dose methotrexate, leucovorin rescue, therapeutic drug monitoring.

Classification number: 3.4

thay thế cho tetrahydrofolic, ngăn ngừa được các độc tính của MTX. Hơn 40 năm trước, Djerassi và cộng sự đã giới thiệu phác đồ điều trị ung thư bằng HDMTX với khuyến cáo theo dõi thường xuyên nồng độ MTX trong huyết tương kèm theo giải cứu bằng leucovorin dựa trên dược động học MTX, cho phép sử dụng MTX tiêm tĩnh mạch liều cao lên đến 33 g/m² [3].

Bệnh viện K Tân Triều (sau đây gọi tắt là Bệnh viện K) là bệnh viện đầu ngành trong điều trị ung thư ở nước ta, cũng là đơn vị tiên phong trong việc triển khai định lượng MTX. Tại đây, các phác đồ HDMTX kèm giải cứu bằng leucovorin thường xuyên được sử dụng. Tuy nhiên, để đảm bảo hiệu quả và an toàn thuốc, cần đồng bộ hoá toàn bộ các khâu từ đánh giá bệnh nhân, kiểm hoá, bù dịch cho đến định lượng nồng độ MTX và giải cứu bằng leucovorin. Trên thế giới, các bệnh viện thường xây dựng quy trình TDM cho HDMTX và đảm bảo thực hành theo quy trình chuẩn. Tại Bệnh viện K, quy trình này bước đầu được xây dựng bởi Khoa Dược và được Ban Giám đốc Bệnh viện ký quyết định thông qua từ tháng 11/2018 [4]. Tuy nhiên, từ khi triển khai đến nay vẫn chưa có các nghiên cứu tổng kết việc thực hiện quy trình trong thực hành lâm sàng thường quy. Vì vậy, nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện với mục tiêu xác định mức độ tuân thủ TDM cho phác đồ HDMTX, từ đó phân hồi nhằm nâng cao chất lượng sử dụng HDMTX nói riêng cũng như chất lượng sử dụng thuốc điều trị ung thư nói chung, đồng thời giúp cải thiện tính khả thi của quy trình TDM cho phác đồ HDMTX tại Bệnh viện K.

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Toàn bộ hồ sơ bệnh án của bệnh nhân điều trị nội trú tại Bệnh viện K thỏa mãn các tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ sau:

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân được kê đơn HDMTX, điều trị nội trú tại Khoa Nhi, Khoa Nội 1 và Khoa Nội hệ tạo huyết Bệnh viện K trong thời gian từ 1/7/2019 đến 10/2/2020.

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh án không tiếp cận được.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu hồi cứu mô tả.

Quy trình nghiên cứu: từ dữ liệu sử dụng thuốc của Khoa Dược trong thời gian nghiên cứu, lọc bệnh nhân được điều trị nội trú HDMTX tại 3 khoa/phòng nghiên cứu. Hồ sơ bệnh án được thu thập tại các khoa điều trị dựa trên mẫu Phiếu thu thập thông tin hồ sơ bệnh án.

Nhóm nghiên cứu thu thập thông tin từ hồ sơ bệnh án về các đặc điểm nhân khẩu học, bệnh lý ung thư, phác đồ hoá trị liệu, chỉ định thực hiện và kết quả xét nghiệm cận lâm sàng liên quan đến việc sử dụng MTX, chỉ định bù dịch,

kiềm hóa và giải cứu bằng leucovorin.

Dựa trên thông tin thu được, nhóm nghiên cứu đánh giá tính tuân thủ TDM cho HDMTX, bao gồm tuân thủ từng bước trong quy trình và tuân thủ toàn bộ quy trình TDM của Bệnh viện.

Quy ước trong nghiên cứu:

MTX liều cao: chu kỳ được tính là HDMTX khi dùng MTX truyền tĩnh mạch với tổng liều MTX ≥ 1000 mg/m² (1 g/m²) [5]. Phác đồ được phân thành hai loại theo tổng thời gian truyền MTX là phác đồ 4 giờ (4 h) và phác đồ 24 giờ (24 h).

Tuân thủ quy trình TDM: tuân thủ toàn bộ các bước trong quy trình TDM [4], bao gồm:

- Tuân thủ về đánh giá tình trạng bệnh nhân trước truyền MTX: có thực hiện đầy đủ xét nghiệm creatinin, ALT, AST, bilirubin, công thức máu trong vòng 5 ngày trước truyền HDMTX.

- Tuân thủ về bù dịch và kiềm hóa nước tiểu: truyền dịch liên tục ít nhất 4 h trước khi dùng HDMTX cho đến khi nồng độ MTX về ngưỡng an toàn. Hỗn hợp dịch truyền: 3000 ml/m²/24 h Glucose 5% (2,5%) hoặc NaCl 0,9% (0,45%) + KCl 10% + NaHCO₃ 4,2%, đảm bảo pH nước tiểu ≥ 7 trước truyền MTX cho đến khi MTX về ngưỡng an toàn.

- Tuân thủ về xét nghiệm định lượng MTX: với phác đồ 24 h: thực hiện đầy đủ xét nghiệm tại 24, 36, 42, 48 và 54 h, cho đến khi nồng độ MTX về ngưỡng an toàn $< 0,25$ $\mu\text{mol/l}$; với phác đồ 4 h: thực hiện đầy đủ xét nghiệm tại 24, 48 và 72 h, cho đến khi nồng độ MTX về ngưỡng an toàn $< 0,1$ $\mu\text{mol/l}$.

- Tuân thủ về giải cứu bằng leucovorin: thực hiện đầy đủ xét nghiệm đánh giá nồng độ MTX và chỉnh liều leucovorin giải cứu phù hợp theo khuyến cáo của quy trình TDM.

Xử lý số liệu: phân tích số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Phương pháp thống kê được sử dụng bao gồm:

- Thống kê mô tả: các biến liên tục được mô tả bằng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn, các biến định tính được mô tả theo số lượt và tỷ lệ %.

- Dùng kiểm định T - test để so sánh hai giá trị trung bình hoặc hai tỷ lệ.

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm mẫu nghiên cứu

Nghiên cứu thu thập được 41 bệnh nhân với 174 chu kỳ hóa chất được chia thành hai nhóm: 137 chu kỳ dùng phác đồ 4 h và 37 chu kỳ dùng phác đồ 24 h. Nam giới chiếm tỷ lệ đa số với 63,4% tổng số bệnh nhân và 73,6% tổng số chu kỳ hóa chất. Bệnh nhân có độ tuổi trung bình là 34,7. Bệnh lý ung thư được chia thành 3 nhóm chính là bệnh bạch cầu cấp

dòng lympho (2,9%), ung thư xương (30,4%) và u lympho không Hodgkin (66,7%). HDMTX ở Bệnh viện K được sử dụng với nhiều chế độ liều khác nhau, chiếm tỷ lệ cao nhất là mức liều 8 g/m² (37,4%).

Các đặc điểm chung của mẫu nghiên cứu được trình bày cụ thể ở bảng 1.

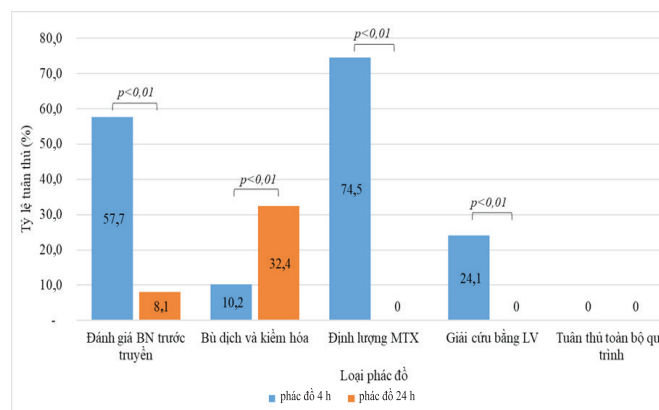
Bảng 1. Đặc điểm chung và theo từng phác đồ điều trị HDMTX của bệnh nhân nghiên cứu.

Đặc điểm	Phác đồ 4 h (n,%)		Phác đồ 24 h (n,%)		Tổng (n,%)	
	Số BN (n=31)	Số CK (n=137)	Số BN (n=10)	Số CK (n=37)	Số BN (n=41)	Số CK (n=174)
Tuổi (năm)*	41,9 \pm 7,9		12,4 \pm 4,4		34,6 \pm 7,2	
Cân nặng (kg)*	50,8 \pm 4,9		32,3 \pm 8,3		45,8 \pm 5,0	
BSA (m ²)*	1,47 \pm 0,11		1,11 \pm 0,21		1,38 \pm 0,10	
Bệnh lý mắc phải						
Bạch cầu cấp dòng lympho	1 (2,4)	4 (2,3)	1 (2,4)	1 (0,6)	2 (4,9)	5 (2,9)
Ung thư xương	4 (9,8)	29 (16,7)	5 (12,2)	24 (13,8)	9 (21,9)	53 (30,4)
U lympho không Hodgkin	26 (63,4)	104 (59,8)	4 (9,8)	12 (6,9)	30 (73,2)	116 (66,7)
Chế độ liều MTX (tổng liều kê đơn)						
1 g/m ²	1 (2,4)	5 (2,9)	1 (2,4)	3 (1,7)	2 (4,9)	8 (4,6)
3 g/m ²	2 (4,9)	4 (2,3)	1 (2,4)	3 (1,7)	3 (7,3)	7 (4,0)
3,5 g/m ²	17 (41,5)	44 (25,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	17 (41,5)	44 (25,3)
5 g/m ²	2 (4,9)	8 (4,6)	3 (7,3)	7 (4,0)	5 (12,2)	15 (8,6)
8 g/m ²	5 (12,2)	47 (27,0)	4 (9,8)	18 (10,4)	9 (21,9)	65 (37,4)
12 g/m ²	4 (9,8)	29 (16,7)	1 (2,4)	6 (3,4)	5 (12,2)	35 (20,1)

*: các thông số biểu diễn theo giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. BN: bệnh nhân; CK: chu kỳ; BSA (body surface area): diện tích bề mặt cơ thể.

Thực trạng tuân thủ TDM của MTX liều cao tại Bệnh viện K

Tỷ lệ tuân thủ quy trình TDM ở hai nhóm dùng HDMTX phác đồ 4 h và phác đồ 24 h (hình 1):



Hình 1. Tỷ lệ tuân thủ quy trình TDM theo các chỉ tiêu đánh giá trong từng chu kỳ. LV: leucovorin; BN: bệnh nhân.

Phân tích việc tuân thủ toàn bộ các khâu trong quy trình, trong tổng số 174 chu kỳ hóa trị bằng HDMTX được đưa vào nghiên cứu, không có chu kỳ nào tuân thủ đầy đủ quy trình TDM. Tuy nhiên, khi xem xét trên từng khía cạnh của quy trình, thực hành tại Bệnh viện vẫn đảm bảo tuân thủ ở các mức độ khác nhau, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) giữa các nhóm dùng phác đồ 4 h và 24 h, cụ thể như sau:

Về đánh giá bệnh nhân trước truyền, có 82 chu kỳ tuân thủ quy trình (chiếm tỷ lệ 47,1%), bao gồm 79 chu kỳ dùng phác đồ 4 h (57,7%) và 3 chu kỳ dùng phác đồ 24 h (8,1%).

Về bù dịch và kiểm hóa nước tiểu có 26 chu kỳ tuân thủ quy trình (14,9%), bao gồm 14 chu kỳ dùng phác đồ 4 h (10,2%) và 12 chu kỳ dùng phác đồ 24 h (32,4%).

Về định lượng nồng độ MTX và giải cứu bằng leucovorin, có 102 chu kỳ tuân thủ quy trình định lượng MTX (58,6%), 33 chu kỳ tuân thủ quy trình giải cứu bằng leucovorin (19,0%). Các chu kỳ tuân thủ hai quy trình này đều là các chu kỳ dùng phác đồ 4 h với tỷ lệ tuân thủ lần lượt là 74,5 và 24,1%; không có chu kỳ dùng phác đồ 24 h nào tuân thủ đầy đủ hai quy trình này.

Một số vấn đề không tuân thủ đáng lưu ý trong các khâu đánh giá bệnh nhân trước truyền HDMTX và khâu bù dịch, kiểm hóa nước tiểu: có 92 chu kỳ (52,9%) ghi nhận ít nhất 1 vấn đề trong thực hiện đánh giá bệnh nhân trước truyền HDMTX, 148 chu kỳ (85,1%) ghi nhận có vấn đề trong việc bù dịch và kiểm hóa nước tiểu. Các vấn đề chính cần lưu ý được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Các vấn đề đáng lưu ý trong đánh giá bệnh nhân và bù dịch kiểm hóa nước tiểu.

	Phác đồ 4 h	Phác đồ 24 h	Tổng
Vấn đề đáng lưu ý về đánh giá bệnh nhân trước truyền HDMTX	(n=58)	(n=34)	(n=92)
Thiếu xét nghiệm chức năng gan (bilirubin)	52 (89,7)	34 (100,0)	86 (93,5)
Thiếu xét nghiệm chức năng thận	23 (39,7)	11 (32,4)	38 (41,3)
Thiếu xét nghiệm công thức máu	25 (43,1)	9 (26,5)	38 (41,3)
Vấn đề đáng lưu ý về bù dịch và kiểm hóa nước tiểu	(n=123)	(n=25)	(n=148)
Không bù dịch và kiểm hóa trước truyền MTX	24 (19,5)	0 (0,0)	24 (16,2)
Không xét nghiệm pH nước tiểu trước truyền MTX	25 (20,3)	1 (4,0)	26 (17,6)
pH nước tiểu <7 trước truyền MTX	4 (3,3)	1 (4,0)	5 (3,4)
Lượng dịch truyền <3000 ml/m ² /24 h	101 (82,1)	4 (16,0)	105 (70,9)
Dùng bù dịch và kiểm hóa trước khi nồng độ MTX đạt ngưỡng an toàn	32 (26,0)	23 (92,0)	55 (37,2)

Vấn đề được ghi nhận nhiều nhất về đánh giá bệnh nhân trước truyền là thiếu chỉ định xét nghiệm chỉ số bilirubin ở 86 chu kỳ. Đối với chỉ tiêu tuân thủ về bù dịch và kiểm

hóa nước tiểu, tỷ lệ không tuân thủ cao nhất là ở chỉ tiêu về lượng dịch bù, với 105 chu kỳ không đảm bảo lượng dịch truyền theo khuyến cáo. Có 26 chu kỳ bệnh nhân không được xét nghiệm pH nước tiểu trước truyền và 5 chu kỳ có pH trước truyền <7, tuy nhiên bệnh nhân vẫn được tiến hành truyền HDMTX mà không kiểm hóa thêm.

Một số vấn đề không tuân thủ đáng lưu ý trong các khâu theo dõi nồng độ MTX trong máu và giải cứu bằng leucovorin: các vấn đề trong định lượng nồng độ MTX và giải cứu bằng leucovorin với liều được chỉnh theo thông số dược động học của MTX ghi nhận trong bảng 3.

Bảng 3. Các vấn đề đáng lưu ý về quy trình theo dõi nồng độ MTX và giải cứu bằng leucovorin.

	Phác đồ 4 h	Phác đồ 24 h	Tổng
Vấn đề đáng lưu ý trong quy trình theo dõi nồng độ MTX trong máu	(n=35)	(n=37)	(n=72)
Không định lượng MTX	0 (0,0)	1 (2,7)	1 (1,4)
Không định lượng MTX đến khi đạt ngưỡng an toàn	31 (88,6)	9 (24,3)	40 (55,6)
Thiếu điểm định lượng	35 (100,0)	37 (100,0)	72 (100,0)
Vấn đề đáng lưu ý trong giải cứu bằng LV	(n=104)	(n=37)	(n=141)
Liều giải cứu chưa phù hợp	68 (65,4)	21 (56,8)	89 (63,1)
Thời điểm giải cứu không phù hợp	14 (13,5)	37 (100,0)	51 (36,2)
Dùng giải cứu khi nồng độ MTX chưa về ngưỡng an toàn hoặc thiếu thông tin về nồng độ MTX	32 (30,8)	13 (35,1)	45 (31,9)

LV: leucovorin.

Thiếu xét nghiệm định lượng tại các thời điểm khuyến cáo là vấn đề được ghi nhận nhiều nhất trong việc tuân thủ quy trình định lượng nồng độ MTX với 35 chu kỳ 4 h và 37 chu kỳ 24 h. Không định lượng đến khi nồng độ MTX đạt ngưỡng an toàn xảy ra ở 40 chu kỳ. Đặc biệt, nghiên cứu ghi nhận 1 chu kỳ không tiến hành xét nghiệm nồng độ MTX.

Vấn đề chính được ghi nhận trong tuân thủ giải cứu bằng leucovorin là liều giải cứu chưa phù hợp với 89 chu kỳ. 45 chu kỳ dùng giải cứu khi nồng độ MTX cao hơn ngưỡng an toàn hoặc không có thông tin nồng độ MTX.

Bàn luận

Đặc điểm mẫu nghiên cứu

Tuổi trung bình của các bệnh nhân trong mẫu nghiên cứu là 34,6±7,2. Độ tuổi trung bình của bệnh nhân dùng phác đồ 4 h là 41,9±7,9, phác đồ 24 h là 12,4±4,4 tuổi. Độ tuổi trung bình của nhóm bệnh bạch cầu cấp dòng lympho là 4,0, bệnh ung thư xương 17,2±2,5, bệnh nhân u lympho không Hodgkin 42,0±8,3 tuổi. Mặc dù cỡ mẫu cho từng mặt bệnh khá nhỏ nhưng kết quả này khá tương đồng so với các nghiên cứu trước đây.

Về phác đồ điều trị, 41 bệnh nhân đưa vào nghiên cứu được điều trị theo 15 loại phác đồ khác nhau. Có thể thấy rằng, các phác đồ sử dụng HDMTX ở Bệnh viện K hiện nay rất đa dạng với nhiều chế độ liều. Điều này cũng là một thuận lợi vì có thể giúp nhóm nghiên cứu có một góc nhìn khái quát về việc sử dụng HDMTX trong thực hành thường quy hiện nay tại Bệnh viện.

Thực trạng việc đánh giá bệnh nhân trước truyền HDMTX

Trong tổng số 174 chu kỳ HDMTX đưa vào nghiên cứu, có 82 chu kỳ (47,1%) tuân thủ đầy đủ việc đánh giá bệnh nhân trước truyền HDMTX. 20 chu kỳ (11,5%) hoàn toàn không tiến hành xét nghiệm đánh giá bệnh nhân trước khi truyền HDMTX, bao gồm 16 chu kỳ 4 h và 4 chu kỳ 24 h. 92 chu kỳ (52,9%) chưa tuân thủ đầy đủ quy trình đánh giá bệnh nhân bao gồm 58 chu kỳ (42,3%) dùng phác đồ 4 h, 34 chu kỳ (91,9%) dùng phác đồ 24 h ($p < 0,01$). Sự khác nhau này có thể do đặc điểm về thực hành lâm sàng riêng tại mỗi khoa. Tất cả các chu kỳ dùng phác đồ 24 h đều là bệnh nhân của Khoa Nhi, nơi mà tỷ lệ đánh giá bệnh nhân trước truyền chỉ đạt 20,5%, trong khi đó tỷ lệ tương ứng tại Khoa Nội 1 và Nội hệ tạo huyết là 63,9 và 76,4%. Các chu kỳ không tuân thủ đầy đủ đánh giá bệnh nhân trước truyền tại Khoa Nhi cũng như hai khoa còn lại chủ yếu thiếu xét nghiệm chỉ số bilirubin. Tương tự như phác đồ dành cho người lớn, các phác đồ điều trị nhi khoa cũng đều yêu cầu về đánh giá bệnh nhân trước khi dùng HDMTX. Các xét nghiệm trước khi truyền HDMTX giúp đánh giá tình trạng bệnh nhân và cũng là căn cứ để xác định liều MTX. Theo kết quả nghiên cứu, trong số các chu kỳ được xét nghiệm chức năng gan thận trước truyền, có 5 chu kỳ có kết quả ALT > 3 lần giá trị bình thường trên và 1 chu kỳ có chỉ số độ thanh thải creatinin CrCl < 50 ml/phút, đều thuộc về các chu kỳ truyền trong 4 h. Với kết quả xét nghiệm chức năng gan thận như vậy, cần điều chỉnh liều MTX để tránh quá liều, tăng nguy cơ gây độc tính do MTX cho bệnh nhân [4]. Tuy nhiên cả 6 chu kỳ này vẫn tiếp tục truyền HDMTX mà không có hiệu chỉnh liều.

Độ thanh thải creatinin CrCl cần được tính toán dựa trên chỉ số creatinin theo công thức phù hợp với giới tính, lứa tuổi và đặc điểm sinh lý của bệnh nhân. Hơn 90% MTX được thải trừ qua nước tiểu, do đó CrCl là căn cứ quan trọng để hiệu chỉnh liều MTX cho mỗi chu kỳ. Tuy nhiên hiện nay trong thực hành lâm sàng của Bệnh viện K, trước mỗi chu kỳ, bệnh nhân chỉ được xét nghiệm chỉ số creatinin mà không được tính toán chỉ số CrCl. Trong khi đó, theo ước tính, có đến 60% bệnh nhân ung thư trưởng thành có rối loạn chức năng thận. Trong một vài trường hợp, mặc dù chỉ số creatinin hoàn toàn trong giới hạn cho phép nhưng khi tính toán thì chỉ số CrCl đã giảm dưới mức bình thường. Đây là nguy cơ gây thừa liều, tăng độc tính do MTX. Do đó, việc tính toán cẩn thận chỉ số CrCl trước mỗi chu kỳ HDMTX là hết sức quan trọng, cần được đưa vào thực hành thường quy tại Bệnh viện.

Thực trạng bù dịch và kiểm hóa nước tiểu trước truyền HDMTX

Bù dịch và kiểm hóa trước truyền HDMTX là tiêu chí bắt buộc cần thực hiện theo tất cả các hướng dẫn điều trị hiện tại, nhằm hạn chế độc tính do MTX gây ra. Việc truyền dịch liên tục nhằm gia tăng tốc độ dòng nước tiểu và kiểm hóa nước tiểu bảo vệ thận khỏi bị tổn thương trong quá trình điều trị bằng HDMTX. Nhiều phác đồ đề nghị bù dịch tối thiểu 125 ml/m²/24 h trong ít nhất 2 h trước khi bắt đầu truyền HDMTX và tiếp tục trong 48-72 h, thậm chí lâu hơn nếu bệnh nhân có tiền sử độc tính hoặc chậm thải trừ MTX [6-8].

Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, chỉ có 26 chu kỳ (14,9%) tuân thủ đầy đủ các bước của quy trình này. Vẫn còn 24 chu kỳ HDMTX 4 h chưa được bù dịch và kiểm hóa trước truyền HDMTX; với chu kỳ truyền 24 h, 100% chu kỳ tuân thủ chỉ tiêu này. Tỷ lệ chu kỳ không tuân thủ cao nhất ở chỉ tiêu là lượng dịch bù trong ngày > 3000 ml/m²/24 h với 105 chu kỳ (70,9%). Lượng dịch trung bình của 105 chu kỳ này chỉ đạt 1715,6 \pm 98,3 ml/m²/24 h.

Mục tiêu của kiểm hóa nước tiểu nhằm giữ cho pH nước tiểu luôn > 7 để tăng độ hòa tan của MTX, hạn chế MTX tạo tinh thể gây tổn thương thận. Tất cả các phác đồ đều khuyến cáo kiểm tra pH nước tiểu ngay trước khi truyền MTX và theo dõi thường xuyên sau đó cho đến khi nồng độ MTX về ngưỡng an toàn [4, 6-8]. Tuy nhiên, chỉ có 148 chu kỳ (85,1%) tiến hành xét nghiệm nước tiểu trước khi truyền HDMTX, trong đó có 143 chu kỳ (82,2%) đạt chỉ tiêu pH nước tiểu ≥ 7 , còn lại 5 chu kỳ không đạt chỉ tiêu này nhưng cũng không được kiểm hóa thêm mà vẫn tiếp tục truyền HDMTX.

Thực trạng tuân thủ quy trình về theo dõi nồng độ MTX trong máu

Trong tổng số 174 chu kỳ, có 102 chu kỳ (58,6%) tuân thủ đầy đủ quy trình về theo dõi nồng độ MTX. 72 (41,4%) chu kỳ không tuân thủ đầy đủ, trong đó có 1 chu kỳ hoàn toàn không định lượng nồng độ MTX. Tất cả 37 chu kỳ dùng HDMTX trong 24 h không tuân thủ quy trình do không thực hiện đầy đủ các điểm định lượng nồng độ MTX như khuyến cáo tại 24, 36, 42, 48 và 54 h.

31 chu kỳ 4 h và 9 chu kỳ 24 h không thực hiện xét nghiệm định lượng nồng độ MTX đến khi về ngưỡng an toàn. Giá trị nồng độ MTX tại điểm cuối cùng được định lượng ở các chu kỳ này lần lượt là 0,60 \pm 0,54 μ mol/l và 24,54 \pm 43,64 μ mol/l. Mức nồng độ MTX này cao hơn rất nhiều so với ngưỡng an toàn được khuyến cáo là $< 0,1$ μ mol/l với phác đồ 4 h và $< 0,25$ μ mol/l với phác đồ 24 h [4, 6-8]. Đây là một yếu tố chủ quan của bác sỹ điều trị. Lưu ý rằng, tốc độ thải trừ MTX phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố. Nghiên cứu cũng ghi nhận ở một số trường hợp, mặc dù nồng độ MTX trong những ngày đầu có xu hướng giảm tuyến tính, nhưng sau đó tốc độ thải trừ MTX lại giảm đáng kể, gây kéo

dài thời gian theo dõi và giải cứu bằng leucovorin. Nếu dừng theo dõi nồng độ MTX khi chưa xuống đến ngưỡng an toàn, có thể sẽ không kịp thời nhận biết chu kỳ chậm thải trừ MTX diễn ra muộn, làm tăng nguy cơ gây độc tính trên bệnh nhân.

Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận trường hợp sau: bệnh nhân nam 62 tuổi mắc u lympho không Hodgkin được truyền MTX 3,5 g/m² trong 4 h, tại chu kỳ HDMTX đầu tiên của bệnh nhân. Nồng độ MTX thời điểm 24 h sau truyền HDMTX đo được là 5,32 µmol/l, hoàn toàn nằm trong giới hạn an toàn. Tuy nhiên, mặc dù được tiếp tục bù dịch và kiểm tra nước tiểu, giải cứu bằng leucovorin, nồng độ MTX đo tại thời điểm 48 h chỉ giảm được xuống 4,8 µmol/l - nồng độ MTX được đánh giá là độc tính độ 1. Sau khi tăng liều leucovorin và tiếp tục bù dịch, kiểm tra nước tiểu, nồng độ MTX trong chu kỳ này phải cần đến 6 ngày để đạt ngưỡng an toàn. Nếu như chỉ nhìn vào nồng độ MTX thời điểm 24 h và đánh giá rằng tốc độ thải trừ của MTX tại chu kỳ này đạt yêu cầu và không tiếp tục theo dõi nồng độ MTX các ngày tiếp theo, sẽ không kịp thời nhận biết vấn đề chậm thải trừ MTX để có những điều chỉnh phù hợp.

Thực trạng giải cứu bằng leucovorin

Trong hơn 30 năm qua, giải cứu bằng leucovorin là một nền tảng của điều trị HDMTX. Leucovorin đặc biệt hiệu quả trong việc ngăn ngừa suy tủy, nhiễm độc đường tiêu hóa và nhiễm độc thần kinh trong quá trình điều trị với HDMTX. Các phác đồ hóa trị liệu có HDMTX cũng bao gồm các khuyến cáo về thời điểm bắt đầu giải cứu, liều lượng và thời gian dùng leucovorin để bảo vệ các tế bào bình thường khỏi tổn thương. Vì leucovorin làm vô hiệu hóa tác dụng của MTX, thời gian giải cứu không được bắt đầu quá sớm bởi vì nó sẽ làm giảm cả độc tính cũng như hiệu quả chống ung thư của MTX.

Tùy từng nghiên cứu khác nhau mà giải cứu leucovorin bắt đầu được sử dụng sau khi truyền MTX 24, 36 đến 42 h với mức liều cơ bản là 25 mg hoặc 10 mg/m² tiêm tĩnh mạch mỗi 6 giờ cho đến khi mức MTX huyết thanh <0,25 µmol/l với phác đồ 24 h và <0,1 µmol/l với phác đồ 4 h. Có phác đồ khuyến cáo nên tiếp tục uống 25 mg leucovorin mỗi 6 giờ trong 2 ngày sau đó. Liều leucovorin có thể được tăng lên tới 1000 mg/m² nếu có dấu hiệu thải trừ chậm MTX [4, 6-8].

Trong thực hành lâm sàng tại Bệnh viện K hiện nay, 100% chu kỳ HDMTX được thực hiện giải cứu bằng leucovorin vào 24 h kể từ khi truyền MTX. Do đó, tất cả 37 chu kỳ dùng HDMTX trong 24 h đều được đánh giá là không tuân thủ quy trình giải cứu bằng leucovorin. Các phác đồ HDMTX 24 h đều khuyến cáo bắt đầu giải cứu vào 42 h kể từ thời điểm truyền HDMTX [6, 8]. Việc tiến hành giải cứu sớm có thể là yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị của thuốc. Mức liều cơ bản hay dùng nhất là 25 mg mỗi 6 h. Khi phân tích chế độ liều leucovorin với kết quả định lượng MTX, chỉ có 33 chu kỳ (19,0%) tuân thủ đầy đủ quy trình giải cứu bằng

leucovorin. Với 141 chu kỳ (81,0%) không tuân thủ, vấn đề ghi nhận nhiều nhất là thời điểm giải và liều giải cứu chưa phù hợp. 45 chu kỳ dừng giải cứu khi chưa rõ nồng độ MTX hoặc nồng độ chưa về ngưỡng an toàn. Đây là một yếu tố nguy cơ cao gây độc tính cho bệnh nhân, do tốc độ thải trừ MTX không phải luôn tuyến tính. Nhiều trường hợp trong nghiên cứu ghi nhận độ độc nồng độ MTX rất tốt trong hai ngày đầu nhưng sau đó nồng độ đi ngang, gây kéo dài thời gian giải cứu và nguy cơ độc tính trên bệnh nhân.

Kết luận

Nghiên cứu bước đầu cho thấy thực trạng sử dụng HDMTX trong thực hành lâm sàng hiện nay tại Bệnh viện K chưa có sự thống nhất giữa thực hành và quy trình chuẩn cũng như giữa quy trình của Bệnh viện và các hướng dẫn thực hành khác. Thực hành giám sát chưa tối ưu làm tăng nguy cơ xuất hiện độc tính trên bệnh nhân. Cần có các nghiên cứu tiếp tục đánh giá mối liên quan giữa việc không tuân thủ khuyến cáo TDM và độc tính gặp phải trên bệnh nhân sử dụng HDMTX, tiến tới hỗ trợ phát triển quy trình hướng dẫn TDM chi tiết cho từng phác đồ của Bệnh viện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. Howard Scott, McCormick John, Pui Ching-Hon, K. Buddington Randall, Harvey R. Donald (2016), "Preventing and managing toxicities of high-dose MTX", *The Oncologist*, **21**(12), pp.1471-1482.
- [2] C. Widemann Brigitte, C. Adamson Peter (2006), "Understanding and managing MTX nephrotoxicity", *The Oncologist*, **11**(6), pp.694-703.
- [3] I. Djerassi, J.S. Kim, N.P. Nayak (1977), "High-dose methotrexate with citrovorum factor rescue: a new approach to cancer chemotherapy", *Recent Advances in Cancer Treatment, Monograph Series of the European Organization for Research on Treatment of Cancer*, New York, pp.201-225.
- [4] Bệnh viện K Tân Triều (2018), *QT.BVK.19.01 - Quy trình giám sát điều trị MTX thông qua theo dõi nồng độ trong máu*.
- [5] Ching-Hon Pui (2003), *Treatment of Acute Leukemias: New Directions for Clinical Research*, Humana Press, New Jersey.
- [6] Universitätsklinikum-Hamburg-Eppendorf (2017), *HIT-MED Guidance for Patients with Newly Diagnosed Medulloblastoma Ependymoma CNS Embryonal Tumour and Pineoblastoma, version 4.0*.
- [7] British Columbia Cancer (2020), *BC Cancer Protocol Summary for Central Nervous System Prophylaxis with High Dose MTX, CHOP and Rituximab in Diffuse Large B-Cell Lymphoma*, British Columbia.
- [8] Groupe FRALLE (2003), *Protocole FRALLE 2000-A. Protocole de traitement des Leucémies Aiguës Lymphoblastiques de la lignée B de risque standard de l'enfant. Version amendée mars 2003*.

Phát triển kỹ thuật LAMP phát hiện sán lá gan lớn *Fasciola spp.*

Nguyễn Thị Hồng Ngọc^{1*}, Nguyễn Thị Hương Bình¹, Nguyễn Thu Hương¹, Nguyễn Thị Thu Huyền¹,
Trần Văn Hải², Trần Thanh Dương¹

¹Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương (NIMPE)

²Viện Y học dự phòng Quân đội

Ngày nhận bài 27/5/2020; ngày chuyển phản biện 1/6/2020; ngày nhận phản biện 30/6/2020; ngày chấp nhận đăng 3/7/2020

Tóm tắt:

Sán lá gan lớn (SLGL) *Fasciola spp.* có hai loài là *Fasciola gigantica* và *Fasciola hepatica* gây bệnh chủ yếu ở động vật ăn cỏ như trâu, bò, cừu... và cho cả người. Theo Tổ chức y tế thế giới (WHO), hiện nay bệnh lưu hành ở 75 quốc gia và vùng lãnh thổ trên toàn cầu. WHO coi bệnh này là vấn đề sức khỏe cần được quan tâm trong chương trình sức khỏe cộng đồng và đã được nhiều quốc gia xếp vào vị trí quan trọng trong chiến lược và chính sách y tế. Việc phát triển một kỹ thuật phát hiện nhiễm SLGL nhanh, chính xác là rất quan trọng và cần thiết. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã phát triển kỹ thuật LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) để phát hiện SLGL *Fasciola spp.* từ các nền mẫu khác nhau như phân, mô... Kỹ thuật này có ưu điểm là tính đặc hiệu cao, thời gian phát hiện nhanh và sử dụng trang thiết bị đơn giản. Bộ mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen ITS2. Phản ứng dương tính được quan sát bằng mắt thường, sử dụng chất chỉ thị màu là xanh malachit (MG).

Từ khóa: *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola spp.*, gen ITS2, LAMP.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Bệnh SLGL ở người do *Fasciola spp.* gây nên, theo WHO, hiện nay bệnh lưu hành ở 75 quốc gia và vùng lãnh thổ trên toàn cầu. Các khu vực có tỷ lệ nhiễm SLGL cao là cao nguyên Nam Mỹ, thung lũng sông Nile, lưu vực biển Caspi, cũng như Đông Á và Đông Nam Á [1]. WHO coi bệnh SLGL là vấn đề sức khỏe cần được quan tâm trong chương trình sức khỏe cộng đồng và đã được nhiều quốc gia xếp vào vị trí quan trọng trong chiến lược và chính sách y tế. Một số đặc điểm dịch tễ của SLGL có sự khác nhau giữa các quốc gia.

Việt Nam nằm trong vùng nhiệt đới, có điều kiện về tự nhiên và xã hội thuận lợi cho các loài ký sinh trùng như SLGL, sán lá gan nhỏ, các loài giun tròn đường ruột... phát triển, gây ảnh hưởng lớn tới sức khỏe người dân. Tại Việt Nam, SLGL đã được ghi nhận là bệnh lây truyền từ động vật sang người, phổ biến nhất là loài *F. gigantica*. Theo báo cáo của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương (NIMPE), bệnh nhân nhiễm SLGL được phát hiện trên nhiều tỉnh/thành phố trong cả nước. Bệnh gặp chủ yếu ở người trên 15 tuổi và có chiều hướng gia tăng trong những năm gần đây: năm 2011 có khoảng 10.407 ca bệnh phân

bổ ở 53 tỉnh/thành phố trong cả nước đã được điều trị; năm 2019, số bệnh nhân SLGL được điều trị tại NIMPE, Trung tâm Phòng chống Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Nghệ An, Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Thanh Hóa và Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn là 12.309.

Việc phát hiện nhanh SLGL để có biện pháp phòng chống hiệu quả là rất quan trọng. Hiện nay, các kỹ thuật xét nghiệm SLGL chủ yếu dựa vào xét nghiệm trực tiếp tìm trứng trong phân như phương pháp lắng cặn, phương pháp Willis, hoặc các kỹ thuật miễn dịch phát hiện kháng nguyên, kháng thể... [2-6]. Tuy nhiên, kỹ thuật soi phân tìm trứng có độ nhạy thấp (khoảng 30-40%), độ đặc hiệu phụ thuộc nhiều vào kinh nghiệm của kỹ thuật viên. Các kỹ thuật miễn dịch phát hiện kháng thể có độ nhạy cao hơn nhưng có hiện tượng âm tính giả.

Kỹ thuật PCR có độ nhạy, độ đặc hiệu cao nhưng đòi hỏi các máy móc trang thiết bị đắt tiền, khó áp dụng tại thực địa, do đó kỹ thuật ADN/ARN đẳng nhiệt có độ nhạy, độ đặc hiệu tương đương PCR, không đòi hỏi các trang thiết bị đắt tiền là hướng đi được ưu tiên và được ứng dụng ngày càng rộng rãi trên thế giới.

Kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt LAMP được nghiên cứu

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

Development of a LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) assay for detection of *Fasciola* spp.

Thi Hong Ngoc Nguyen^{1*}, Thi Huong Binh Nguyen¹,
Thu Huong Nguyen¹, Thi Thu Huyen Nguyen¹,
Van Hai Tran², Thanh Duong Tran¹

¹National Institute of Malariology, Parasitology and Entomology (NIMPE)

²Military Preventive Medicine Institute

Received 27 May 2020; accepted 3 July 2020

Abstract:

Fasciola spp. have two species, *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica*, which cause disease mainly in herbivores such as buffaloes, cows, sheep, etc. and cause disease in humans. According to the World Health Organization (WHO), the disease is currently circulating in 75 countries and territories around the globe. WHO considers the disease a health issue that needs attention in public health programs and has been ranked as an important position in health strategy and policy by many countries. Therefore, developing a fast and accurate technique to detect *Fasciola* infection is very important and necessary. In this study, the authors developed the LAMP technique to detect *Fasciola* spp. from different kinds of sample such as feces, tissue samples, etc. The advantages of this method included high specificity, fast detection time, and simple equipment use. Primer set was designed for founding on ITS2 gene. A positive reaction was visualised with the naked eye, using the color indicator, malachite green.

Keywords: *Fasciola gigantica*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola* spp., ITS2 gene, LAMP.

Classification number: 3.5

và phát triển bởi Công ty Eiken Chemical (Nhật Bản) và là phương pháp nhân bản gen đẳng nhiệt đang được ứng dụng nhiều nhất. Thành phần phản ứng gồm có ADN khuôn, môi, enzyme Bst DNA polymerase, hỗn hợp phản ứng được ủ ở 65°C. Phương pháp này có hiệu quả khuếch đại cao, khoảng 10⁹-10¹⁰ bản sao trong 15-60 phút [7, 8]. Ưu điểm vượt trội của kỹ thuật này là độ nhạy, độ đặc hiệu cao (trương đương với các phương pháp PCR), ADN làm khuôn khuếch đại không đòi hỏi độ tinh sạch cao, do đó có thể sử dụng các phương pháp tách chiết đơn giản, tiết kiệm được kinh phí, thời gian. Kết quả của phản ứng LAMP có thể được quan sát trực tiếp bằng mắt thường. Thời gian xét nghiệm nhanh (khoảng 60 phút), xét nghiệm đồng thời nhiều mẫu. Trên thế giới cũng đã có những nghiên cứu về kỹ thuật LAMP để phát hiện SLGL từ mẫu phân của các loài gia súc như trâu, bò, cừu... [9-12]. Tuy nhiên ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào được công bố. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển và đánh giá kỹ thuật LAMP cho việc phát hiện SLGL, hướng tới phát triển thành bộ kit dùng cho chẩn đoán nhanh SLGL từ các mẫu bệnh phẩm.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

- Mẫu chứng chuẩn: SLGL trưởng thành, trứng SLGL trưởng thành đã định loại bằng hình thái và khẳng định bằng kỹ thuật PCR được lưu giữ tại Khoa Ký sinh trùng của NIMPE.

- Mẫu nghiên cứu: mẫu được thu thập tại phòng khám chuyên ngành của NIMPE, và thu thập tại hai tỉnh Bình Định và Quảng Nam.

- Hóa chất dùng cho LAMP như Bst DNA polymerase được mua của Hãng New England Biolabs, Mỹ. Kit tách chiết ADN từ mẫu mô, mẫu phân của Hãng Qiagen, Đức. Các trình tự môi thiết kế được đặt tổng hợp của Hãng IDT, Mỹ.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN: ADN tổng số được tách chiết từ mẫu mô và mẫu phân lắng cặn bằng bộ sinh phẩm QIAamp DNA micro kit và QIAamp DNA stool mini kit của Hãng Qiagen (Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thiết kế bộ môi LAMP: môi cho phản ứng LAMP được thiết kế trên vùng gen ITS2 sử dụng phần mềm chuyên dụng thiết kế môi là phần mềm Primer Explorer v.5 (<https://primerexplorer.jp/e/>). Đánh giá hiệu quả nhân bản và tính đặc hiệu của môi với tác nhân cần nhân bản.

Khảo sát và tối ưu hóa phản ứng LAMP: các thông số cần được khảo sát tối ưu hóa trong phản ứng LAMP là nồng độ Mg^{2+} , nhiệt độ hoạt động của bộ môi, thời gian phản ứng, chất chỉ thị màu dùng để quan sát phát hiện sản phẩm LAMP và độ nhạy (ngưỡng phát hiện) của hệ môi thiết kế. $MgSO_4$ được khảo sát ở các nồng độ 4, 6 và 8 mM. Phản ứng LAMP được thực hiện ở dải nhiệt độ từ 60 đến 65°C, sử dụng chất chỉ thị màu MG với các nồng độ 0,012, 0,008, 0,004 và 0,001%. Thời gian thực hiện phản ứng LAMP được khảo sát ở 40 và 60 phút. Tiêu chí đánh giá lựa chọn các thông số dựa vào việc quan sát sản phẩm LAMP trên gel agarose 2% và sự chuyển màu dung dịch trong các ống mẫu âm và dương sau phản ứng.

Độ nhạy của bộ môi được xác định bằng cách thực hiện phản ứng LAMP với nền mẫu là dãy nồng độ ADN pha loãng bậc 10 liên tiếp từ plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen ITS2 đặc trưng của SLGL. Nồng độ ADN thấp nhất mà tại đó có sản phẩm khuếch đại sau phản ứng LAMP chính là ngưỡng phát hiện, hay độ nhạy của phản ứng.

Kết quả

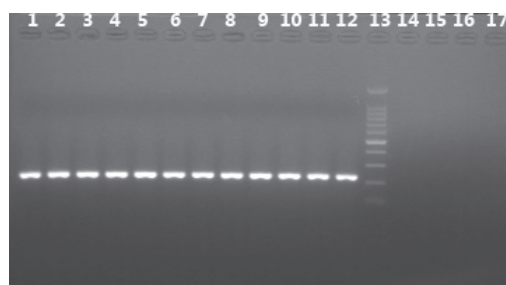
Môi và thiết kế môi

Kết quả bộ môi thu được có trình tự được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi LAMP thiết kế để chẩn đoán SLGL.

TT	Tên môi	Trình tự môi	Chiều dài môi (bp)	Nhiệt độ nóng chảy T_m (°C)	Tỷ lệ % GC	5'dG	3'dG
1	F3	GGTTGGACTGATAACC TGG	19	56,50	53	-5,61	-5,84
2	B3	CAAGCCACGACTTTTT GG	18	55,96	50	-5,85	-4,28
3	FIP	GCTCTTCATCGACACA CGAG-CTTTGACCATAC GTACAACCTCT	42				
4	BIP	TGCTTTGAACATCGACA TCTTGAAC-AGTTTATAA GCCGACCTC	44				
5	LB	TTAGCCTGTGCCACGC	17	61,63	65	-4,93	-7,18

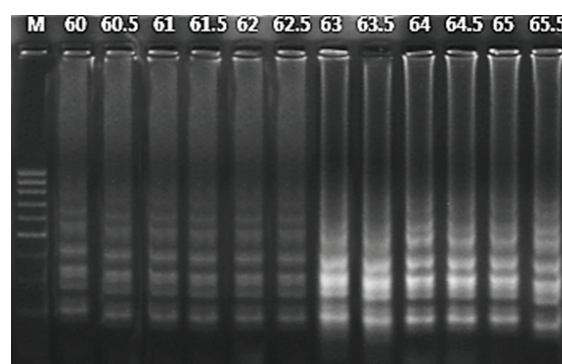
Thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp môi F3 và B3 trong bộ môi LAMP với nền mẫu ADN tách chiết từ SLGL, sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ và giun đầu gai để xác định tính đặc hiệu của bộ môi. Sản phẩm PCR thu được bằng có kích thước 228 bp đối với các mẫu ADN tách chiết từ SLGL, không có sản phẩm khuếch đại ở các mẫu ADN tách chiết từ các loại giun sán còn lại (hình 1).



Hình 1. Sản phẩm PCR sử dụng cặp môi F3-B3. Làn 1-4: mẫu SLGL *F. gigantica* trưởng thành; làn 5-8: mẫu SLGL *F. hepatica* trưởng thành; làn 9, 10: mẫu trứng SLGL *F. gigantica*; làn 11, 12: mẫu trứng SLGL *F. hepatica*; làn 13: thang chuẩn ADN 100 bp; làn 14: chứng âm; làn 15: mẫu sán lá ruột nhỏ; làn 16: mẫu sán lá gan nhỏ; làn 17: mẫu giun đầu gai.

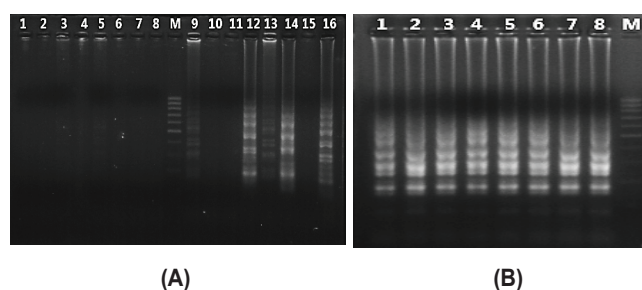
Khảo sát và tối ưu hóa phản ứng LAMP

Nhiệt độ của phản ứng LAMP được tiến hành khảo sát từ 60 đến 65,5°C. Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy ở nhiệt độ 63°C sản phẩm khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất (hình 2).



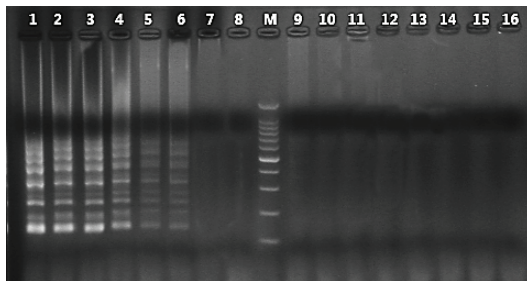
Hình 2. Sản phẩm LAMP khảo sát ở dải nhiệt độ 60-65,5°C.

Khi khảo sát nồng độ $MgSO_4$, chúng tôi tiến hành các phản ứng ở cùng nhiệt độ 63°C, thành phần các chất tham gia phản ứng là như nhau, chỉ khác biệt về nồng độ Mg^{2+} (4, 6 và 8 mM). Kết quả được đánh giá thông qua điện di sản phẩm trên gel agarose 2% (hình 3A, B), Mg^{2+} ở nồng độ 8 mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định.



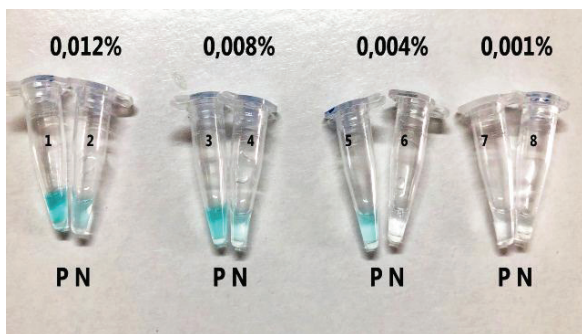
Hình 3. Sản phẩm LAMP ở nồng độ khác nhau. (A) Nồng độ 4 mM (làn 1-8) và 6 mM (làn 10-16); (B) Nồng độ 8 mM.

Khảo sát thời gian tối thiểu thực hiện phản ứng LAMP ở 40 và 60 phút, các thành phần phản ứng: ADN khuôn, môi, đệm phản ứng, nồng độ Mg^{2+} 8 mM... và các điều kiện khác (điều kiện về thiết bị...) giữ nguyên và đồng nhất, chỉ thay đổi thời gian thực hiện phản ứng. Do mong muốn giảm thiểu thời gian phản ứng nên trong nghiên cứu này chúng tôi không tiến hành thực nghiệm ở các khoảng thời gian dài hơn 60 phút. Kết quả cho thấy thời gian tối thiểu để khuếch đại ADN trong phản ứng LAMP là 60 phút (hình 4).



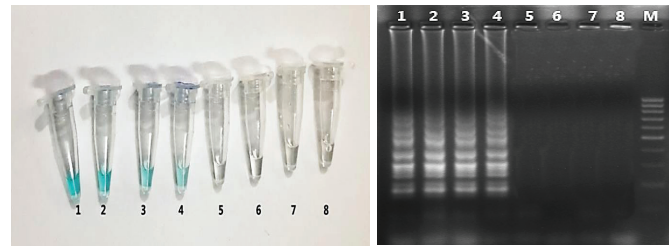
Hình 4. Sản phẩm LAMP sau thời gian phản ứng 40 và 60 phút. Làn 1-8: sản phẩm LAMP từ mẫu mô và trứng SLGL sau 60 phút; làn 9-16: sản phẩm LAMP từ mẫu mô và trứng SLGL sau 40 phút.

Khảo sát lựa chọn nồng độ MG với 4 nồng độ 0,012, 0,008, 0,004 và 0,001%. Kết quả cho thấy, có sự tương đồng 100% giữa 3 người quan sát và kết luận nồng độ MG 0,004% là nồng độ tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính (hình 5).



Hình 5. Hình ảnh màu của các ống sau phản ứng. Ống 1-P, 2-N: mẫu dương tính, âm tính ở nồng độ MG 0,012%; ống 3-P, 4-N: mẫu dương tính, âm tính ở nồng độ MG 0,008%; ống 5-P, 6-N: mẫu dương tính, âm tính ở nồng độ MG 0,004%; ống 7-P, 8-N: mẫu dương tính, âm tính ở nồng độ MG 0,001%.

Để xác định ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP, chúng tôi thực hiện phản ứng LAMP ở điều kiện 63°C, nồng độ Mg^{2+} 8 mM trong 60 phút với mẫu thêm chuẩn có dãy nồng độ ADN từ 10^{-6} đến 10^{-11} ng/μl. Kết quả cho thấy, ngưỡng phát hiện của bộ môi đạt 10^{-9} ng/μl (hình 6).



Hình 6. Kết quả khảo sát ngưỡng phát hiện của bộ môi LAMP. Ống 1: nồng độ ADN 10^{-6} ng/μl; ống 2: nồng độ ADN 10^{-7} ng/μl; ống 3: nồng độ ADN 10^{-8} ng/μl; ống 4: nồng độ ADN 10^{-9} ng/μl; ống 5: nồng độ ADN 10^{-10} ng/μl; ống 6: nồng độ ADN 10^{-11} ng/μl; ống 7: chứng âm 1; ống 8: chứng âm 2.

Thảo luận

Môi và thiết kế môi LAMP

50 trình tự gen ITS2 của 2 loài *F. gigantica*, *F. hepatica* (mỗi loài 25 trình tự) trên ngân hàng dữ liệu NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) đã được tải về và sử dụng phần mềm MEGA 7 với tính năng Clustal W để sắp giống các trình tự của 2 loài nhằm tìm ra vùng bảo tồn đặc trưng cho giống *Fasciola*. Kết quả chúng tôi thu được đoạn trình tự bảo tồn cho giống *Fasciola* có kích thước 461 bp. Vùng trình tự này được tải lên phần mềm trực tuyến Primer Explorer v.5 (Eiken, Nhật Bản) để thiết kế và lựa chọn bộ môi dựa trên một số tiêu chí sau: độ dài đoạn khuếch đại dao động quanh khoảng 200 bp, tính bền vững ở đầu các môi: đầu 3' của các môi F2/B2, F3/B3, LF/LB và đầu 5' của F1c/B1c được thiết kế với năng lượng tự do $\Delta G \leq -4$ kcal/mol. Thành phần GC trong môi chiếm 40-65%...

Qua bảng 1 cho thấy, bộ môi thiết kế đáp ứng đủ các điều kiện đề ra của một hệ môi LAMP. Tính đặc hiệu của bộ môi được khảo sát bằng cả lý thuyết và thực nghiệm. Để khẳng định sản phẩm PCR khuếch đại bằng bộ môi đúng là trình tự của giống *Fasciola* spp., chúng tôi sử dụng chương trình Primer Blast trên NCBI để kiểm tra tính đặc hiệu của cặp môi F3-B3. Kết quả thu được cho thấy, môi bắt cặp hoàn toàn với trình tự ITS2 của SLGL được công bố trên NCBI. Để đánh giá khả năng hoạt động của bộ môi, phản ứng PCR sử dụng cặp môi F3-B3 đã được thực hiện với mẫu ADN của SLGL, sán lá gan nhỏ, giun đầu gai, sán lá ruột nhỏ. Từ kết quả điện di trên gel agarose 2% cho thấy, chúng dương có vạch sản phẩm với kích thước như dự kiến (228 bp), không xuất hiện băng phụ và nhiệt độ biến tính đúng thiết kế. Chứng âm không có sản phẩm khuếch đại. Không có sự bắt cặp chéo của cặp môi với các loài khác, chứng tỏ môi hoạt động tốt, thể hiện tính đặc hiệu của hệ môi thiết kế.

Nhiệt độ của phản ứng LAMP

Nhiệt độ gắn môi (T_a) là yếu tố quan trọng hàng đầu, quyết định tính chính xác cũng như hiệu quả khuếch đại của kỹ thuật PCR và các kỹ thuật khác được phát triển từ PCR. Một đặc trưng của LAMP là khuếch đại ADN hiệu quả trong điều kiện đẳng nhiệt, trong đó nhiệt độ phù hợp cho phản ứng có thể dao động từ 50 đến 68°C. Trên cơ sở này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát nhiệt độ trong khoảng 60-65°C. Kết quả điện di sản phẩm LAMP cho thấy, ở nhiệt độ 63°C sản phẩm khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất. Nhiệt độ 63°C được đánh giá là tạo điều kiện ủ môi và tăng cường khả năng chịu đựng các chất ức chế thường được tìm thấy trong các mẫu chẩn đoán bệnh. Đây cũng là nhiệt độ phù hợp nhất cho hoạt tính xúc tác của enzyme trong vi khuẩn so với *Bacillus* tự nhiên.

Nồng độ $MgSO_4$

Nồng độ $MgSO_4$ ảnh hưởng đến hiệu quả và tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Trong dung dịch đệm quan trọng nhất là ion Mg^{2+} làm tăng nhiệt độ nóng chảy (T_m -melting temperature) của ADN mạch đôi, tạo ra phức chất tan với dNTPs để hình thành cơ chất mà enzym polymerase có thể nhận ra, điều này rất cần thiết cho quá trình liên kết của các dNTPs. Trong phản ứng LAMP, nồng độ $MgSO_4$ thích hợp thường nằm trong khoảng 4 đến 10 mM. Sau khảo sát, chúng tôi nhận thấy rằng, $MgSO_4$ ở nồng độ 4 mM không có sản phẩm khuếch đại, $MgSO_4$ ở nồng độ 6 mM cho sản phẩm không ổn định, hiệu suất không cao, $MgSO_4$ ở nồng độ 8 mM cho sản phẩm LAMP với hiệu suất khuếch đại cao và ổn định. Do vậy, chúng tôi chọn $MgSO_4$ ở 8 mM là nồng độ tối ưu cho phản ứng LAMP.

Chất chỉ thị màu sử dụng để đọc kết quả LAMP

Có nhiều nghiên cứu đã chứng minh kỹ thuật LAMP là một kỹ thuật có độ đặc hiệu cao, độ nhạy, thời gian phản ứng ngắn và cho phép phát hiện sản phẩm khuếch đại trực quan đơn giản bằng cách quan sát độ đục, bằng thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc thuốc nhuộm chỉ thị pH. Mỗi cách thức lại có những ưu và nhược điểm riêng. Mặc dù độ đục đo kết tủa trắng (magie pyrophosphate) được tạo ra sau phản ứng LAMP có thể phát hiện bằng mắt thường, nhưng nó có độ chụm ngắn (khoảng 5-10 giây) sau khi lấy mẫu ra khỏi máy ủ nhiệt. Do vậy, cách phát hiện này có thể cần một máy đo độ đục thời gian thực để có kết luận chính xác hơn. Sử dụng các thuốc nhuộm huỳnh quang như calcein hoặc SYBR Green I có giá thành cao và cần có một hệ thống đèn UV để đọc kết quả. Hơn nữa, calcein có thể kết hợp với ion Mg^{2+} gây ức chế hoạt động ADN polymerase và làm giảm độ nhạy chung của xét nghiệm. Việc bổ sung SYBR Green I

sau phản ứng có thể làm tăng khả năng tạp nhiễm ADN, dẫn đến sai lệch kết quả. Chất chỉ thị màu pH Hydroxy Naphthol Blue (HNB) đã được nhiều nghiên cứu sử dụng để phát hiện sản phẩm của LAMP, tuy nhiên sự khác biệt giữa màu ở những mẫu dương tính là màu xanh lam và tím tương ứng ở mẫu âm tính là chưa rõ ràng. Gần đây, chất chỉ thị màu MG đã được sử dụng thành công như là một chất chỉ thị nhạy với pH để phát hiện các sản phẩm LAMP. Sự thay đổi màu sắc của MG (dạng cation) phụ thuộc vào pH của dung dịch (pH<2: vàng, pH=3-9: xanh lam, pH>10: không màu). Bước sóng hấp thụ cho MG là 621 nm. Trong xét nghiệm LAMP-MG, các mẫu dương tính và âm tính dễ dàng được phân biệt bằng mắt thường là màu xanh nhạt và không màu, tương ứng [13].

Việc bổ sung MG vào đệm LAMP trước khi tiến hành phản ứng không ảnh hưởng đến hoạt động của Bst DNA polymerase, đồng thời loại bỏ nguy cơ tạp nhiễm giữa các mẫu. Ưu điểm của xét nghiệm LAMP-MG có thể cải thiện và khắc phục những hạn chế từ các phát hiện LAMP khác như đã đề cập ở trên. Do vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn MG làm chất chỉ thị màu để đọc kết quả sau phản ứng LAMP. Các nồng độ MG được khảo sát là 0,012, 0,008, 0,004 và 0,001%. Kết quả cho thấy, có sự tương đồng 100% giữa 3 người quan sát và kết luận nồng độ MG 0,004% là nồng độ tối ưu có thể phân biệt được các mẫu dương tính và âm tính. Nồng độ MG cao hơn dẫn đến sự gia tăng dương tính giả, nồng độ MG thấp sẽ không thể phân biệt được mẫu âm và mẫu dương. Màu xanh lam ở các ống mẫu dương tính sau phản ứng vẫn còn nguyên màu cho đến tối đa 6 tuần, ở điều kiện nhiệt độ phòng. Thời gian sau 6 tuần không được khảo sát ở nghiên cứu này.

Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP

Trong nghiên cứu này, ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP là 10^{-9} ng/phản ứng, tương đương với 0,294 bản sao/phản ứng. Ngoài ra, chúng tôi cũng tiến hành thử nghiệm ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP với bộ môi tự thiết kế trên dãy nồng độ pha loãng ADN tổng số, tách chiết từ mẫu mô SLGL trưởng thành. Kết quả cho thấy ngưỡng phát hiện đạt 10^{-6} ng. Ngưỡng phát hiện này tương đương, thậm chí tốt hơn so với các nghiên cứu khác của các tác giả trên thế giới với ngưỡng phát hiện từ 10^{-3} [12] đến 10^{-5} ng [10]. Đồng thời, kỹ thuật LAMP cũng cho kết quả tốt với khả năng phát hiện ở ngưỡng rất thấp khi tiến hành trên các mẫu giả định (bổ sung 5 trứng SLGL/200 mg phân) và trên các mẫu lâm sàng thu được từ bệnh nhân tại phòng khám chuyên ngành của NIMPE (với mật độ trứng là 1 trứng/200 mg mẫu lắng cặn).

Kết luận

Bộ môi thiết kế trong nghiên cứu hoạt động tốt, có tính đặc hiệu cao với SLGL *Fasciola* spp., không có sự bắt cặp chéo với các loài sán khác. Kết quả tối ưu của phản ứng LAMP chẩn đoán SLGL được tóm tắt như sau:

Các yếu tố	Điều kiện tối ưu
Nồng độ Mg ²⁺	8 mM
Nhiệt độ phản ứng	63°C
Thời gian phản ứng	60 phút
Chất chỉ thị màu	MG 0,004%
Ngưỡng phát hiện	10 ⁻⁹ ng/μl ADN

Sản phẩm LAMP có thể quan sát bằng mắt thường sau khi bổ sung chất chỉ thị màu MG. Với phương pháp nhận biết này cho phép phương pháp LAMP dễ dàng được triển khai ngoài thực địa tại các cơ sở y tế. Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật LAMP trong nghiên cứu này là 10⁻⁹ ng/μl ADN, tương đương với 0,294 bản sao/phản ứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] WHO (2018), who.int/foodborne_trematode_infections/fascioliasis/fascioliasis_epidemiology/en/.

[2] A.M. Espino, C.M. Finlay (1994), "Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of excretory secretory antigens in humans with fascioliasis", *J. Clin. Microbiol.*, **32**, pp.190-193.

[3] A.M. Flanagan, et al. (2011), "Standardisation of a coproantigen reduction test (CRT) protocol for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*", *Veterinary Parasitology*, **176**, pp.34-42.

[4] M.M. Hassan, et al. (2001), "Evaluation of circulating Fasciola antigens in specific diagnosis of fascioliasis", *J. Egypt Soc. Parasitol.*, **31**, pp.271-279.

[5] M. Mezo, et al. (2004), "An ultrasensitive capture elisa for

detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3)", *Journal of Parasitology*, **90**, pp.845-852.

[6] D. Palmer, et al. (2014), "Evaluation of a copro-antigen ELISA to detect *Fasciola hepatica* infection in sheep, cattle and horses: Production animals", *Australian Veterinary Journal*, **92**, pp.357-361.

[7] T. Notomi, et al. (2015), "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects", *Journal of Microbiology*, **53(1)**, pp.1-5.

[8] T. Notomi, et al. (2000), "Loop-mediated isothermal amplification of DNA", *Nucleic Acids Research*, **28(12)**, p.e63.

[9] L. Ai, et al. (2011), "Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches", *Parasites & Vectors* [online], DOI: 10.1186/1756-3305-4-101.

[10] L. Ai, et al. (2010), "Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay", *Veterinary Parasitology*, **174(3-4)**, pp.228-233.

[11] J.M. Martínez-Pérez, et al. (2012), "Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep", *Veterinary Parasitology*, **190(1-2)**, pp.80-86.

[12] M. Martínez-Valladares, F.A. Rojo-Vázquez (2016), "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions", *Parasites & Vectors*, **9(1)**, DOI: 10.1186/s13071-016-1355-2.

[13] Sarunya Tedlongthong, et al. (2017), "Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay combined with malachite green as a rapid screening test for *Candidatus Mycoplasma haemominutum* infection in cats", *ScienceAsia*, **43**, pp.354-361.

Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP phát hiện nhanh vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở người

Trần Thị Thanh Huyền^{1*}, Đinh Đức Thọ², Phạm Thanh Hiền¹, Trần Văn Tuấn¹

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Cao đẳng Y Thái Nguyên

Ngày nhận bài 8/11/2019; ngày chuyển phản biện 15/11/2019; ngày nhận phản biện 12/12/2019; ngày chấp nhận đăng 25/12/2019

Tóm tắt:

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp khác nhau để phát hiện vi sinh vật gây bệnh, bao gồm cả những phương pháp truyền thống và phương pháp phân tử hiện đại. Tuy nhiên, trong chẩn đoán tiêu chảy do vi khuẩn *Escherichia coli*, các phương pháp phân lập trên môi trường chọn lọc, thử các tính chất sinh, hóa giúp phát hiện vi khuẩn *E. coli* nhưng không thể phân biệt giữa các vi khuẩn *E. coli* hội sinh cư trú bình thường ở đường ruột với các vi khuẩn *E. coli* mang gen độc lực gây bệnh. Bài báo này đề cập đến phương pháp LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) khuếch đại DNA với độ đặc hiệu và độ nhạy cao được ứng dụng để phát hiện nhanh vi khuẩn *E. coli* ở giới hạn phát hiện là 15 pg, cao gấp hơn 100 lần so với phương pháp PCR. Một bộ 4 cặp mồi đặc hiệu được thiết kế để khuếch đại đoạn gen *eae* là một trong những gen độc lực của vi khuẩn *E. coli* có kích thước 288 bp trong DNA genome vi khuẩn và với sự có mặt chất chỉ thị kim loại calcein ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$). Phản ứng diễn ra ở điều kiện đẳng nhiệt 60°C trong khoảng 30 đến 60 phút, sản phẩm phản ứng là các băng DNA phân bố giống như dạng bậc thang với kích thước thấp nhất là băng cơ sở 288 bp khi điện di trên gel agarose. Kết quả phản ứng có thể được quan sát bằng mắt thường do sự thay đổi màu của dung dịch phản ứng từ màu cam (âm tính) sang màu xanh huỳnh quang (dương tính). Do đó đây là một kỹ thuật nhạy và đặc hiệu, có khả năng phát hiện nhanh, chính xác vi khuẩn *E. coli* gây bệnh có mang gen độc tố *eae*. Phương pháp phát hiện này mở ra tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu cơ bản về y học và dược phẩm, vệ sinh môi trường, xét nghiệm điểm chăm sóc...

Từ khóa: calcein, chỉ thị kim loại, *E. coli*, LAMP, PCR, tiêu chảy.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Tiêu chảy là bệnh có thể gặp ở mọi lứa tuổi, ở người lớn bệnh thường ít nguy hiểm đến tính mạng nhưng gây ảnh hưởng lớn đến sức khỏe, khả năng lao động và sinh hoạt của người bệnh. Tiêu chảy rất nguy hiểm đối với trẻ em dưới 5 tuổi, đặc biệt là ở trẻ từ 0 đến 2 tuổi. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới, tỷ lệ mắc tiêu chảy trung bình ở trẻ em dưới 5 tuổi là trên 3 lần/trẻ em/năm. Tuy nhiên, ở một số nước đang phát triển, con số này có thể cao tới 12 lần/trẻ em/năm. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu cho biết, số lần bị tiêu chảy trong một năm đối với một trẻ là 2,2 lần. Đây là bệnh đứng thứ hai về tỷ lệ tử vong ở trẻ dưới 5 tuổi (sau bệnh nhiễm khuẩn đường hô hấp), trong đó hơn 80% số ca tử vong ở trẻ từ 0-2 tuổi [1, 2]. Nguyên nhân chính gây tử vong khi bị tiêu chảy là do mất nước và điện giải, tiếp theo là suy dinh dưỡng. Suy dinh dưỡng và tiêu chảy tạo thành một vòng xoắn bệnh lý: tiêu chảy dẫn đến suy dinh dưỡng và khi trẻ bị suy dinh dưỡng lại có nguy cơ bị tiêu chảy cao hơn [3].

Tác nhân chính gây bệnh là vi khuẩn *E. coli*, trong đó có nhiều nhóm gây bệnh khác nhau như STEC (shiga toxin producing *E. coli*), ETEC (enterotoxigenic *E. coli*), EPEC (enteropathogenic *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*), EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*), EaggEC (enteroaggregative *E. coli*) và DAEC (diffusely adherent *E. coli*) [4]. Vi khuẩn thường mang các gen độc lực khác nhau như *aggR* (EAEC), *ipaH* (EIEC), *elt* và *est* (ETEC) giúp chúng có thể bám vào niêm mạc ruột, giải phóng yếu tố tan máu hoặc độc tố ruột. Tuy nhiên, trong số các gen độc lực đó gen *eae* (*E. coli* attaching and effacing) mã hóa cho protein *intimin* được xem là gen phổ biến có mặt trong hầu hết các nhóm EPEC, EHEC nhưng không có mặt ở các vi khuẩn *E. coli* thuộc hệ vi khuẩn đường ruột thông thường [5]. Có rất nhiều phương pháp khác nhau để phát hiện sự có mặt của gen *eae* như PCR, real time PCR hoặc microarray..., tuy nhiên kết quả của các phương pháp này thường bị phụ thuộc vào kỹ thuật, thao tác tiến hành và sử dụng các thiết bị đắt tiền.

*Tác giả liên hệ: Email: huyentran0150@gmail.com

Rapid detection of *E. coli* causing diarrheal disease in human by using LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) method

Thi Thanh Huyen Tran^{1*}, Duc Tho Dinh²,
Thanh Hien Pham¹, Van Tuan Tran¹

¹University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²Thai Nguyen Medical College

Received 8 November 2019; accepted 25 December 2019

Abstract:

Nowadays, many techniques are used for detecting pathogenic agents, including both traditional methods and modern molecular techniques. However, pathogenic *Escherichia coli* are not distinguishable from other common strains due to their appearance on culture plates or by the results of the usual biochemical tests. In this study, a new method called LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) was applied to amplify DNA with high specificity and sensitivity at the detection limit of 15 pg, which was over 100 times higher than that of the PCR method. Four specific primers were designed to amplify the *eae* gene fragment - one of the toxic genes of *E. coli* with the length of 288 bp. Calcein (C₃₀H₂₆N₂O₁₃) is a fluorescent metal indicator for Magnesium detection. In this case, Calcein was initially quenched by manganese, then it emitted a yellowish-green fluorescence. In *eae* LAMP reaction, a large amount of DNA was synthesized, yielding a large pyrophosphate ion by-product. LAMP-generated pyrophosphate preferentially precipitated manganese, resulting in a complex and visible calcein-magnesium as bright green fluorescence. So a positive reaction was observed by a colour change from orange to green with the naked eyes after completion at 60°C for at least 30 min or under UV light detection. As the signal recognition is highly sensitive, this system enables visual discrimination of results without costly specialized equipment. This detection method reveals a great potential in basic research on medicine and pharmacy, environmental hygiene, point-of-care testing etc.

Keywords: calcein, diarrheal, *E. coli*, LAMP, metal indicator, PCR.

Classification number: 3.5

Năm 2000, Notomi và cộng sự đã phát triển một kỹ thuật mới khuếch đại DNA trên cơ sở nguyên lý khuếch đại của PCR nhưng có độ đặc hiệu và độ nhạy cao gấp nhiều lần so với PCR, quá trình khuếch đại DNA diễn ra ở điều kiện đẳng nhiệt nên không cần phải sử dụng các máy móc hiện đại [6]. Hiện nay, LAMP được xem là một phương pháp phổ biến sử dụng trong chẩn đoán nhanh các tác nhân virus, vi khuẩn và nấm. Với mong muốn tìm ra một phương pháp chẩn đoán nhanh nhưng vẫn đảm bảo độ chính xác, có thể tiến hành bằng các thiết bị đơn giản, dễ dàng áp dụng rộng rãi tại tuyến y tế cơ sở nhằm góp phần nâng cao hiệu quả trong phòng chống, kiểm soát và điều trị vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy ở người, chúng tôi đã lựa chọn kỹ thuật LAMP để phát hiện gen độc tố *eae* gây tiêu chảy.

Gen *eae* mã hóa cho protein intimin có trọng lượng phân tử là 94-97 kDa là yếu tố độc lực của EPEC cần thiết cho việc tạo tổn thương mô học niêm mạc ruột. Gen *eae* hiện diện ở tất cả các chủng EPEC, EHEC nhưng không có ở những dòng vi khuẩn *E. coli* thuộc hệ vi khuẩn đường ruột thông thường [2]. Đây được xem là một trong những chỉ thị phân tử để phát hiện ra các vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy ở người.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

- 25 mẫu vi khuẩn được phân lập từ mẫu phân của bệnh nhân tiêu chảy do Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên cung cấp.

- Các chủng vi khuẩn YTN1, YTN2 là các vi khuẩn *E. coli* không gây bệnh được cung cấp bởi Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y dược Thái Nguyên.

- Mồi nhân gen (5'-3'): mồi nhân gen *eae* bằng kỹ thuật PCR ký hiệu SK1/SK2 (mồi xuôi CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC; mồi ngược CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG) của vi khuẩn *E. coli* thiết kế bằng phần mềm Primer 3.

Mồi nhân gen *eae* bằng kỹ thuật LAMP: F3 (CGACGATTTGGTTCGTTGAA); B3 (TGTCATCGGT CATGTTGC); FIB (CAAAATGATCTGCTGACCAGGC TTTTAAAGCATTTATACAGTTCTGAAAGC); BIP (AC AGTGCACTACCACTTTTAGGTTTTTCATTTTAGTC AGTTTATTCGTGTGA) được thiết kế bằng phần mềm PrimerExplorer V4.

Phương pháp

Tách chiết DNA hệ gen của vi khuẩn: vi khuẩn sau khi được nuôi trong môi trường LB ở 28°C trong 18 giờ, thu sinh khối. Chuyển 1,5 ml dịch nuôi cấy vào ống eppendorf và ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 7 phút, thu tế bào. Tế bào được hòa tan trong 0,5 ml đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM

EDTA, pH 8), ly tâm thu tế bào [5]. Bổ sung 0,5 ml TE, 3 μ l RNase, 2 μ l lysozyme, trộn đều và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Thêm 30 μ l SDS 10%, 3 μ l proteinase K trộn đều, ủ ở 37°C trong 60 phút. Bổ sung 180 μ l 5 M NaCl, ủ ở 65°C trong 10 phút, ly tâm thu dịch nổi ở trên. Chiết DNA hai lần bằng hỗn hợp Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1), ly tâm thu pha trên. DNA genome được tủa trong cồn 70% ở -20°C trong 30 phút. Ly tâm thu tủa và làm khô, sau đó bổ sung 40 μ l TE để hòa tan DNA genome. Điện di kiểm tra sản phẩm DNA genome sau tách chiết trên gel 0,8% agarose.

Phản ứng PCR: để có thể khuếch đại đoạn gen *eae* bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi dựa trên trình tự đoạn gen *eae* trên genome của vi khuẩn *E. coli*.

Thành phần phản ứng PCR (25 μ l): 10x Taq polymerase buffer (Fermentas), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 mM dNTP, 100 μ M mồi xuôi, 100 μ M mồi ngược, 0,5 IU Taq polymerase, 50 ng DNA, dH₂O cho đến 25 μ l.

Chu trình nhiệt: (1) Biến tính DNA ở nhiệt độ 94°C trong 4 phút. (2) Khuếch đại gen *eae* trong 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: biến tính sợi khuôn DNA ở 94°C trong 30 giây. Bước 2: mồi bắt cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trên sợi khuôn ở 45°C trong 40 giây. Bước 3: tổng hợp kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 50 giây. (3) Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 5 phút 30 giây để tạo sợi DNA hoàn chỉnh và ủ mẫu ở 22°C.

Phản ứng LAMP: LAMP là phản ứng tự tổng hợp DNA vòng khi có mặt của *Bst* DNA polymerase ở điều kiện đẳng nhiệt. Phương pháp này sử dụng 2 cặp mồi khác nhau, vì thế sản phẩm khuếch đại rất đặc hiệu. Phản ứng có tốc độ nhanh, diễn ra trong khoảng thời gian ngắn, chỉ từ 30-60 phút.

Thành phần đệm LAMP 1X gồm (200 mM Tris HCl, pH 8,8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Triton 100X, 25 mM MnCl₂). Thành phần phản ứng (25 μ l): 5 M Betatin, 1X buffer LAMP, 25 mM dNTPs, 25 mM MgSO₄, 2 μ M B3 và F3, 20 μ M BIP và FIP, 8 U/ μ l *Bst* polymerase, 50 ng DNA và dH₂O đến thể tích cuối cùng. Chu trình nhiệt như sau: 64°C trong 60 phút, 80°C trong 10 phút và kết thúc ở 22°C. Sản phẩm LAMP được quan sát bằng điện di trên gel agarose 2% hoặc bằng mắt thường khi có bổ sung chỉ thị kim loại calcein trước phản ứng. Hỗn hợp calcein và Mn²⁺ được thêm vào trước phản ứng. Do sự có mặt của ion Mn²⁺, calcein liên kết với Mn²⁺ không phát quang, dung dịch có màu da cam. Khi phản ứng khuếch đại DNA xảy ra với sự có mặt của DNA đích, sản phẩm phụ là ion P₂O₇⁴⁻ được tạo thành sẽ kết hợp với ion Mg²⁺ tạo thành muối Mg₂P₂O₇, sau đó ion Mn²⁺ đẩy Mg²⁺ khỏi muối để tạo thành muối Mn₂P₂O₇ và giải phóng ion Mg²⁺. Mg²⁺ tự do trong dung dịch sẽ kết hợp với calcein tạo ra phức hợp calcein-Mg phát quang [7].

Xác định độ đặc hiệu của phản ứng LAMP

Để xác định độ đặc hiệu của phản ứng LAMP với các cặp mồi nhận biết gen *eae* của vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy, chúng tôi sử dụng các vi khuẩn YTN1, YTN2 là những vi khuẩn *E. coli* không gây bệnh được cung cấp bởi Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y dược Thái Nguyên, genome được tách chiết theo phương pháp giống như các mẫu bệnh phẩm đã trình bày ở trên để sử dụng làm đối chứng âm trong phản ứng LAMP.

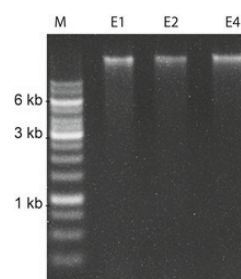
Xác định độ nhạy của phản ứng LAMP

Nồng độ DNA ban đầu được xác định bằng máy nanodrop, sau đó tiến hành pha loãng theo cơ số 10 đến khi đạt các nồng độ pha loãng DNA mong muốn. Xác định ngưỡng nồng độ DNA mà phản ứng vẫn diễn ra.

Kết quả và thảo luận

Tách DNA hệ gen của vi khuẩn

Với mục đích phát hiện vi khuẩn *E. coli* bằng phương pháp phân tử, sử dụng kỹ thuật PCR xác định sự có mặt của gen *eae* trong các chủng vi khuẩn nghiên cứu, trên cơ sở đó thiết lập phản ứng LAMP để phát hiện gen này. DNA của 25 mẫu vi khuẩn nghiên cứu được tách chiết theo phương pháp đã mô tả ở trên. Kết quả tách chiết DNA hệ gen được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% như hình 1 cho thấy, các băng DNA thu được sáng, rõ, không bị đứt gãy và hoàn toàn sạch. Chất lượng DNA đủ tiêu chuẩn để làm khuôn nhân các gen mong muốn bằng PCR và LAMP (hình 1).



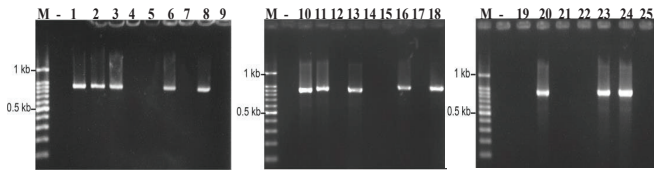
Hình 1. Sản phẩm DNA hệ gen tách chiết từ các chủng vi khuẩn *E. coli* được điện di trên gel agarose 0,8%. M: thang DNA chuẩn 1 kb; E1, E2, E4 là các chủng *E. coli* đại diện.

Phát hiện gen *eae* của các chủng vi khuẩn *E. coli* bằng kỹ thuật PCR

Để xác định sự có mặt của gen *eae*, 25 mẫu DNA của vi khuẩn *E. coli* được sử dụng làm khuôn chạy phản ứng PCR với cặp mồi SK1/SK2 được thiết kế đặc hiệu dựa trên trình tự gen *eae*, theo chu trình nhiệt được mô tả ở phần phương pháp. Sản phẩm sau phản ứng được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (hình 2).

Sản phẩm sau điện di cho kết quả 13 chủng E1, E2, E3,

E6, E8, E10, E11, E13, E16, E18, E20, E23 và E24 dương tính với gen *eae*, thể hiện các băng DNA sáng, kích thước khoảng 876 bp, phù hợp với những tính toán lý thuyết. Những chủng còn lại có kết quả âm tính với gen *eae*, không thấy xuất hiện băng DNA trên sản phẩm điện di.

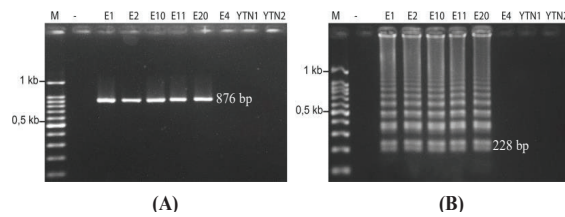


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *eae* 25 chủng vi khuẩn *E. coli*. M: thang DNA chuẩn, (-) mẫu đối chứng âm, 1-25 tương ứng với 25 mẫu vi khuẩn ký hiệu E1-E25.

Như vậy bằng phản ứng PCR, với DNA của 25 chủng vi khuẩn *E. coli* nghiên cứu và cặp mồi SK1/SK2 đã phát hiện được 13 trên tổng số 25 mẫu vi khuẩn *E. coli* dương tính với gen *eae*, chiếm tỷ lệ 52%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Svenungsson và cs (2000) khi nghiên cứu tiêu chảy do vi khuẩn *E. coli* ở người trưởng thành cũng cho kết quả tỷ lệ phát hiện gen *eae* là 56% [8]. Sehand và Layla (2010) với tỷ lệ phát hiện gen *eae* 63,1% trong mẫu phân tiêu chảy [9]. Kết quả tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *eae* của chúng tôi cao hơn so với một số tác giả đã công bố trước đó. Năm 2003, Nguyễn Vũ Trung và cs đã dùng kỹ thuật Multiplex PCR phát hiện tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *eae* ở trẻ em tiêu chảy tại Hà Nội chỉ là 3% [3]. Cũng dùng phương pháp Multiplex PCR, Bii và cs (2005) đã phát hiện gen *eae* trong vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy với tỷ lệ là 7% [10]. Hoàng Thị Bích Ngọc (2017) phát hiện gen *eae* trên *E. coli* gây tiêu chảy tại Hà Nội là 4,2% [11]. Như vậy, có thể thấy sự khác nhau về tỷ lệ mang gen *eae* của vi khuẩn *E. coli* giữa các nghiên cứu của các tác giả tại Việt Nam và trên thế giới. Sự khác nhau này có thể đến từ nhiều nguyên nhân như: đối tượng nghiên cứu của mỗi nhóm nghiên cứu thuộc các vùng dịch tễ khác nhau, hay sự khác nhau ở các nhóm tuổi nghiên cứu. Ngoài ra trong nghiên cứu của chúng tôi, với số lượng chỉ 25 mẫu nên không đủ để đại diện cho tỷ lệ mang gen này của vi khuẩn *E. coli* trong phân của bệnh nhân tiêu chảy tại Việt Nam.

Phát hiện gen *eae* của các chủng *E. coli* bằng kỹ thuật LAMP

Phản ứng LAMP được thực hiện với các cặp mồi được thiết kế trên trình tự gen *eae*. Lựa chọn ngẫu nhiên 5 mẫu dương tính và 1 mẫu âm tính với phản ứng PCR, 2 mẫu YTN1, YTN2 là các chủng vi khuẩn *E. coli* không gây bệnh được cung cấp bởi Trường Đại học Y dược Thái Nguyên làm đối chứng, với các thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt như mô tả ở trên. Sản phẩm phản ứng được phân tích trên gel agarose 2% cho kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Sản phẩm khuếch đại gen *eae* bằng PCR (A) và LAMP (B). M: thang DNA chuẩn; (-): đối chứng âm; E1, E2, E10, E11, E20 và E4: chủng vi khuẩn kiểm tra; YTN1, YTN2: chủng đối chứng không gây bệnh.

Từ kết quả trên cho thấy: các chủng E1, E2, E10, E11 và E20 cho kết quả dương tính với phương pháp PCR (876 bp) trên hình 3A và LAMP (228 bp) trên hình 3B. Hình ảnh trên bằng điện di hoàn toàn giống với mô tả của Notomi và cs (2000) [6]. Sản phẩm phản ứng LAMP xuất hiện các băng dạng bậc thang bắt đầu từ băng cơ sở có kích thước là 228 bp do sản phẩm DNA được khuếch đại với nhiều kích thước khác nhau. Ở giếng 2 là mẫu đối chứng âm không bổ sung DNA, 3 giếng cuối là chủng E4, YTN1 và YTN2 đều cho kết quả âm tính, không xuất hiện dải băng trên gel agarose sau điện di chứng tỏ bộ mồi LAMP là hoàn toàn đặc hiệu để phát hiện ra các chủng *E. coli* mang gen độc tố *eae*. Thêm vào đó, phản ứng LAMP sử dụng enzym *Bst* polymerase có hoạt tính tự tách chuỗi nên có thể khuếch đại gen *eae* ở điều kiện đẳng nhiệt khác với phương pháp PCR cần một chu trình biến thiên nhiệt nên sẽ mở ra hướng ứng dụng rộng hơn so với phương pháp PCR.

Giới hạn phát hiện gen *eae* của phản ứng LAMP

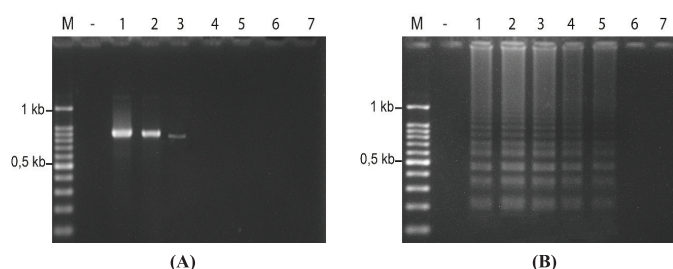
LAMP được đề cập là một phương pháp cực nhạy, giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP ở ngưỡng picogram (pg) hoặc femtogram (fg). Trong nghiên cứu này, để xác định giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP trong việc khuếch đại gen *eae* của vi khuẩn *E. coli*, DNA genome được pha loãng theo cơ số 10 với các nồng độ 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ... Nồng độ DNA genome ban đầu được xác định thông qua đo bằng máy nanodrop là 15 ng/μl. Các thí nghiệm được tiến hành với DNA khuôn ban đầu là 15 ng/μl, sau đó giảm dần nồng độ theo cấp số 10 từ 15 ng/μl đến 15 fg/μl. Tiến hành song song với phương pháp PCR để so sánh độ nhạy của 2 phương pháp trong cùng một nồng độ DNA. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Giới hạn phát hiện của PCR và LAMP.

Phương pháp	Hàm lượng ADN						
	15 ng	1,5 ng	0,15 ng	15 pg	1,5 pg	0,15 pg	15 fg
PCR	+	+	+	-	-	-	-
LAMP	+	+	+	+	+	-	-

(+): dương tính, (-): âm tính.

Kết quả bảng 1 cho thấy: cùng với nồng độ DNA khuôn như nhau và tiến hành so sánh độ nhạy phản ứng LAMP và PCR cùng khuếch đại gen *eae*, giới hạn phát hiện của phương pháp LAMP cao hơn rất nhiều so với phương pháp PCR. Giới hạn phát hiện gen *eae* bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi SK1/SK2 có thể phát hiện được ở mức độ pha loãng 10^{-3} , tương ứng với nồng độ DNA là 0,15 ng/ μ l (đường chạy số 3) nhưng vạch điện di tương đối mờ. Trong khi đó, nếu sử dụng phương pháp LAMP có thể phát hiện được ở độ pha loãng rất cao (10^{-5}), tương ứng với 1,5 pg/ μ l (đường chạy số 5), cao gấp hơn 100 lần so với phương pháp PCR (hình 4).



Hình 4. Giới hạn phát hiện (A): phản ứng PCR, (B): phản ứng LAMP. M(A): thang DNA chuẩn 1 kb; M(B): thang DNA chuẩn 100 bp; (-): đối chứng âm; 1: 15 ng/ μ l, 2: 1,5 ng/ μ l, 3: 0,15 ng/ μ l, 4: 15 pg/ μ l, 5: 1,5 pg/ μ l, 6: 0,15 pg/ μ l, 7: 15 fg/ μ l.

Như vậy bằng phương pháp LAMP với các cặp mồi được thiết kế đặc hiệu cho gen *eae*, chúng tôi đã phát hiện thành công gen *eae* ở nồng độ rất thấp là 1,5 pg/ μ l. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố của các tác giả khác khi sử dụng phương pháp LAMP để phát hiện các gen đích. Kuboki và cs (2003) khi nghiên cứu đơn bào trypanosome gây bệnh ngủ ở người và gia súc sử dụng phương pháp LAMP đã phát hiện thành công *T. brucei* PFR A ở giới hạn nồng độ 1 pg tổng DNA, trong khi giới hạn phát hiện bằng PCR là 100 pg [12]. Cũng dùng phương pháp LAMP để phát hiện nấm *Fusarium*, Niessen và Zudi công bố phát hiện được gen đích *gaoA* - gen mã hóa galactose oxidase ở nồng độ 2 pg [13]. Verma và cs (2017) phát hiện *Leishmania tropica* ở nồng độ 1 pg [14]. Năm 2010, tác giả Trần Thị Thanh Huyền đã dùng phương pháp LAMP phát hiện thành công vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trên cá Tra Việt Nam ở nồng độ 9,4 fg [15]. Engku và cs (2018) phát hiện *Vibrio cholerae* ở nồng độ 10 fg [16], thấp hơn gần 100 lần so với nghiên cứu của chúng tôi.

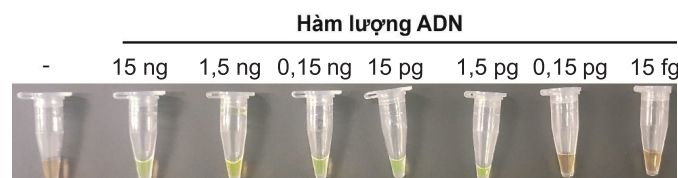
Từ nghiên cứu của chúng tôi và các công bố của các tác giả khác nhau cùng sử dụng kỹ thuật LAMP để phát hiện gen đích cho thấy, đây là phương pháp có độ nhạy cao, với giới hạn phát hiện ở mức rất thấp, phương pháp này cho độ nhạy cao gấp từ 10-100 lần so với các phương pháp PCR thông thường khi cùng phát hiện một gen đích. Do vậy, phương pháp LAMP có thể được sử dụng để phát hiện giai

đoạn sớm của bệnh, góp phần trong công tác phòng chống và điều trị tích cực cho bệnh nhân.

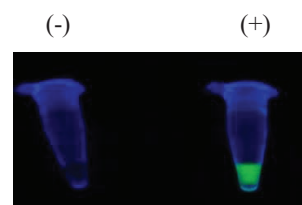
Phát hiện gen *eae* của phản ứng LAMP sử dụng chỉ thị calcein

Do hiệu quả khuếch đại DNA đích của phản ứng LAMP rất cao, dẫn đến việc rất dễ lấy nhiễm DNA trong phòng thí nghiệm, do đó chúng tôi thiết kế một hệ thống phản ứng kín trong đó toàn bộ phản ứng diễn ra trong 1 tube, kết quả của phản ứng được quan sát bằng mắt thường mà không phải điện di trên gel agarose như phương pháp PCR.

Ban đầu, mỗi ống phản ứng LAMP được bổ sung 1 μ l calcein 1M, sau đó chạy phản ứng LAMP theo chu trình đẳng nhiệt ở 60°C trong vòng 60 phút. Kết quả phản ứng được quan sát dưới ánh sáng thường (hình 5) hoặc soi dưới đèn UV (hình 6).



Hình 5. Kết quả phát hiện sản phẩm phản ứng LAMP bằng chỉ thị màu calcein dưới ánh sáng thường. (-): mẫu đối chứng âm, nồng độ DNA giảm từ 15 ng đến 15 fg.



Hình 6. Kết quả phát hiện sản phẩm LAMP bằng chỉ thị calcein dưới ánh sáng UV. (-): phản ứng âm tính, (+): phản ứng dương tính.

Khi thêm calcein vào các ống phản ứng, dưới ánh sáng thường những mẫu dương tính dung dịch sau phản ứng sẽ phát quang và chuyển sang màu xanh lá cây, những mẫu âm tính dung dịch sau phản ứng không phát quang và vẫn có màu vàng cam. Dưới ánh sáng UV, những mẫu dương tính dung dịch sau phản ứng có màu xanh lá cây rất sáng, mẫu âm tính không phát sáng và có màu đen. Kết quả thay đổi màu sắc thấy rõ ở các nồng độ DNA pha loãng giảm dần từ 15 ng đến 1,5 pg. Kết quả này hoàn toàn trùng khớp với kết quả phát hiện sản phẩm LAMP bằng điện di trên gel agarose 2% (hình 3B).

Kết luận

Bằng kỹ thuật PCR chúng tôi đã phát hiện được 13/25 mẫu vi khuẩn *E. coli* mang gen *eae* gây tiêu chảy ở người.

Tuy nhiên, để xác định sự có mặt của gen *eae*, phương pháp LAMP tỏ ra ưu việt hơn PCR ở tính đặc hiệu khi sử dụng 4 cặp mồi nhận biết 6 trình tự trên gen *eae* và có độ nhạy cao hơn 100 lần so với phương pháp PCR. Sử dụng phản ứng PCR có thể phát hiện được DNA khuôn ở nồng độ 0,15 ng/ μ l, trong khi đó bằng phản ứng LAMP có thể phát hiện sự có mặt của gen *eae* ở nồng độ rất thấp là 1,5 pg/ μ l. Calcein là chỉ thị kim loại được thêm vào từ đầu phản ứng, giúp cho việc đọc kết quả phản ứng LAMP bằng mắt thường mà không cần điện di như PCR, các phản ứng dương tính dung dịch phản ứng sẽ chuyển sang màu xanh, trong khi phản ứng âm tính có màu cam. Do đó, có thể ứng dụng phương pháp này để xác định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn *E. coli* một cách nhanh chóng và hiệu quả, sản phẩm của phản ứng có thể được phát hiện bằng mắt thường dưới sự có mặt của một loại chỉ thị kim loại là calcein mà không cần phải điện di trên agarose.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện bằng kinh phí từ đề tài mã số TN.18.14 của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên và có sử dụng một số trang thiết bị của Phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Bộ Y tế (2009), *Quyết định số 4121/QĐ-BYT ngày 28/10/2009, ban hành kèm theo Tài liệu hướng dẫn xử trí tiêu chảy ở trẻ em.*

[2] <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.

[3] Nguyễn Vũ Trung, Lê Huy Chính, Lê Văn Phùng, Andrej Weintraub (2003), “Phát triển và ứng dụng kỹ thuật PCR đa mồi trong chẩn đoán *E. coli* gây tiêu chảy từ phân”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **23(3)**, tr.7-14.

[4] A. Konaté, R. Dembélé, A. Kagambèga, I. Soulama, W.A.D. Kaboré, E. Sampo, H. Cissé, A. Sanou, S. Serme, C. Zongo, A.M. Fody, N.K. Guessennnd, A.S. Traoré, A. Gassama-Sow, N. Barro (2017), “Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia Coli* in children less than 5 years of age with diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso”, *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, **7(3)**, pp.220-228.

[5] Z. Xue-han, Y. Qing, L. Ya-dong, L. Bin, I. Renata, H. Kong-wang (2013), “Development of a LAMP assay for rapid detection of different intimin variants of attaching and effacing microbial pathogens”, *J. Med. Microbiol.*, **62(11)**, pp.1665-1672.

[6] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase (2000), “Loop-mediated isothermal amplification of DNA”, *Acid Nucleic Res.*, **28(12)**, E63.

[7] N. Tomita, Y. Mori, H. Kanda, T. Notomi (2008), “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products”, *Nat. Protoc.*, **3(5)**, pp.877-882.

[8] B. Svenungsson, A. Lagergren, E. Ekwall, B. Evengard, K.O. Hedlund, A. Karnell, S. Lofdahl, L. Svensson, A. Weintraub (2000), “Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year pro-spective study in a Swedish clinic for infectious diseases”, *Clin. Infect. Dis.*, **30**, pp.770-778.

[9] K.A Sehand, I.F.S Layla (2010), “Identification of different categories of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool samples by using Multiplex PCR Technique”, *Asian Journal of Medical Sciences*, **2(5)**, pp.237-243.

[10] C.C. Bii, H. Taguchi, T.T. Ouko, W. Muita, N. Wamae, S. Kamiya (2005), “Detection of virulencerelated genes by Multiplex PCR in multidrug-resistant diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates from Kenya and Japan”, *Epidemiol. Infect.*, **133(4)**, pp.627-633.

[11] Hoàng Thị Bích Ngọc (2017), *Xác định sự phân bố và một số đặc điểm sinh học phân tử của nhóm Escherichia coli gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi tại địa bàn Hà Nội*, Luận án tiến sỹ y học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

[12] N. Kuboki, N. Inoue, T. Sakurai, Di Cello, F. Grab, D.J. Suzuki, C.I. Igarashi (2003), “Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes”, *J. Clin. Microbiology*, **41**, pp.5517-5524.

[13] L. Niessen and F.V. Zudi (2010), “Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay”, *International Journal of Food Microbiology*, **140**, pp.183-191.

[14] S. Verma, R. Singh, V. Sharma, R.A. Bumb, N.S. Negi, V. Ramesh, P. Salotra (2017), “Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of *Leishmania* infection”, *BMC Infect Dis.*, **17(1)**, pp.223-235.

[15] Trần Thị Thanh Huyền (2010), *Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) để xác định vi khuẩn Edwardsiella ictaluri gây bệnh gan thận mũ trên cá tra*, Luận án tiến sĩ khoa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

[16] N.S. Engku, N.A.B. Nurul, P.C. Foo, M.R. Mohd Ali, M. Mohamed, C.Y. Yean (2018), “An ambient temperature stable and ready-to-use loop-mediated isothermal amplification assay for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in outbreak settings”, *Acta Trop.*, **182**, pp.223-231.

Mối liên quan giữa mức độ kháng carbapenem và sự xuất hiện gen mã hóa carbapenemase của các chủng *Acinetobacter baumannii* phân lập tại một số bệnh viện

Lưu Thị Vũ Nga^{1*}, Phạm Hồng Nhung², Trần Thị Vân Phương³, Phạm Duy Thái³, Trần Huy Hoàng³

¹Bệnh viện Thanh Nhàn

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Ngày nhận bài 2/4/2020; ngày chuyển phân biên 6/4/2020; ngày nhận phân biên 4/5/2020; ngày chấp nhận đăng 7/5/2020

Tóm tắt:

Bên cạnh các yếu tố độc lực, khả năng đề kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* đã khiến chúng trở thành căn nguyên gây nhiễm khuẩn bệnh viện thường gặp nhất. Ở *A. baumannii*, kháng carbapenem chủ yếu do carbapenemase. Trong nghiên cứu này, 144 chủng *A. baumannii* phân lập từ 9 bệnh viện thuộc 3 miền ở Việt Nam được nghiên cứu để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh và tìm mối liên quan giữa mức độ kháng carbapenem và sự xuất hiện một số gen mã hóa carbapenemase. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 7/9 kháng sinh bị kháng trên 70,8%; 83,3% số chủng kháng cả 3 kháng sinh thuộc nhóm carbapenem với MIC₅₀, MIC₉₀ lần lượt là 32-64 µg/ml và ≥64 µg/ml. 100% số chủng nhạy cảm colistin với MIC₅₀ là 0,25 µg/ml và MIC₉₀ là 0,5 µg/ml. Các chủng chỉ mang gen *bla*_{OXA-51} có tỷ lệ đề kháng kháng sinh và MIC thấp hơn nhiều so với các chủng có ≥2 gen mã hóa carbapenemase (với p<0,01). 100% các chủng có *bla*_{OXA-23} và chủng mang *bla*_{NDM-1} kháng carbapenem và với MIC rất cao. Kết luận: có mối liên quan giữa mức độ kháng carbapenem và sự xuất hiện của gen *bla*_{OXA-23} và *bla*_{NDM-1}. Colistin trở thành “vũ khí” cuối cùng trong điều trị nhiễm trùng do *A. baumannii* đa kháng.

Từ khóa: *A. baumannii*, MIC carbapenem, MIC colistin.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Acinetobacter baumannii được xác định là một trong những căn nguyên gây nhiễm khuẩn bệnh viện thường gặp nhất. Cùng với mức độ đề kháng kháng sinh ngày càng cao, *A. baumannii* kháng carbapenem được Tổ chức Y tế thế giới xếp vào nhóm vi khuẩn ưu tiên số 1 hiện nay trong kiểm soát và điều trị [1]. Kháng kháng sinh đang là một thách thức trong điều trị nhiễm khuẩn do *A. baumannii*. Tỷ lệ tử vong liên quan đến nhiễm khuẩn do *A. baumannii* đa kháng dao động từ 29-64% [2].

A. baumannii có thể đề kháng với tất cả các kháng sinh hiện có sử dụng trên lâm sàng do có cơ chế đề kháng phong phú. Tuy nhiên, sinh enzyme carbapenemase vẫn là cơ chế kháng carbapenem chủ yếu ở *A. baumannii*. Nhiều loại carbapenemase nhóm A, B, D đã được tìm thấy ở *A. baumannii* [3].

Tại Việt Nam, khả năng gây bệnh và mức độ kháng kháng sinh của *A. baumannii* đang gia tăng đáng báo động [4, 5]. Một số gen mã hóa carbapenemase ở *A. baumannii*

thường gặp là *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} [6, 7]. Ngoài các bệnh viện tuyến trung ương, một số bệnh viện tuyến tỉnh và khu vực cũng đã xuất hiện các chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{NDM-1} và phối hợp với nhiều hơn 2 gen mã hóa carbapenemase khác trên một chủng [4]. Do hoạt tính thủy phân kháng sinh của từng loại carbapenemase khác nhau nên mức độ đề kháng kháng sinh có thể khác nhau. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định MIC của một số kháng sinh với các chủng *A. baumannii* và tìm mối liên quan giữa mức độ kháng carbapenem và sự xuất hiện một số gen mã hóa carbapenemase.

Phương pháp nghiên cứu

Chủng vi khuẩn

144 chủng *A. baumannii* phân lập được ở 9 bệnh viện của 3 miền: Bắc (Thanh Nhàn, Xanh Pôn, Bắc Giang, 108), Trung (Huế, Nghệ An, Hà Tĩnh), Nam (Chợ Rẫy, Nhi đồng) (năm 2016).

Các chủng được định danh bằng thanh định danh API-20NE (BioMerieux - Pháp).

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

Association of carbapenem resistance levels with the presence of carbapenemase coding genes among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from some hospitals

Thi Vu Nga Luu^{1*}, Hong Nhung Pham²,
Thi Van Phuong Tran³,
Duy Thai Pham³, Huy Hoang Tran³

¹Thanh Nhan Hospital

²Hanoi Medical University

³National Institute of Hygiene and Epidemiology

Received 2 April 2020; accepted 7 May 2020

Abstract:

In addition to virulence factors, antibiotic resistance has helped strains of *Acinetobacter baumannii* become one of the most common agents of hospital-acquired infections. In *A. baumannii*, carbapenem resistance is mainly mediated by carbapenemase. In this study, 144 strains of *A. baumannii* isolated from 9 hospitals in representing 3 regions of Vietnam were studied to detect the minimum inhibitory concentration (MIC) and find an association between carbapenem resistance levels and the appearance of some carbapenemase coding genes. Results: more than 70.8% of the isolated were resistant to 7/9 antibiotics tested; 83.3% strains were resistant to 3 carbapenem antibiotics with MIC₅₀ and MIC₉₀ values were 32-64 µg/ml and ≥64 µg/ml, respectively; 100% strains were susceptible to colistin (MIC₅₀=0.25 µg/ml and MIC₉₀=0.5 µg/ml). Strains with only *bla*_{OXA-51} showed much lower rates of antibiotic resistance and MIC than those with ≥2 carbapenemase genes (p<0.01). 100% strains carrying *bla*_{OXA-23} and *bla*_{NDM-1} were resistant to carbapenem with very high MIC values. Conclusion: there is an association between carbapenem resistance and the appearance of gene *bla*_{OXA-23} and *bla*_{NDM-1}. Colistin is the last resort for the treatment of multidrug-resistant *A. baumannii*.

Keywords: *A. baumannii*, MIC carbapenem, MIC colistin.

Classification number: 3.5

Tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn

Xác định MIC của các kháng sinh: imipenem, meropenem, doripenem, ceftazidime, cefepime, levofloxacin, amikacin, minocycline và colistin với các chủng *A. baumannii*.

Đối với các kháng sinh imipenem, meropenem, doripenem, ceftazidime, cefepime, levofloxacin, amikacin, minocycline sử dụng phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch và phương pháp vi pha loãng đối với colistin theo hướng dẫn của Viện Chuẩn thức xét nghiệm lâm sàng Hoa Kỳ (CLSI M07-A10) [5]. Kết quả MIC được phiên giải theo tiêu chuẩn của CLSI M100 S28 [6].

Kỹ thuật xác định MIC của colistin được thực hiện trên đĩa 96 giếng tiêu chuẩn - đáy tròn được làm bằng polypropylene (Hãng Corning) và sử dụng bột kháng sinh colistin sulfate salt (Sigma) cho thử nghiệm. *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 [6], *E. coli* NCTC 13846 dương tính với *mcr1* (MIC colistin là 4 µg/ml) được sử dụng để kiểm tra chất lượng [7].

Kỹ thuật PCR phát hiện gen kháng carbapenem

Kỹ thuật PCR được sử dụng để phát hiện một số gen mã hóa carbapenemase: *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM}.

Sử dụng các đoạn môi đặc hiệu, chu trình nhiệt và các bước tiên hành như đã được mô tả trong các nghiên cứu trước đây [8, 9]. Chứng dương cho gen là ADN khuôn mẫu tách chiết từ các chủng vi khuẩn *A. baumannii* mang các gen kháng carbapenem đã được xác định qua phản ứng PCR và sản phẩm khuếch đại được giải trình tự và khẳng định trên NCBI [10].

Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được quản lý bằng phần mềm excel, tính tỷ lệ %, kết quả được thể hiện qua các bảng và biểu đồ.

Địa điểm nghiên cứu

Phòng Kháng kháng sinh - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Trường Đại học Y Hà Nội thông qua.

Kết quả

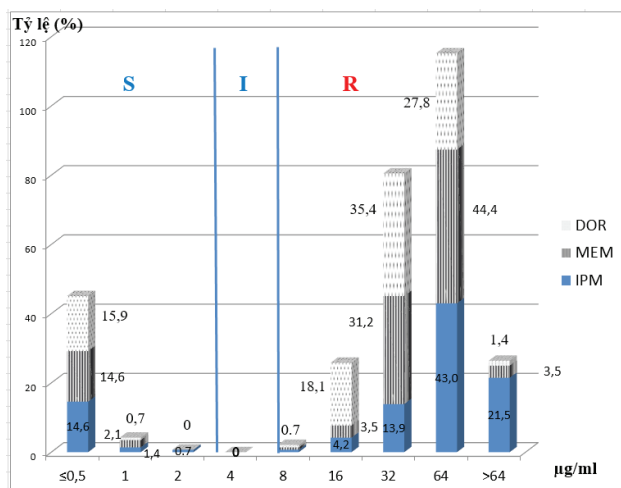
Tổng số 144 chủng *A. baumannii* thu thập tại 9 bệnh viện bao gồm: Thanh Nhàn (n=22), Xanh Pôn (n=17), Bắc Giang (n=13), Nghệ An (n=10), Hà Tĩnh (n=15), Huế (n=23), Chợ Rẫy (n=14), 108 (n=15), Nhi đồng (n=15) được sử dụng cho nghiên cứu, kết quả cho thấy:

7/9 kháng sinh đã bị kháng từ ≥70,8% và MIC₅₀, MIC₉₀ rất cao; minocyclin có tỷ lệ kháng chưa cao (21,5%) nhưng tỷ lệ trung gian là 13,2% nên tỷ lệ nhạy cảm chỉ là 65,3%. 100% số chủng còn nhạy cảm với colistin (bảng 1).

Bảng 1. MIC của kháng sinh với chủng *A. baumannii*.

Kháng sinh	Dải MIC µg/ml (n=144)	MIC ₅₀ µg/ml (n=144)	MIC ₉₀ µg/ml (n=144)	Tỷ lệ (%)		
				R	I	S
Imipenem	0,025->64	64	>64	83,3	0	16,7
Meropenem	0,06->64	32	64	83,3	0	16,7
Doripenem	0,015->64	32	64	83,3	0	16,7
Ceftazidime	8->128	128	>128	85,4	1,4	13,2
Cefepim	2->128	128	>128	84,0	1,4	14,6
Amikacin	0,5->256	>256	>256	70,8	7,6	21,6
Levofloxacin	0,06->64	64	>64	83,3	4,2	12,5
Minocyclin	0,25-32	2	16	21,5	13,2	65,3
Colistin	<0,25-1	0,25	0,5	0,0	0,0	100

Ghi chú: S: nhạy cảm; I: trung gian; R: kháng.



Hình 1. Phân bố dải giá trị MIC của các kháng sinh carbapenem.
IPM: imipenem, MEM: meropenem, DOR: doripenem.

Hình 1 cho thấy, đối với các chủng còn nhạy cảm với carbapenem, MIC ≤ 0,5 µg/ml là chủ yếu. Đối với các chủng đề kháng, MIC = 32-64 µg/ml là chủ yếu; MIC của doripenem thấp hơn imipenem và meropenem, tỷ lệ doripenem có MIC = 16 µg/ml là 18,1% so với 4,2% và 3,5% của imipenem và meropenem. Tỷ lệ imipenem có MIC > 64 µg/ml là nhiều nhất (21,5% so với 3,5% và 1,4% của meropenem và doripenem).

Bảng 2. Tỷ lệ gen mã hóa carbapenemase ở các chủng *A. baumannii*.

Gen	OXA-51	OXA-23	OXA-58	NDM-1	OXA-24, IMP, SIM, GIM, VIM, SPM
<i>A. baumannii</i> (n=114)	144/144 (100%)	115/144 (79,9%)	8/144 (5,6%)	9/144 (6,3%)	0/144 (0%)

Bảng 2 cho thấy, 100% số chủng mang gen *bla*_{OXA-51}; 79,9% số chủng mang gen *bla*_{OXA-23}; số chủng mang gen *bla*_{OXA-58} và *bla*_{NDM-1} chiếm tỷ lệ thấp; không có chủng nào mang gen OXA-24, IMP, SIM, GIM, VIM, SPM.

Bảng 3. Mức độ đề kháng kháng sinh của các chủng mang gen mã hóa carbapenemase.

Gen mã hóa carbapenemase	Số lượng (tỷ lệ %)	Tỷ lệ (%) đề kháng kháng sinh							
		IPM	MEM	DOR	CAZ	CFP	LEV	AK	MI
<i>bla</i> _{OXA-51} *	23 (16,0)	4,3	4,3	4,3	13,0	4,3	21,7	8,7	8,7
Có ≥ 2 gen	121 (84,0)	98,4	98,4	98,4	99,2	99,2	95,0	82,7	21,5
p		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Ghi chú: *: chỉ mang *bla*_{OXA-51}; IPM: imipenem, MEM: meropenem, DOR: doripenem, CAZ: ceftazidime, CFP: cefepime, LEV: levofloxacin, AK: amikacin, MI: minocycline.

Bảng 3 cho thấy, 16,0% số chủng chỉ mang gen *bla*_{OXA-51} có tỷ lệ đề kháng kháng sinh thấp hơn nhiều so với các chủng có ≥ 2 gen mã hóa carbapenemase (với p < 0,01).

Bảng 4. Giá trị MIC của carbapenem ở các chủng mang gen mã hóa carbapenemase.

Các gen mã hóa carbapenemase	Số lượng gen và tỷ lệ %	MIC ≤ 2 µg/ml			MIC = 8-32 µg/ml			MIC ≥ 64 µg/ml		
		IPM	MEM	DOR	IPM	MEM	DOR	IPM	MEM	DOR
<i>bla</i> _{OXA-51} *	23 16,0	22 95,7	22 95,7	22 95,7	1 4,3	1 4,3	1 4,3			
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58}	2 1,4	2 100	2 100	2 100						
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-23}	106 73,6				25 23,6	46 43,4	74 69,8	81 76,4	60 56,6	32 30,2
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58} + <i>bla</i> _{OXA-23}	4 2,8				1 25,0	2 50,0	4 100	3 75,0	2 50,0	
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{NDM-1}	2 1,4				1 50,0	1 50,0	1 50,0	1 50,0	1 50,0	1 50,0
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{NDM-1}	5 3,5							5 100	5 100	5 100
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58} + <i>bla</i> _{NDM-1}	2 1,4				1 50,0	1 50,0	1 50,0	1 50,0	1 50,0	1 50,0

Ghi chú: *: chỉ mang *bla*_{OXA-51}; IPM: imipenem, MEM: meropenem, DOR: doripenem.

Bảng 4 cho thấy, các chủng chỉ có *bla*_{OXA-51} hoặc *bla*_{OXA-51}+*bla*_{OXA-58} còn nhạy cảm tốt với carbapenem (95,7% với MIC ≤ 2 µg/ml). 100% các chủng có *bla*_{OXA-23} kháng carbapenem và tỷ lệ MIC ≥ 64 µg/ml cao. Các chủng có *bla*_{NDM-1} khi kết hợp với các gen khác thì khả năng kháng carbapenem là 100%.

Bảng 5. Phân bố dải giá trị MIC của colistin.

	MIC (µg/ml)				
	<0,25	0,25	0,5	1,0	≥2
Tần số	47	71	24	2	0
Tỷ lệ (%)	32,6	49,3	16,7	1,4	0

Bảng 5 cho thấy, phân bố dải MIC colistin từ <0,25-1 µg/ml. 1/3 số chủng có MIC<0,25 µg/ml, 1/2 số chủng có MIC=0,25 µg/ml và chưa có chủng nào kháng colistin.

Bàn luận

144 chủng *A. baumannii* được nghiên cứu với 9 loại kháng sinh được thử nghiệm, kết quả là 7/9 kháng sinh đã bị kháng từ ≥70,8% và MIC₅₀, MIC₉₀ rất cao (MIC₅₀ và MIC₉₀ của 3 kháng sinh carbapenem lần lượt là 32-64 µg/ml và ≥64 µg/ml; ceftazidime, cefepime là 128 µg/ml và >128 µg/ml; levofloxacin là 64 µg/ml và >64 µg/ml; amikacin đều >256 µg/ml). Minocyclin có tỷ lệ kháng chưa cao (21,5%) nhưng tỷ lệ trung gian là 13,2% nên tỷ lệ nhạy cảm chỉ là 65,3%. 100% số chủng nhạy cảm với colistin.

Hiện tại, *A. baumannii* đã phát triển đề kháng với hầu hết các kháng sinh hiện có và đa kháng kháng sinh (MDR) được ghi nhận rộng rãi. MDR là kiểu đề kháng rất thường gặp ở *A. baumannii* [2, 5]. Tỷ lệ MDR ở *A. baumannii* thuộc các nước OECD (Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế) dao động từ 27,3-86,5% và ở các nước không phải OECD là 69,9-90,8% [2]. MDR ở *A. baumannii* cao hơn nhiều *P. aeruginosa* (82 so với 42,8%) [11]. Điều này được lý giải bởi các yếu tố quyết định đề kháng kháng sinh ở *A. baumannii* thường được kết hợp trong các yếu tố di truyền di động, như trình tự chèn (Insertion sequence - IS), transposon, gen cassette, integron và cụm gen kháng (Resistance island - RI) [3]. Integron là cơ chế di truyền cho phép vi khuẩn thích nghi, phát triển và đặc biệt là phát triển tính đề kháng kháng sinh thông qua việc thu nhận, lưu giữ và biểu hiện của các gen mới. Nhiều nghiên cứu cho thấy integron có vai trò quan trọng trong phát triển tính MDR ở *A. baumannii*. Integron có liên quan đáng kể với khả năng đề kháng một số kháng sinh nhất định, bao gồm beta-lactam, aminoglycosides, quinolones [12].

Tỷ lệ kháng kháng sinh trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự mức độ kháng của các chủng *A. baumannii* ở châu Á [8]: trong số 253 *A. baumannii*, 82,5% kháng carbapenem; tỷ lệ kháng với các kháng sinh khác (ngoại trừ polymyxin) cũng rất cao: 86,5% (ceftazidime), 76,2% (gentamicin), 89,7% (ciprofloxacin), 86,1% (piperacillin-tazobactam).

Tỷ lệ và mức độ kháng kháng sinh ở nghiên cứu của chúng tôi cao hơn kết quả nghiên cứu trên các chủng *A. baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết ở một số bệnh viện thuộc 3 miền của Việt Nam năm 2011-2012 [9]: tỷ lệ kháng carbapenem là 83,3 so với 51,2%; MIC₅₀ và MIC₉₀ của carbapenem tương ứng là 32-64 và ≥64 µg/ml so với 8 và 16 µg/ml. Như vậy, đã có sự phát triển mức độ kháng kháng sinh rất nhanh theo thời gian ở các chủng *A. baumannii*.

Theo một phân tích về mức độ kháng kháng sinh của *A. baumannii* toàn cầu: chỉ trong 11 năm (2006-2016), tỷ lệ đề kháng của *A. baumannii* đối với imipenem đã tăng từ 23,8 lên 73,9% ở các nước OECD. Sự gia tăng tỷ lệ kháng kháng sinh ở các nước OECD nhanh hơn so với các nước không thuộc OECD trong 11 năm qua. Hiện nay, tỷ lệ này gần tương tự nhau (73,9 và 77,8%), các nước đều phải đối mặt với mức độ nghiêm trọng của tình trạng đề kháng kháng sinh [2].

10 năm trước đây, carbapenem là kháng sinh được sử dụng như là lựa chọn cuối cùng cho điều trị trực khuẩn Gram âm đa kháng. Nhưng hiện nay, các kháng sinh này đã gần như không còn tác dụng với *A. baumannii*. Trong nghiên cứu này, cả 3 kháng sinh carbapenem là imipenem, meropenem, doripenem đều đã bị kháng 83,3%; MIC₅₀ (32-64 µg/ml) và MIC₉₀ (≥64 µg/ml) cao hơn rất nhiều (≥16 lần) so với tiêu chuẩn nhạy cảm. Đối với các chủng còn nhạy cảm với carbapenem, MIC≤0,5 µg/ml là chủ yếu; không có chủng nào MIC ở mức độ trung gian. Còn đối với các chủng đề kháng, MIC=32-64 µg/ml là chủ yếu. Tuy nhiên, trong 3 kháng sinh nhóm carbapenem thì doripenem có MIC thấp hơn (=16 µg/ml) là 18,1% so với 4,2% và 3,5% của imipenem và meropenem. Trong khi, tỷ lệ imipenem có MIC>64 µg/ml là nhiều nhất (21,5 so với 3,5 và 1,4% của meropenem và doripenem). Điều này là phù hợp do doripenem ít bị thủy phân bởi nhiều loại beta-lactamase nhóm A, C, D so với imipenem và meropenem; thủy phân doripenem bởi beta-lactamsae chậm hơn từ 2 đến 150 lần so với imipenem ngoại trừ SPM-1 [13].

Kết quả xác định gen mã hóa carbapenemase: 100% số chủng mang gen *bla*_{OXA-51}, 79,9% chủng mang gen *bla*_{OXA-23}. Gen *bla*_{OXA-58} và *bla*_{NDM-1} chiếm tỷ lệ thấp (5,6 và 6,3%). Không có chủng nào mang gen *bla*_{OXA-24}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{VIM}. Các chủng chỉ có *bla*_{OXA-51} (16,0%) có tỷ lệ kháng kháng sinh thấp hơn nhiều so với các chủng có ≥2 gen mã hóa carbapenemase (với p<0,01) [ngoại trừ chủng mang 2 gen *bla*_{OXA-51}+*bla*_{OXA-58} (1,4%) còn nhạy cảm 100% với carbapenem]. 100% các chủng có *bla*_{OXA-23} kháng carbapenem và tỷ lệ MIC≥64 µg/ml cao. Các chủng có *bla*_{NDM-1} khi kết hợp với các gen khác thì khả năng kháng carbapenem là 100%.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự một số nghiên cứu khác. Gen *bla*_{OXA-51} nằm trên nhiễm sắc thể, là gen nội tại tự nhiên của *A. baumannii* và nó thường không dẫn đến kháng carbapenem trừ khi có một trình tự chèn -*ISAbal* được đưa vào khu vực promoter và gây quá biểu hiện của gen *bla*_{OXA-51} [14]. Tuy nhiên, tỷ lệ *bla*_{OXA-51} có *ISAbal* thường thấp, nên các chủng chỉ có *bla*_{OXA-51} thường vẫn nhạy cảm tốt với carbapenem [15]. Tương tự OXA-51, OXA-58 ở *A. baumannii* có hoạt tính thủy phân carbapenem yếu, nên các chủng nếu chỉ có *bla*_{OXA-58} thường vẫn nhạy cảm với carbapenem.

Ngược lại, OXA-23 là loại carbapenemase thường gặp nhất ở *Acinetobacter* kháng carbapenem trên toàn thế giới. Khác với *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} thường có *ISAbal* ở vùng promoter và có khả năng đề kháng mạnh với carbapenem, còn

đối với chủng không có *ISAbal* thì có thể vẫn nhạy cảm với carbapenem [15].

Gen *bla_{NDM-1}* ngày càng được phát hiện nhiều ở các chủng *A. baumannii* trên toàn thế giới. Ở *Acinetobacter*, *bla_{NDM-1}* thường nằm trong transposon hỗn hợp *Tn125* với trình tự chèn *ISAbal25* ở 2 đầu của gen. Các chủng chứa gen *bla_{NDM-1}* có *ISAbal25* có MIC đối với các kháng sinh carbapenem cao hơn rất nhiều so với chủng không có *ISAbal25* [16].

Hiện nay, *A. baumannii* đã đề kháng được với hầu hết các kháng sinh hiện có, chỉ duy nhất colistin còn tác dụng. Trong nghiên cứu này, chưa phát hiện chủng *A. baumannii* kháng colistin và phân bố dải MIC của colistin từ <0,25-1 µg/ml; 1/3 số chủng có MIC <0,25 µg/ml, MIC₅₀=0,25 µg/ml, MIC₉₀=0,5 µg/ml. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự một nghiên cứu trên các chủng *A. baumannii* phân lập tại Khoa Điều trị tích cực, Bệnh viện Bạch Mai (2011-2015) [13]: MIC₉₀ colistin từ 0,19-0,5 µg/ml, thấp hơn so với *P. aeruginosa* (1-2 µg/ml). Tuy nhiên, cũng cần lưu rằng đã xuất hiện chủng *A. baumannii* có MIC=1 µg/ml và khi sử dụng ngày càng nhiều colistin hơn, rất có thể sẽ xuất hiện các chủng có giá trị MIC cao hơn. Đột biến kháng colistin rất dễ xảy ra khi điều trị bằng colistin ở *A. baumannii* và *P. aeruginosa*. Do vậy, giám sát MIC colistin là rất quan trọng để có thể tính toán liều điều trị cho phù hợp.

Theo hiểu biết của chúng tôi, chưa có nghiên cứu nào ở Việt Nam công bố về đề kháng colistin ở *A. baumannii*. Tuy nhiên, đã có nhiều báo cáo về kháng colistin ở *A. baumannii* trên thế giới [17]. Theo nghiên cứu của Matuschek và cộng sự (2018) [7] cho thấy, kết quả của một số phương pháp xác định MIC của colistin không đồng nhất, có thể cho kết quả đề kháng giả hoặc nhạy cảm giả. Giá trị MIC colistin không chỉ liên quan với kết quả nhạy/kháng mà còn liên quan tới việc tính liều colistin trong điều trị, nên một kết quả thử nghiệm chính xác là rất cần thiết và quan trọng.

KẾT LUẬN

Có mối liên quan giữa mức độ kháng kháng sinh nhóm carbapenem với sự xuất hiện của gen *bla_{OXA-23}*. Colistin trở thành “vũ khí” cuối cùng trong điều trị nhiễm trùng nghiêm trọng do *A. baumannii* đa kháng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của đề tài cấp nhà nước “Đánh giá thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn tại Việt Nam, xác định đặc điểm cấu trúc gen và yếu tố liên quan của các vi khuẩn kháng thuốc thường gặp ở Việt Nam”, mã số HNQT/SPĐP/02.16 (1/10/2016-30/3/2019). Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] WHO (2017), *WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics are Urgently Needed*, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>.

[2] R. Xie, et al. (2018), “Analysis of global prevalence of antibiotic

resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries”, *Emerging Microbes & Infections*, **7(1)**, pp.1-10.

[3] P. Nowak and P. Paluchowska (2016), “*Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance-role of carbapenemases”, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, **54(2)**, pp.61-74.

[4] Luu Thi Vu Nga, et al. (2017), “Genotyping of *Acinetobacter baumannii* carrying New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-1 gene among inpatients admitted to provincial hospitals in Vietnam, 2016”, *Vietnam Journal of Infectious Diseases*, **4(20)**, pp.31-36.

[5] CLSI (2015), *M07-A10-Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; approved Standard-Tenth Edition.

[6] CLSI (2018), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Twenty-eighth Informational supplement M100-S28.

[7] E. Matuschek, et al. (2018), “Antimicrobial susceptibility testing of colistin-evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp.”, *Clinical Microbiology and Infection*, **24(8)**, pp.865-870.

[8] D.H. Kim, et al. (2013), “Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 2 in Asia and *AbaR*-type resistance islands”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57(11)**, pp.5239-5246.

[9] Nguyen Thi Thanh Ha (2014), *Research on Clinical and Microbiological Characteristics in Patients with Sepsis Caused by Acinetobacter Baumannii (2011-2012)*, Doctoral thesis of medicine, Scientific Research Institute of Clinical Medicine and Pharmacy 108.

[10] D. Tran, et al. (2017), “Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 and other carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex among patients in hospitals in Hanoi, Vietnam”, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **36(2)**, pp.219-225.

[11] D.R. Chung, et al. (2011), “High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **184(12)**, pp.1409-1417.

[12] M. Pagano, A.F. Martins, and A.L. Barth (2016), “Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*”, *Brazilian Journal of Microbiology*, **47(4)**, pp.785-792.

[13] Pham Hong Nhung, Dao Xuan Co, and Bui Thi Hao (2017), “Susceptibility to antibiotics of Gram-negative bacilli isolated in ICU of Bach Mai hospital”, *Journal of Medical Research*, **109(4)**, pp.1-8.

[14] J.F. Turton, et al. (2006), “The role of *IS Aba1* in expression of *OXA* carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*”, *FEMS Microbiology Letters*, **258(1)**, pp.72-77.

[15] V.C. Kobs, et al. (2016), “The role of the genetic elements *bla oxa* and *IS Aba 1* in the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting”, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **49(4)**, pp.433-440.

[16] A. Makena, et al. (2014), “Biochemical characterization of New Delhi metallo-β-lactamase variants reveals differences in protein stability”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70(2)**, pp.463-469.

[17] Y. Cai, et al. (2012), “Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67(7)**, pp.1607-1615.

Giảm biểu hiện gen *ABCC4* (ATP-binding cassette subfamily C) liên quan đến rối loạn tự kỷ trên mô hình ruồi giấm

Trần Quốc Đạt*, Nguyễn Trọng Tuệ

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 3/2/2020; ngày chuyển phân biện 12/2/2020; ngày nhận phân biện 27/3/2020; ngày chấp nhận đăng 14/4/2020

Tóm tắt:

Rối loạn phổ tự kỷ là tình trạng rối loạn thần kinh phức tạp, bao gồm những khiếm khuyết trong tương tác xã hội, phát triển ngôn ngữ và kỹ năng giao tiếp kết hợp với hành vi cứng nhắc, lặp đi lặp lại. Việc nghiên cứu bệnh ở mức độ phân tử và tế bào gặp nhiều khó khăn bởi tính phức tạp trong việc lựa chọn, xây dựng mô hình thực nghiệm. Hầu hết các nghiên cứu cơ bản đều dừng lại ở mức độ *in vitro*, tập trung vào việc phát hiện đột biến gen được cho là liên quan đến bệnh mà chưa đi sâu vào nghiên cứu ở mức độ *in vivo*. Ruồi giấm đã có lịch sử nghiên cứu hơn 100 năm, với bộ gen nhỏ nhưng lại có mức tương đồng với gen người khá cao, cho thấy đây là một mô hình di truyền vô cùng ưu việt. Do đó, nghiên cứu này đặt ra mục tiêu xây dựng mô hình ruồi giấm biến đổi gen *ABCC4* và nghiên cứu sự thiếu hụt của gen này với biểu hiện đặc trưng của bệnh tự kỷ. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy sự tương tác giữa các cá thể trong quần thể giảm mạnh giữa nhóm mang gen bệnh và nhóm chứng. Ruồi biến đổi gen *ABCC4* bị rối loạn nhịp thức - ngủ so với con có kiểu gen *ABCC* hoang dại. Các biểu hiện ghi nhận được tương tự như triệu chứng rối loạn tự kỷ ở người. Đây là những kết quả bước đầu góp phần làm sáng tỏ vai trò của protein này trong cơ chế phân tử của bệnh tự kỷ.

Từ khóa: ABCC, rối loạn phổ tự kỷ, ruồi giấm.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Rối loạn phổ tự kỷ là một bệnh lý rối loạn về phát triển thần kinh phức tạp ở trẻ em được giả thuyết do sự phơi nhiễm với các chất độc hoặc do thay đổi về những yếu tố di truyền. Những rối loạn về hành vi thường phát triển trong những năm đầu tiên của cuộc đời. Đây là căn bệnh đang có xu hướng phát triển với một tốc độ đáng báo động không chỉ ở Việt Nam mà còn trên toàn thế giới [1]. Ở nước ta, nghiên cứu về bệnh chủ yếu tập trung vào dịch tễ học, biểu hiện lâm sàng và các yếu tố nguy cơ, trong khi các mô hình động vật thực nghiệm còn nhiều hạn chế. Các protein có vai trò quan trọng liên quan đến con đường vận chuyển và dự trữ năng lượng của tế bào thần kinh còn khá mới mẻ và chưa được đầu tư nghiên cứu. Việc ứng dụng mô hình ruồi giấm để nghiên cứu vai trò và chức năng của các protein này, làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh là một hướng đi mới mẻ và thiết thực.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu sử dụng ruồi giấm làm sinh vật mô hình để mô phỏng bệnh lý rối loạn tự kỷ ở người với mục tiêu xác định được tác động của các yếu tố về gen, môi trường đến các hành vi, biểu hiện, khả năng vận động, khả năng sống sót, các thay đổi về nhịp sinh học và biến đổi trong cấu trúc thần kinh ruồi giấm [2-4]. Năm 2018, nghiên cứu của

Ueoka và cs [3] nhận thấy ở ruồi giấm có chứa gen *CG1718* (nằm trên vùng 19F3 của nhiễm sắc thể X) có trình tự và chức năng tương đồng như gen *ABCA13* ở người. Do đó, nghiên cứu hướng đến gen này trên ruồi và gọi tắt là *Drosophila ABCA13* (*dABCA13*). Kết quả của việc giảm biểu hiện (knockdown) gen *dABCA13* tại mô não của ruồi giấm cho thấy sự giảm tương tác rõ rệt giữa các cá thể trong quần thể, ruồi bị rối loạn nhịp thức - ngủ và cấu trúc thần kinh cơ bị biến đổi thể hiện rõ nhất ở các nút thần kinh. Kiểu hình ghi nhận được trên mô hình này tương tự như triệu chứng rối loạn tự kỷ ở người. Bên cạnh đó, đột biến gen *ABCA13* cũng đã được chứng minh là có liên quan đến rối loạn tự kỷ trên khỉ [5]. Bên cạnh *ABCA13*, gen *ABCC4* cũng là một thành viên thuộc họ gen *ABC* - mã hoá cho protein có cấu trúc tương tự như protein *ABCA13* gồm 2 vùng xuyên màng (membrane spanning domain - MSD) MSD1 và MSD2, mỗi vùng chứa 6 chuỗi helix, 2 vùng gắn nucleotide (NBD1 và NBD2) và vùng N-tận với khoảng 12 axit amin với nhiều chức năng như vận chuyển các chất qua màng tế bào (bao gồm lipid, ion, các phân tử thuốc), thụ thể trên bề mặt tế bào và bài tiết độc tố. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò của nó trong việc điều hoà cân bằng nội môi và truyền tin nội bào, điều khiển quá trình lão hoá của tế bào tủy xương và tuyến ức [6]. Ngoài ra, protein này còn đóng vai trò trong sinh bệnh học khối u (u xo

*Tác giả liên hệ: Email: tranquocdat.hus@gmail.com

Reduction of the ATP-binding cassette sub-family C member 4 (*ABCC4*) related to the expression of autism spectrum disorder on *Drosophila melanogaster* model

Quoc Dat Tran*, Trong Tue Nguyen

Hanoi Medical University

Received 3 February 2020; accepted 14 April 2020

Abstract:

Autism spectrum disorders (ASDs) are complex neurodevelopmental disabilities that have core diagnostic features including impaired social interaction, language development, and interpersonal skills with repetitive and restrictive behaviors. Researching this type of disorder in terms of the molecular and cellular mechanism has met many difficulties because of the complexity in choosing and creating an experimental model organism. In Vietnam, most of the studies have focused on identifying the mutation relating to ASDs at *in vitro* level without any in-depth study at *in vivo* level. *Drosophila melanogaster* has been widely used as an advantaged model organism in classical and modern genetics for more than 100 years because its genome was small and simple but having homologues for at least 75% of human disease genes, thereby indicating that this has been an extremely excellent genetic model. Therefore, this study aimed to elucidate the physiological role of the *ABCC4* gene mutant *Drosophila model* by specifically knocked down this protein in all neurons of these flies and investigated the deficiency of this gene in terms of autism features. The result exhibited that the interaction between individuals in the population was sharply reduced between the gene mutant carrier group and the control group. The knockdown of *dABCC4* protein in all neurons induced early onset of evening activity and hyperactivity during morning peaks and evening peaks. The *ABCC4* genetically modified flies had a rhythm sleep disorder compared to the wild-type flies (*ABCC* genes). These phenotypes were similar to defects observed in humans with autism spectrum disorder. These preliminary results have contributed to elucidate the role of this protein in the molecular mechanism of the autism.

Keywords: *ABCC*, autism spectrum disorder, *Drosophila*.

Classification number: 3.5

ngang, u não) và một số bệnh thoái hoá thần kinh (Parkinson, Alzheimer...) [7, 8].

Mặc dù tương đồng về cấu trúc và chức năng với *ABCA13* nhưng vai trò của *ABCC4* đối với hệ thần kinh và ảnh hưởng đến rối loạn tự kỷ lại chưa được biết đến và cũng chưa có một nghiên cứu nào trên mô hình động vật xác định được vai trò sinh bệnh học của gen này [3-5]. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với hai mục tiêu chính: (1) knockdown gen *dABCC4* trên mô não của ruồi giấm sử dụng hệ thống *GAL4/UAS* và (2) phân tích các biểu hiện hành vi trên ruồi knockdown *ABCC4* trong mối liên quan đến bệnh tự kỷ. Đây là hướng nghiên cứu hoàn toàn mới, góp phần làm sáng tỏ vai trò của gen này trong cơ chế phân tử của bệnh, đồng thời cung cấp một mô hình tiềm năng và kinh tế cho những nghiên cứu thử nghiệm và sàng lọc thuốc.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng các dòng ruồi giấm chuyển gen thu thập từ các trung tâm lưu trữ lớn trên thế giới như Vienna Stock Center, Italy và Bloomington *Drosophila* Stock Center - Indiana, USA. Trong đó bao gồm:

- w; +; *elav-GAL4* (mã số #8760 - Bloomington Stock Center): dòng driver định hướng biểu hiện protein *GAL4* tại mô não ruồi giấm.

- w; *UAS-GFP-IR*; + (mã số #56179 - Vienna Stock Center): biểu hiện dsRNA của gen *GFP*.

- w; *UAS-dABCC-IR*₆₃₋₁₅₅; + (mã số CG7627/v2808 - Vienna Stock Center): biểu hiện dsRNA của gen *ABCC4* trên ruồi giấm, mã hoá cho protein *dABCC4* bị phân giải từ axit amin thứ 63 đến axit amin thứ 155.

Ruồi giấm được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản (bao gồm 0,65% agarose, 10% glucose, 4% nấm men, 5% bột ngô và 3% bột cám gạo) và trong điều kiện nhiệt độ 25°C, thời gian chiếu sáng chu kỳ 12 giờ sáng: 12 giờ tối.

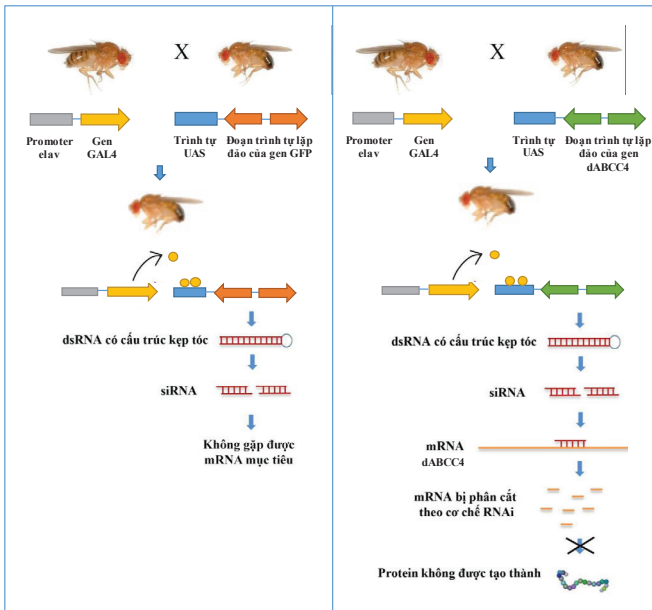
Ngoài ra, nghiên cứu cũng sử dụng: kháng thể đặc hiệu cho protein *dABCC4* (rabbit anti-*ABCC4* - Sigma-Aldrich); kháng thể đặc hiệu cho protein α -tubulin (rabbit anti-tubulin - Thermo Scientific) và Protein G Mag Sepharose™ Xtra (GE Healthcare) để tinh sạch kháng thể; các hoá chất và thiết bị dùng trong sinh học phân tử.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp lai tạo dòng ruồi giấm knockdown biểu hiện *dABCC4* tại mô não của ruồi: để knockdown gen *ABCC4* tại các tế bào thần kinh trong mô não của ruồi giấm, chúng tôi sử dụng hệ thống biểu hiện *elav-GAL4/UAS*. Trong đó, *elav* là promoter điều khiển sự biểu hiện cho protein *GAL4* tại các tế bào thần kinh trên não; protein *GAL4* sẽ bám vào vùng trình tự *UAS* trên phức hệ gen *UAS-dABCC4-IR* và kích hoạt quá trình tạo ra sợi RNA *dABCC4* mang trình tự lặp lại ngược chiều

nhau, sợi RNA này sẽ hình thành cấu trúc sợi đôi dạng “kẹp tóc”. Từ đó, hoạt hoá con đường RNAi để knockdown gen *dABCC4* tại các tế bào thần kinh ở thể hệ con lai F1.

Cách thực hiện: chúng tôi tiến hành lai theo sơ đồ hình 1.



Hình 1. Sơ đồ mô tả quá trình lai tạo các dòng ruồi giấm trong nghiên cứu và cơ chế hoạt động của các thành phần trong con lai F1.

Phương pháp đánh giá biểu hiện của protein ABCC4 tại mô não ruồi giấm bằng kỹ thuật Western Blotting: dòng ruồi giấm sau khi lai tạo sẽ được tiến hành đánh giá hiệu quả knockdown protein trên mô não bằng kỹ thuật Western Blotting, sử dụng kháng thể đặc hiệu với protein ABCC4. Alpha-tubulin được sử dụng như chứng nội kiểm.

Phương pháp đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm trưởng thành (Climbing assay): thí nghiệm dựa trên tập tính leo trèo ngược chiều trọng lực khi có lực tác động cùng chiều trọng lực của ruồi giấm [9]. Dựa trên nguyên tắc này, khi ruồi biến đổi gen bị ảnh hưởng đến khả năng vận động sẽ bị ảnh hưởng tới khả năng leo trèo của chúng. Do ruồi cái bị ảnh hưởng bởi quá trình mang thai và đẻ trứng nên toàn bộ các thí nghiệm được tiến hành trên ruồi đực để đảm bảo tính ổn định. Các thí nghiệm được tiến hành song song giữa nhóm bệnh (knockdown gen *ABCC4*) và nhóm chứng (knockdown gen *GFP*).

- Ruồi giấm được lựa chọn làm thí nghiệm sẽ được gây mê bằng CO₂, sau đó chuyển vào ống thủy tinh (15-20 con/ống) có chia vạch từ 1 đến 5, mỗi vạch cách nhau 2 cm. Để 10 phút cho ruồi ổn định, dùng tay đập mạnh liên tục 5 lần để đưa ruồi về đáy ống thủy tinh (về cùng vạch xuất phát). Cho ruồi bò lên trong 30 s, ghi lại bằng camera, lặp lại động tác 5 lần.

- Sử dụng dữ liệu video ghi được tại 5 s đầu tiên sau khi kết thúc mỗi lần đập để phân tích, so sánh khả năng leo trèo của

ruồi ở các nhóm thí nghiệm.

- Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Image-J và thống kê bằng Excel và SPSS.

Phương pháp đánh giá khả năng tương tác cộng đồng (social space assay): phương pháp dựa theo mô tả trong nghiên cứu của Simon và cs [10]; sử dụng một buồng thí nghiệm hình tam giác cân nằm trong hai tấm kính vuông (18x18 cm), cách nhau bằng một tấm đệm acrylic 0,5 cm cho phép ruồi hoạt động trong không gian hai chiều. Thí nghiệm chỉ sử dụng ruồi đực trưởng thành ở giai đoạn 3-4 ngày tuổi để đảm bảo tính ổn định. Ruồi đực knockdown gen *GFP* được lựa chọn làm nhóm chứng.

Chọn ngẫu nhiên 40 ruồi đực mỗi nhóm, đem gây mê và chuyển vào buồng thí nghiệm, đợi chúng tỉnh lại. Đập nhẹ buồng thí nghiệm đảm bảo toàn bộ ruồi ở đáy buồng. Cho ruồi tự do vận động, giao tiếp với nhau trong 20 s. Quá trình này được ghi lại bằng camera. Sau đó phân tích khoảng cách gần nhất giữa các cá thể ruồi bằng phần mềm Image-J.

Phương pháp đánh giá nhịp sinh học của ruồi giấm (activity assay): ruồi giấm trưởng thành được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25°C, chu kỳ sáng tối cách nhau 12 giờ trước khi sử dụng cho thử nghiệm đánh giá nhịp thức ngủ [11]. Mỗi cá thể ruồi trưởng thành được cho vào một ống thủy tinh đường kính 5 mm với một đầu có chứa thức ăn và đặt trong một thiết bị đo chuyên dụng. Toàn bộ hoạt động của ruồi được ghi nhận 24/24 h liên tục trong vòng 7-10 ngày nhờ thiết bị cảm biến kết nối với máy tính. Qua đó có thể đo được thời gian và cường độ hoạt động ban ngày/ban đêm của ruồi nhóm bệnh so với nhóm chứng.

Phân tích kết quả: kết quả của thử nghiệm tương tác cộng đồng, thử nghiệm đánh giá khả năng vận động, đánh giá nhịp sinh học của ruồi giấm, được xử lý bằng phần mềm phân tích hình ảnh Image-J, sau đó phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS. Giá trị p được tính toán sử dụng Kruskal-Wallis test.

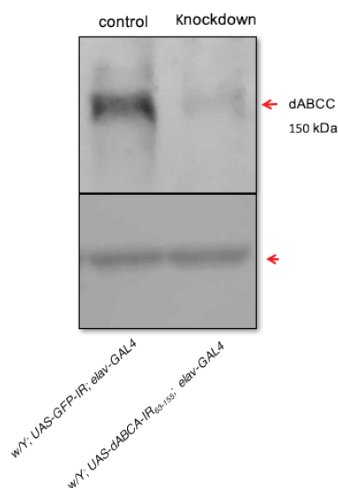
Kết quả

Mức độ tương đồng giữa protein *ABCC4* của người và protein *CG7627* ở ruồi giấm

Trình tự axit amin của protein *CG7627* ở ruồi giấm được trích xuất từ cơ sở dữ liệu UniProt (mã số Q9VLN6) và so sánh với trình tự của các thành viên trong họ protein *ABCC* ở người, sử dụng công cụ FASTA và BLAST. Kết quả so sánh cho thấy, giữa protein *CG7627* ở ruồi giấm và protein *ABCC4* ở người có tỷ lệ tương đồng (identity) là 44% và mức độ giống nhau (similarity) là 63%, cao nhất trong số các thành viên khác thuộc họ protein *ABCC*. Kết quả so sánh cũng cho thấy mức độ tương đồng về cấu trúc protein *ABCC4* giữa người và ruồi giấm với hai vùng xuyên màng (TMD) và hai vùng bám nucleotid (NBD). Các vùng chức năng này ở cả hai loài cũng được xác định với tỷ lệ tương đồng cao (TMD1 và TMD2 có tỷ lệ tương đồng lần lượt là 72 và 81%. Tỷ lệ này ở vùng NBD1 và NBD2 lần lượt là 87,5 và 100%).

Knockdown protein ABCC4 tại mô não ruồi giấm

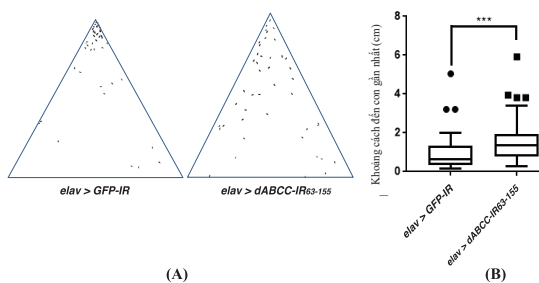
Chúng ruồi giấm sau khi lai tạo sẽ được tiến hành đánh giá hiệu quả knockdown protein trên mô não bằng kỹ thuật Western Blotting, sử dụng kháng thể đặc hiệu với protein dABCC4.



Hình 2. Kết quả Western Blotting đánh giá mức độ biểu hiện của protein dABCC4 ở mô não của ruồi giấm nhóm bệnh lý (knockdown) và nhóm đối chứng (control).

Kết quả cho thấy, xuất hiện băng protein kích thước 150 kDa tương ứng với trọng lượng phân tử của protein dABCC4 ở nhóm knockdown *w/Y;UAS-dABCC4-IR⁶³⁻¹⁵⁵;elav-GAL4* với cường độ thấp hơn so với băng protein cùng kích thước ở nhóm chứng *w/Y;UAS-GFP-IR; elav-GAL4* (hình 2). Điều này chứng tỏ mức độ biểu hiện của protein dABCC4 tại mô não của ruồi giấm ở nhóm knockdown giảm đáng kể so với nhóm chứng, khẳng định hiệu suất của quá trình knockdown và tính đặc hiệu của kháng thể. Ngoài việc sử dụng kháng thể bậc 1 đặc hiệu cho protein đích dABCC4, nghiên cứu cũng sử dụng kháng thể đặc hiệu cho alpha-tubulin làm đối chứng cho lượng protein đưa vào ở từng mẫu thí nghiệm.

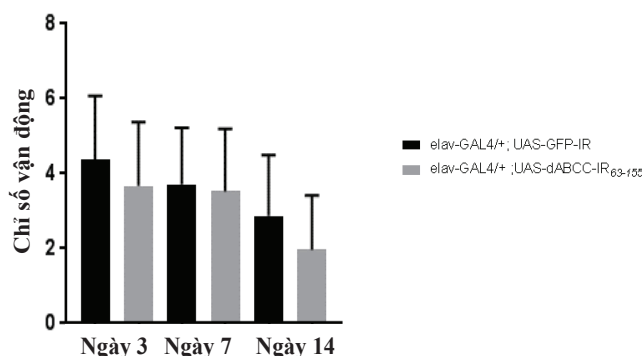
Khả năng vận động và tương tác cộng đồng



Hình 3. Thử nghiệm hành vi tương tác cộng đồng trên ruồi giấm trưởng thành.

(A) Phân bố của quần thể ruồi trong không gian. (B) Kết quả phân tích khoảng cách tương tác không gian của ruồi giấm giữa nhóm bệnh knockdown dABCC4 (*elav>dABCC4-IR⁶³⁻¹⁵⁵*) và nhóm chứng knockdown GFP (*elav>GFP-IR*) (n=40); ***: p<0,01.

Kết quả cho thấy, ruồi giấm knockdown gen *dABCC4* có mức độ tương tác với quần thể giảm rõ rệt (hình 3). Trên 80% cá thể ruồi giấm ở nhóm bệnh có khoảng cách đến con gần nhất trên 1,5 cm, trong khi ở nhóm chứng chỉ là dưới 0,5 cm. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng tiến hành thử nghiệm leo trèo (climbing assay) trên chính quần thể ruồi này để khẳng định rằng: sự phân bố ngẫu nhiên rải rác trong không gian của ruồi giấm ở nhóm knockdown không phụ thuộc vào sự thay đổi trong khả năng vận động của chúng. Ruồi được đánh giá tại các thời điểm 3, 7 và 14 ngày tuổi. Kết quả thu được cho thấy, khả năng vận động của nhóm ruồi bệnh lý knockdown gen *dABCC4* và nhóm chứng knockdown gen *GFP* là tương đương nhau (hình 4). Do vậy, khả năng leo trèo không ảnh hưởng đến mức độ tương tác và phân bố của quần thể ruồi trong không gian.

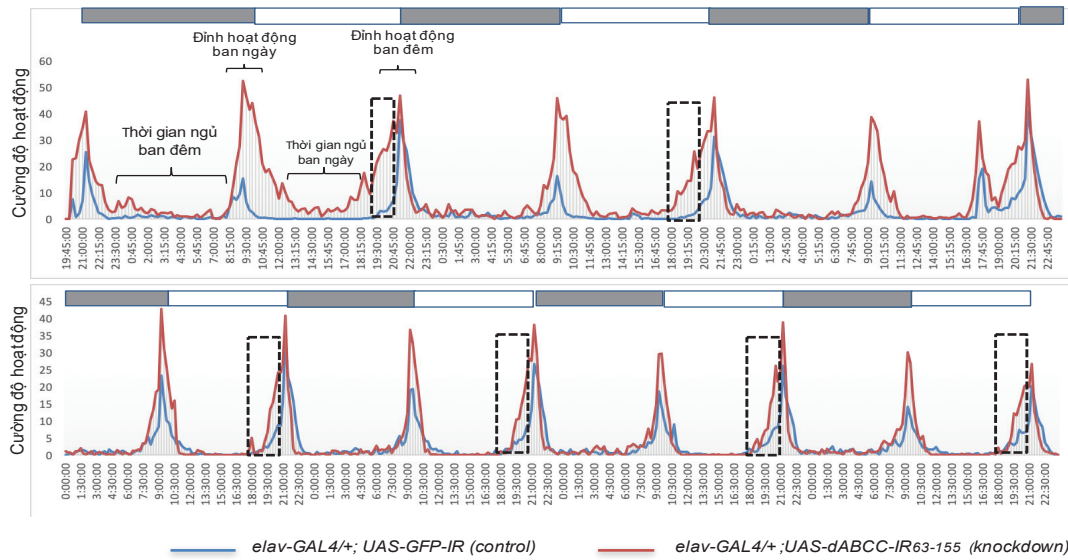


Hình 4. Kết quả thử nghiệm leo trèo xác định khả năng vận động của ruồi giấm trưởng thành ở thời điểm 3 ngày tuổi, 7 ngày tuổi và 14 ngày tuổi.

Kết quả không có sự khác biệt giữa nhóm ruồi bệnh lý knockdown dABCC4 và nhóm chứng knockdown GFP (n=40).

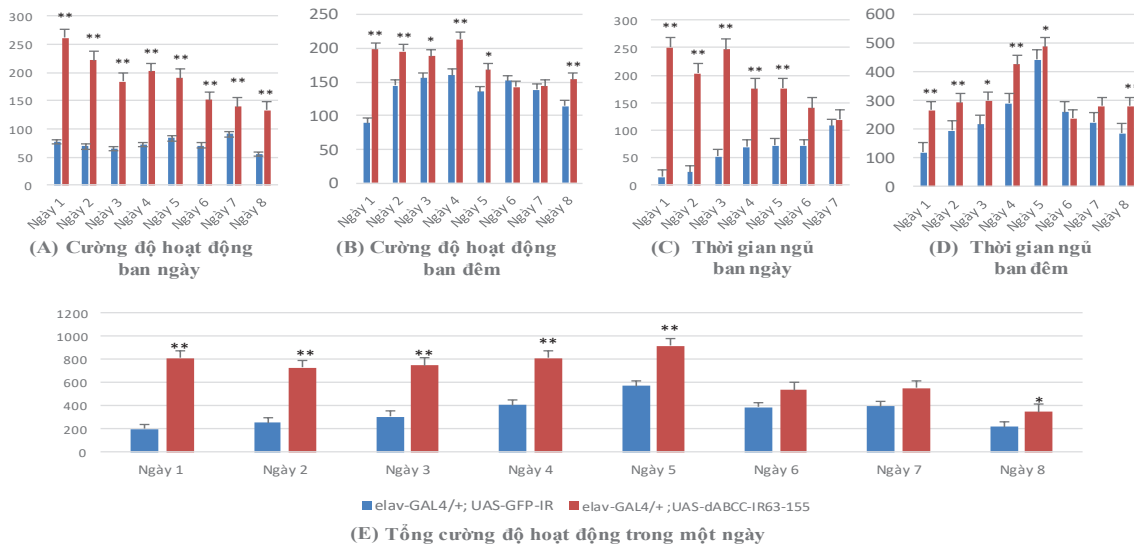
Kết quả xác định nhịp sinh học của ruồi giấm

Một trong những yếu tố chẩn đoán cốt lõi của rối loạn tự kỷ là những thay đổi trong nhịp sinh học, bao gồm tổng thời gian hoạt động trong ngày, thời gian thức và ngủ. Để đánh giá tác động của việc knockdown gen *dABCC* lên nhịp sinh học ở ruồi giấm, nghiên cứu tiến hành theo dõi hoạt động thức - ngủ của 40 cá thể ở nhóm bệnh và nhóm chứng. Ruồi giấm ở cả hai nhóm được lựa chọn ở thời điểm 3-4 ngày tuổi, được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản, nhiệt độ 25°C, độ ẩm 60% và dưới điều kiện chiếu sáng 12 giờ sáng: 12 giờ tối trong tối thiểu 2 ngày, sau đó, mỗi cá thể được đưa vào 1 ống thủy tinh trong suốt đường kính 5 mm và đặt vào thiết bị đo có gắn cảm biến kết nối với máy tính. Thí nghiệm được tiến hành trong vòng 7 ngày. Tần suất hoạt động của ruồi tại mỗi khoảng thời gian được ghi nhận là số lần ruồi di chuyển qua đèn laser cảm biến. Kết quả được thống kê và phân tích bằng Microsoft Excel.



Hình 5. Kết quả xác định nhịp sinh học của ruồi giấm. Trục hoành biểu thị các mốc thời gian trong một ngày. Trục tung biểu thị cường độ hoạt động của ruồi.

elav-GAL4/+; UAS-dABCC-IR⁶³⁻¹⁵⁵: ruồi knockdown dABCC4
 elav-GAL4/+; UAS-GFP-IR: ruồi knockdown protein GFP làm đối chứng.



Hình 6. Kết quả phân tích nhịp thức - ngủ ở ruồi giấm bao gồm cường độ hoạt động ban ngày (A), ban đêm (B); thời gian ngủ ban ngày (C), ban đêm (D) và tổng thời gian hoạt động trong một ngày (E) giữa dòng ruồi knockdown mang kiểu gen w/Y; UAS-dABCC-IR⁶³⁻¹⁵⁵; elav-GAL4/+ và dòng đối chứng w/Y; UAS-GFP-IR; elav-GAL4/+.

*: p<0,05; **: p<0,01.

Kết quả xác định nhịp sinh học của ruồi giấm cho thấy, ruồi hoạt động chủ yếu vào hai thời điểm trong ngày tương ứng với hai đỉnh có cường độ tín hiệu cao nhất (hình 5). Thời điểm từ 8-10 h là đỉnh hoạt động ban ngày (morning peak) và thời điểm từ 20h30-21h30 là đỉnh hoạt động ban đêm (evening peak). Theo đó, thời gian ngủ ban ngày (midday siesta) được tính là khoảng thời gian giữa hai đỉnh trong cùng một ngày còn thời gian ngủ ban đêm (nighttime sleep) được tính từ đỉnh hoạt động ban đêm của ngày hôm trước đến đỉnh hoạt động

ban ngày của ngày hôm sau. Tiến hành so sánh và phân tích cường độ hoạt động của ruồi trong một ngày nhận thấy ruồi giấm knockdown dABCC4 có xu hướng hoạt động nhiều hơn, thời gian ngủ ban ngày và thời gian ngủ ban đêm cũng dài hơn so với nhóm chứng (hình 6). Ngoài ra, ở nhóm ruồi bị biến đổi gen dABCC4 tại mô não còn có hiện tượng khởi phát sớm đỉnh hoạt động ban đêm. Cụ thể, đỉnh hoạt động ban đêm ở nhóm ruồi bệnh lý khởi phát từ thời điểm 18h30 thay vì 20h30 như nhóm ruồi đối chứng.

Bàn luận

Với ưu thế vòng đời ngắn, dễ nuôi trong phòng thí nghiệm, có thể cung cấp số lượng nhiều trong cùng một thời điểm, hệ gen đã được giải trình tự toàn bộ và đã được chứng minh về mức độ tương đồng tới 70% gen gây bệnh trên người, ruồi giấm là mô hình thuận lợi và lý tưởng cho việc nghiên cứu bệnh liên quan đến yếu tố di truyền. Với cấu trúc hệ thần kinh hoàn thiện và chức năng hoàn toàn tương đồng trên người, ruồi giấm cũng được sử dụng làm mô hình để nghiên cứu về các bệnh lý thần kinh và vận động [12]. Trong nghiên cứu này, kết quả so sánh mức độ tương đồng của gen *ABCC4* ở người và ruồi giấm đã cho thấy mức độ bảo tồn cao giữa các vùng chức năng của gen, gợi ý về chức năng của protein là tương tự nhau cho mỗi loài.

Việc giảm biểu hiện của *dABCC* ở mô não đã gây nên một loạt những thay đổi trong khả năng tương tác xã hội và nhịp sinh học ở ruồi giấm. Nhiều nghiên cứu trước đây cũng sử dụng ruồi giấm làm sinh vật mô hình để chứng minh mối liên quan giữa một số gen như *dABCA13*, *rugose* với hội chứng rối loạn tự kỷ [3, 4, 13]. Ruồi giấm mang gen đột biến bị giảm khả năng tương tác xã hội và thay đổi nhịp thức - ngủ. Cường độ hoạt động của ruồi ở mức cao và kéo dài liên tục trong nhiều ngày. Ngoài ra, ruồi giấm mang gen *dABCA13* đột biến cũng có hiện tượng khởi phát sớm đỉnh hoạt động ban đêm [3]. Kiểu hình tương tự như ruồi giấm knockdown gen *dABCC4* và tương tự như triệu chứng rối loạn tự kỷ ở người.

Việc tổng hợp dữ liệu của nhiều nghiên cứu sử dụng mô hình ruồi giấm biến đổi gen cho bệnh tự kỷ cũng góp phần xác định được vai trò các nhóm gen liên quan, làm sáng tỏ cơ chế phân tử của bệnh. Trong họ gen *ABC* ở người, gen *ABCC* có vai trò vận chuyển nhiều loại cơ chất qua màng tế bào, trong đó có lipid [7]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra, hệ thần kinh trung ương là cơ quan tập trung hàm lượng lipid cao thứ hai, chỉ sau các mô mỡ. Do đó, chức năng vận chuyển lipid qua màng tế bào của *ABCC* đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định con đường tín hiệu và duy trì cân bằng nội môi ở các tế bào trong hệ thần kinh trung ương. Dựa trên sự tương đồng với động vật bậc cao về cấu trúc gen và trình tự axit amin mã hoá, *dABCC* ở ruồi giấm cũng được dự đoán là có vai trò vận chuyển lipid qua màng tế bào và duy trì cân bằng nội môi. Việc giảm biểu hiện của gen ở mô não là nguyên nhân gây nên sự thiếu hụt chức năng của protein này, từ đó ảnh hưởng đến các con đường truyền tin nội bào, hệ quả là làm giảm khả năng tương tác xã hội và thay đổi nhịp sinh học ở ruồi giấm. Mô hình ruồi giấm trong nghiên cứu này có thể tiếp tục được sử dụng để xác định những thay đổi trong hình thái cấu trúc tế bào thần kinh, đánh giá sự thay đổi ở mức độ phân tử, từ đó xác định các gen/nhóm gen có khả năng tương tác với *dABCC* và liên quan đến rối loạn tự kỷ ở người.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình ruồi giấm biến đổi gen *ABCC* và xác định được mối liên quan với các biểu hiện của bệnh tự kỷ. Đây là những kết quả bước đầu góp phần làm

sáng tỏ vai trò của protein này trong cơ chế phân tử của bệnh, đồng thời cung cấp một mô hình tiềm năng và kinh tế cho nghiên cứu thử nghiệm và sàng lọc thuốc.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài tiềm năng “Nghiên cứu vai trò của gen *ABCC* liên quan đến hội chứng tự kỷ bằng mô hình ruồi giấm và ứng dụng mô hình này trong sàng lọc dược liệu”, thuộc Đề án hỗ trợ nghiên cứu và xuất bản quốc tế của Trường Đại học Y Hà Nội. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ từ phía GS Matsamitsu Yamaguchi - Khoa Sinh học ứng dụng, Học viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Faras, N. Al Ateeqi, L. Tidmarsh (2010), “Autism spectrum disorders”, *Ann. Saudi Med.*, **30**(4), pp.295-300.
- [2] Y. Tian, Z.C. Zhang, J. Han (2017), “Drosophila studies on autism spectrum disorders”, *Neurosci. Bull.*, **33**(6), pp.737-746.
- [3] I. Ueoka, H. Kawashima, A. Konishi, et al. (2018), “Novel drosophila model for psychiatric disorders including autism spectrum disorder by targeting of ATP-binding cassette protein A”, *Exp. Neurol.*, **300**, pp.51-59.
- [4] A. Wise, L. Tenezaca, R.W. Fernandez, et al. (2015), “Drosophila mutants of the autism candidate gene neurobeachin (*rugose*) exhibit neurodevelopmental disorders, aberrant synaptic properties, altered locomotion, impaired adult social behavior and activity patterns”, *J. Neurogenet.*, **29**, pp.135-143.
- [5] S. Iritani, Y. Torii, C. Habuchi, et al. (2018), “The neuropathological investigation of the brain in a monkey model of autism spectrum disorder with *ABCA13* deletion”, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **71**, pp.130-139.
- [6] F. Kyle-Cezar, J. Echevarria-Lima, V.M. Rumjanek (2007), “Independent regulation of *ABCB1* and *ABCC* activities in thymocytes and bone marrow mononuclear cells during aging”, *Scandinavian Journal of Immunology*, **66**(2-3), pp.238-248.
- [7] M.J. Henderson, M. Haber, A. Porro, et al. (2011), “*ABCC* multidrug transporters in childhood neuroblastoma: clinical and biological effects independent of cytotoxic drug efflux”, *J. Natl. Cancer Inst.*, **103**(16), pp.1236-1251.
- [8] H. Bronger, J. König, K. Kopplow, H.H. Steiner, et al. (2005), “*ABCC* drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier”, *Cancer Research*, **65**(24), pp.11419-11428.
- [9] S.T. Madabattula, J.C. Strautman, A.M. Bysice, et al. (2015), “Quantitative analysis of climbing defects in a drosophila model of neurodegenerative disorders”, *J. Vis. Exp.*, **100**, e.52741.
- [10] A.F. Simon, M.T. Chou, E.D. Salazar, et al. (2012), “A simple assay to study social behavior in drosophila: measurement of social space within a group”, *Genes Brain Behav.*, **11**(2), pp.243-252.
- [11] J.C. Chiu, K.H. Low, D.H. Pike, et al. (2010), “Assaying locomotor activity to study circadian rhythms and sleep parameters in drosophila”, *J. Vis. Exp.*, **43**, e.2157.
- [12] J. Bilen and N.M. Bonini (2005), “Drosophila as a model for human neurodegenerative disease”, *Annual Review of Genetics*, **39**(1), pp.153-171.
- [13] M. Coll-Tané, A. Krebbers, A. Castells-Nobau, et al. (2019), “Intellectual disability and autism spectrum disorders “on the fly”: insights from drosophila”, *Disease Models & Mechanisms*, **12**(5), DOI: 10.1242/dmm.039180.

Nghiên cứu khả năng nhân giống bằng hạt và sinh trưởng của cây Riềng ảm (*Alpinia Zerumbet* (Pers.)) có nguồn gốc từ Nhật Bản

Phạm Thị Mỹ Phương*, Nguyễn Ngọc Quý, Tô Thị Mai Dung, Đoàn Văn Tú

Viện Nghiên cứu và phát triển vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 14/2/2020; ngày chuyển phản biện 18/2/2020; ngày nhận phản biện 17/3/2020; ngày chấp nhận đăng 23/3/2020

Tóm tắt:

Trong điều kiện tự nhiên, cây Riềng ảm (*Alpinia Zerumbet* (Pers.)) chỉ phát triển ở một số khu vực, hạt khó nảy mầm. Nghiên cứu này nhằm đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt Riềng ảm. Hạt Riềng ảm phơi khô được ngâm ủ ở các nhiệt độ và với lượng GA3 khác nhau cho tỷ lệ nảy mầm khác nhau. Ở nhiệt độ 40°C, tỷ lệ nảy mầm đạt 75, 88, 87 và 86% tương ứng với các nồng độ GA3 là 5, 10, 20 và 30 ppm. Quá trình nảy mầm của hạt bắt đầu diễn ra từ ngày thứ 10 sau khi ủ và kết thúc vào ngày thứ 22. Hạt sau khi nảy mầm được gieo vào khay nhựa với giá thể là 80% đất phù sa sông Hồng + 20% phân vi sinh, cho tỷ lệ sống là 97%, chiều cao cây trung bình sau 45 ngày đạt 7,6-8,1 cm.

Từ khóa: nhân giống bằng hạt, Riềng ảm, tỷ lệ nảy mầm.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Riềng ảm (*Alpinia zerumbet* (Pers.)), còn gọi là Riềng đẹp, Cao lương khương, Đại thảo khấu, Thảo đậu khấu, là cây thuốc mọc rải rác ở một số tỉnh phía Bắc, Thừa Thiên - Huế, Bà Rịa - Vũng Tàu... thuộc chi Riềng (*Alpinia*), họ Gừng (*Zingiberaceae*).

Cây Riềng ảm là một loại cây lâu năm, tương đối cao (trung bình 2-3 m), phát triển thành các cụm thẳng đứng, rễ to, mập. Lá có phiến to, màu xanh, dài 25-70 cm, rộng 6-10 cm, cuống dài 2-5 cm, mép cao 1,2 cm. Hoa màu trắng, bầu vàng, mọc thành chùm, cụm hoa ở ngọn, rủ xuống, dài 20-40 cm, lá bắc dài 2-3 cm làm thành bao trắng, chóp hồng, dài cao 2 cm; cánh hoa 2,5 cm, môi dài 3,5 cm, vàng. Quả to, đường kính khoảng 2 cm, khi chín có màu đỏ. Mùa ra hoa tháng 3-4, quả chín từ cuối tháng 8-9. Cây Riềng ảm phát triển tốt ở nhiệt độ từ 20°C [1-4]. Các bộ phận lá và thân rễ của loài này được sử dụng làm thuốc (theo y học cổ truyền ở nhiều quốc gia trên thế giới như Ý, Nhật Bản, Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam, Myanma...).

Các nghiên cứu hiện đại xác nhận thành phần hóa học chính của Riềng ảm có nhóm kavalactone [gồm dihydro-5,6-dehydrokavain (DDK), 5,6-dehydrokavain (DK)] và acid béo (gồm acid chlorogenic, acid ferulic, quercetin, catechin, epicatechin, p-hydroxycinnamaldehyde,

dihydroflavokavain B...). Ngoài ra, còn có nhiều thành phần tinh dầu khác nhau như methyl cinnamate, eugenol, pinene, cadimene... Bên cạnh đó, Riềng ảm đã được chứng minh có các tác dụng như tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể, điều trị vết loét, đau nhức cơ, chống oxy hóa, giảm đường huyết, giảm huyết áp, hạn chế rối loạn lipid máu chống béo phì, phòng ngừa bệnh lý tim mạch và đột quy, ức chế dòng tế bào ung thư PACA-2, Panc-1, HCT116, A549... [5-9].

Với nhiều tác dụng nêu trên nhưng cây Riềng ảm ở ngoài tự nhiên lại phát triển không nhiều, hạt cây này có tỷ lệ nảy mầm rất thấp (chỉ đạt khoảng 10%), tại Nhật Bản chỉ phát triển được ở đảo Okinawa. Ở Việt Nam cho đến nay chưa có nghiên cứu sâu nào về cây Riềng ảm, đặc biệt là những nghiên cứu về kỹ thuật gieo ươm, trồng và chăm sóc. Chính vì thế, để góp phần cung cấp những cơ sở khoa học cho việc phát triển loài cây này, việc nghiên cứu khả năng nhân giống bằng hạt và sinh trưởng của cây Riềng ảm ở giai đoạn vườn ươm là rất cần thiết.

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Quả Riềng ảm được thu hái trên cây mẹ khỏe mạnh, không sâu bệnh tại Vĩnh Phúc (cây này được mang từ Nhật Bản sang trồng ở Vĩnh Phúc). Quả được phơi khô và bóc

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

A study on seed germination and seedling initial growth of *Alpinia Zerumbet* (Pers.) originating from Japan

Thi My Phuong Pham*, Ngoc Quy Nguyen,
Thi Mai Dung To, Van Tu Doan

*Institute of Regional Research and Development,
Ministry of Science and Technology*

Received 14 February 2020; accepted 23 March 2020

Abstract:

In natural condition, *Alpinia Zerumbet* (Pers.) only grows in certain areas; its seeds are difficult to germinate. This study aims to evaluate a number of factors affecting the sprouting ability of those seeds originating from Japan. Warmly dried *Alpinia Zerumbet* (Pers.) seeds were incubated at different temperatures and amounts of GA3, which have different germination rates. At 40°C, the germination rate reached 75, 88, 87, and 86%, respectively, with concentrations of GA3 in 5, 10, 20, and 30 ppm. The germination of the seed started from the 10th day after incubation and ended on the 22nd day. The germinated seeds were sown in plastic trays with 80% of alluvial soils of the Red River + 20% of microbial fertilisers, giving a survival rate of 97%, and on average, tree's height after 45 days was 7.6-8.1 cm.

Keywords: *Alpinia Zerumbet* (Pers.), germination rate, seed germination.

Classification number: 4.1

tách ra để lấy hạt, chọn các hạt chắc, có kích thước tương đối đồng đều nhau.

Chất kích thích hạt nảy mầm sử dụng là Gibberellin A3 (GA3) được sản xuất từ Nhật Bản.

Các dụng cụ và thiết bị dùng trong thí nghiệm gồm: ống đong, cốc đong, tủ ẩm, khay nhựa, cân phân tích...

Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu đặc điểm hình thái, chất lượng quả và hạt giống.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của các biện pháp xử lý đến tỷ lệ nảy mầm của hạt (nhiệt độ, hàm lượng GA3 bổ sung).

- Nghiên cứu tỷ lệ sống và phát triển của cây con.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định đặc điểm hình thái, chất lượng quả và hạt giống:

Xác định kích thước quả bằng thước kẹp kỹ thuật Panme (Hãng Mitutoyo, Nhật Bản), phạm vi đo 0-200 mm, độ chia 0,05 mm.

Số quả được quan sát là 30 quả, lấy ngẫu nhiên từ lô quả được thu hái.

Màu sắc quả được quan sát trực tiếp trong quá trình chín.

Trọng lượng hạt được cân bằng cân phân tích có độ chính xác 10⁻⁴.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các biện pháp xử lý đến tỷ lệ nảy mầm của hạt: hạt dùng trong thí nghiệm là các hạt được chọn tương đối đồng đều về kích cỡ và trọng lượng.

+ Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng nảy mầm của hạt: thí nghiệm được bố trí như sau (hạt được ngâm ủ 8 h ở tất cả các công thức): đối chứng (ĐC): ngâm hạt ở nhiệt độ phòng; CT1: ngâm hạt ở 30°C; CT2: ngâm hạt ở 40°C; CT3: ngâm hạt ở 50°C; CT4: ngâm hạt ở 60°C.

Nhiệt độ được duy trì trong tủ ẩm. Thí nghiệm được tiến hành theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với các công thức khác nhau, mỗi công thức lặp lại 3 lần, số lượng hạt trong mỗi công thức là 100 hạt. Hạt sau khi ngâm được vớt ra và ủ trong khăn vải, để ở nhiệt độ phòng (khoảng 23-25°C). Nhiệt độ tối ưu rút ra từ thí nghiệm này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

+ Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng GA3 đến tỷ lệ nảy mầm của hạt: hạt giống được ngâm ở nhiệt độ 40°C (nhiệt độ tối ưu được lựa chọn ở trên) trong 8 h với các công thức thí nghiệm bổ sung GA3 ở nồng độ khác nhau, cụ thể: ĐC: không xử lý GA3; CT1: ngâm hạt trong dung dịch có

bổ sung GA3 với nồng độ 5 ppm; CT2: ngâm hạt trong dung dịch có bổ sung GA3 với nồng độ 10 ppm; CT3: ngâm hạt trong dung dịch có bổ sung GA3 với nồng độ 20 ppm; CT4: ngâm hạt trong dung dịch có bổ sung GA3 với nồng độ 30 ppm.

+ Nghiên cứu khả năng nảy mầm của hạt giống theo TCVN 8548:2011 về kiểm nghiệm hạt giống cây trồng.

Tỷ lệ nảy mầm (%) = (Số hạt nảy mầm/Tổng số hạt kiểm nghiệm) x 100

Phương pháp nghiên cứu sự phát triển của cây con sau khi gieo hạt:

Hạt sau khi nảy mầm được gieo vào các khay nhựa, diện tích khay 25x50 cm, mỗi khay có 50 ô. Giá thể dùng để gieo hạt là đất phù sa sông Hồng và phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm tỷ lệ 80:20.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, theo dõi khả năng mọc cây và tăng trưởng của cây, thời gian theo dõi trong 45 ngày sau khi gieo hạt đã nảy mầm vào giá thể.

Các chỉ tiêu theo dõi

Tỷ lệ nảy mầm của hạt Riêng ăm, tỷ lệ mọc cây, sự phát triển của cây con: chiều dài lá.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp, phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Đặc điểm hình thái và chất lượng hạt giống

Quả cây Riêng ăm hơi tròn, khi non có màu xanh, khi chín có màu đỏ. Đường kính quả từ 1,35-2,15 cm. Quả có nhiều hạt, số hạt trong quả 25-40 hạt, hạt có khối lượng trung bình khoảng 0,038 g. Hạt được bao phủ bên ngoài một lớp màng mỏng màu trắng (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh quả và hạt cây Riêng ăm.

Ảnh hưởng của các biện pháp xử lý đến tỷ lệ nảy mầm của hạt

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng nảy mầm của hạt.

Công thức thí nghiệm	Số hạt thí nghiệm	Số hạt nảy mầm trung bình sau khi ủ								Tỷ lệ nảy mầm của hạt sau 22 ngày ủ (%)
		Sau 9 ngày	Sau 10 ngày	Sau 12 ngày	Sau 14 ngày	Sau 16 ngày	Sau 18 ngày	Sau 20 ngày	Sau 22 ngày	
ĐC	100	0	0	3	8	16	22	25	27	27
CT1	100	0	2	7	19	28	43	45	46	46
CT2	100	0	3	12	28	45	63	67	68	68
CT3	100	0	3	10	23	38	57	60	61	61
CT4	100	0	2	9	24	32	48	50	52	52

Kết quả bảng 1 cho thấy, ở hầu hết các công thức thí nghiệm thì sau 9 ngày ủ, bước sang ngày thứ 10 hạt Riêng ăm bắt đầu nảy mầm, riêng ở công thức đối chứng (ĐC) bước sang ngày 12 mới có hạt nảy mầm. Số lượng hạt nảy mầm tăng theo thời gian ủ và sau 22 ngày ủ thì hạt kết thúc sự nảy mầm. Tỷ lệ nảy mầm của hạt dao động 27-68%, thấp nhất ở công thức đối chứng (chỉ đạt 27%) và cao nhất ở công thức CT2 (đạt 68%). Ở CT1, CT3, CT4, tức hạt được ngâm ở nhiệt độ tương ứng là 30, 50 và 60°C thì tỷ lệ nảy mầm của hạt tương ứng đạt 46, 61 và 52%. Khi tăng nhiệt độ ngâm hạt từ 40 lên 50°C (CT3) và 60°C (CT4) thì tỷ lệ nảy mầm của hạt có xu hướng giảm, tương ứng là 61 và 52%. Kết quả cho thấy, nhiệt độ ngâm hạt khác nhau ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ nảy mầm của hạt, tỷ lệ hạt nảy mầm đạt cao nhất ở CT2 - ngâm hạt ở 40°C.

Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng GA3 đến tỷ lệ nảy mầm của hạt

Sau khi lựa chọn các hạt có kích thước đồng đều, cho hạt vào dung dịch GA3 với các nồng độ khác nhau, ngâm ở nhiệt độ 40°C trong vòng 8 h. Hạt sau khi ngâm được vớt ra để ráo và ủ ở nhiệt độ phòng (khoảng 23-25°C), theo dõi tỷ lệ nảy mầm của hạt, kết quả thu được như bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất kích thích GA3 đến khả năng nảy mầm của hạt.

Công thức thí nghiệm	Số hạt thí nghiệm	Số hạt nảy mầm trung bình sau khi ủ								Tỷ lệ nảy mầm của hạt sau 22 ngày ủ (%)
		Sau 9 ngày	Sau 10 ngày	Sau 12 ngày	Sau 14 ngày	Sau 16 ngày	Sau 18 ngày	Sau 20 ngày	Sau 22 ngày	
ĐC	100	0	3	12	28	45	63	67	68	68
CT1	100	0	6	19	40	52	68	73	75	75
CT2	100	0	9	26	48	70	80	85	88	88
CT3	100	0	10	27	50	72	84	86	87	87
CT4	100	0	10	27	53	74	85	86	86	86

Kết quả bảng 2 cho thấy, hạt cũng bắt đầu nảy mầm sau 10 ngày ủ và sự nảy mầm cũng kết thúc sau 22 ngày ủ. Tuy nhiên, khi bổ sung GA3 vào để ngâm hạt Riềng ảm đã làm thay đổi tốc độ nảy mầm cũng như tỷ lệ nảy mầm của hạt tăng lên đáng kể so với công thức ĐC không bổ sung GA3. Ở công thức CT1 (bổ sung 5 ppm GA3), tỷ lệ nảy mầm của hạt là 75%, tăng 10,29% so với ĐC. Khi tăng nồng độ GA3 lên 20 (CT3) và 30 ppm (CT4) thì tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 88 và 87%, tăng so với công thức đối chứng tương ứng là 29,41 và 27,94%, tuy nhiên so với công thức CT2 thì có sự sai khác không nhiều. Điều đó chứng tỏ bổ sung GA3 đã làm tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt một cách rõ rệt, tuy nhiên tỷ lệ nảy mầm của hạt đạt cao nhất ở mức GA3 bổ sung là 10 ppm. Như vậy, ở nhiệt độ ngâm hạt là 40°C có bổ sung GA3 với nồng độ 10 ppm, ngâm hạt trong 8 h rồi ủ thì sau 22 ngày tỷ lệ nảy mầm của hạt đạt cao nhất (88%).

Nghiên cứu theo dõi sự sinh trưởng phát triển của cây con giai đoạn gieo hạt ra khay nhựa

Hạt đã nảy mầm sau 22 ngày ủ được ương vào các khay nhựa, diện tích khay 25x50 cm. Kết quả theo dõi tỷ lệ sống, chiều cao cây được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ sống và sự phát triển của cây con.

Đợt gieo trồng	Sau trồng (ngày)	Tỷ lệ sống (%)	Cao cây trung bình (cm)	Số lá trung bình (lá)	Dài lá trung bình (cm)
Đợt 1	7-10	95			
	45	93	8,1	3	5,1
Đợt 2	7-10	93			
	45	90	7,9	3	5,1
Đợt 3	7-10	92			
	45	90	7,6	3	5,1

Kết quả bảng 3 cho thấy, cây Riềng ảm con có thể sinh trưởng và phát triển tốt trên giá thể thí nghiệm (đất phù sa sông Hồng và phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm tỷ lệ 80:20) trồng trong khay. Sau 7-10 ngày gieo hạt thì cây đã mọc lên, tỷ lệ hạt mọc thành cây ở các đợt gieo dao động 92-95%. Sau 45 ngày thì cây phát triển được 3 lá và cây khỏe mạnh, cứng cáp, tỷ lệ cây sống lúc này đạt 90-93%. Cây cao trung bình từ 7,6-8,1 cm, lá trung bình dài 5,1 cm. Lúc này, cây có thể được chuyển ra bầu để trồng. Từ kết quả trên cho thấy, hầu hết hạt sau khi xử lý nảy mầm thì khi gieo tỷ lệ mọc thành cây con rất cao, cây phát triển tốt (hình 2).



Hình 2. Hình ảnh cây Riềng ảm gieo từ hạt (28 ngày).

Kết luận

Thu hái quả Riềng ảm vào cuối tháng 8, đầu tháng 9, khi quả chuyển sang giai đoạn chín đỏ, hạt có chất lượng tốt. Quả có đường kính 1,35-2,15 cm, 25-40 hạt, hạt chắc, có khối lượng trung bình khoảng 0,038 g. Hạt được bao phủ bên ngoài một lớp màng mỏng màu trắng.

Xử lý hạt ở các nhiệt độ khác nhau thì tỷ lệ nảy mầm của hạt cũng khác nhau, hạt ngâm ở nhiệt độ 40°C trong tủ ẩm với thời gian 8 h cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất (đạt 68%).

Bổ sung GA3 vào dung dịch ngâm hạt đã làm tăng đáng kể tỷ lệ nảy mầm của hạt, với mức bổ sung 10 ppm GA3 hạt có tỷ lệ nảy mầm cao nhất, đạt 88% sau 22 ngày ủ.

Với giá thể gieo hạt là đất phù sa sông Hồng và phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm tỷ lệ 80:20 cho tỷ lệ sống 90-93%, cây phát triển cứng cáp, với số lá là 3 và đạt chiều cao trung bình 7,6-8,1 cm. Cây này đảm bảo tiêu chuẩn chuyển sang bầu ương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Đỗ Huy Bích (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật.

[2] Lê Đình Bích, Trần Văn Ôn (2007), *Thực vật học*, Nhà xuất bản Y học.

[3] Nguyễn Quốc Bình (2011), *Nghiên cứu phân loại họ gừng (Zingiberaceae Lindl.) ở Việt Nam*, Luận án tiến sỹ, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

[4] Phạm Hoàng Hộ (1993), *Cây cỏ Việt nam*, Nhà xuất bản Trẻ.

[5] R. Choi, et al. (2011), "Effects of ferulic acid on diabetic nephropathy in a rat model of type 2 diabetes", *Experimental and Molecular Medicine*, **43**, pp.676-683.

[6] J. Chompoo, et al. (2012), "Antiatherogenic properties of acetone extract of Alpinia zerumbet seeds", *Molecules*, **17**, pp.6237-6248.

[7] R.S. De Moura, et al. (2005), "Antihypertensive and endothelium dependent vasodilator effects of Alpinia Zerumbet, a medicinal plant", *J. Cardiovasc Pharmacol.*, **46**, pp.288-294.

[8] S. Jin, et al. (2015), "Chlorogenic acid improves late diabetes through adiponectin receptor signaling pathways in db/db Mice", *PLOS ONE*, **10(4)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0120842.

[9] L.Y. Lin, et al. (2008), "Alpinia zerumbet potentially elevates high-density lipoprotein cholesterol level in hamsters", *J. Agric. Food Chem.*, **25**, pp.4435-4443.

Ảnh hưởng của tính chất đất đến sinh trưởng loài cây Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.) tại vùng Tây Bắc Việt Nam

Nguyễn Văn Thanh*, Nguyễn Thị Thu Trang

Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

Ngày nhận bài 15/8/2019; ngày chuyển phản biện 19/8/2019; ngày nhận phản biện 18/9/2019; ngày chấp nhận đăng 27/9/2019

Tóm tắt:

Tai chua (*Garcinia cowa* Roxb.) là loài cây gỗ trung bình, có nhiều công dụng, phân bố và phát triển tốt trên đất phản ứng chua, khả năng trao đổi cation (CEC) trung bình. Tính chất của đất có tác động trực tiếp đến sự sinh trưởng của loài cây này; khu vực có tầng đất dày, hàm lượng dinh dưỡng cao, độ ẩm và độ xốp cao thích hợp cho loài Tai chua sinh trưởng tốt. Kết quả nghiên cứu tại 3 tỉnh (Hòa Bình, Sơn La, Điện Biên) ở khu vực Tây Bắc cho thấy, đất nơi có cây Tai chua sống có hàm lượng đạm dễ tiêu dao động từ nghèo đến trung bình (3,8-6,51 mg/100 g); lân tổng số dao động từ mức khá đến giàu (0,12-0,21%); kali dễ tiêu và CEC trong đất ở mức trung bình, đạt 13,03-14,0 mg/100 g và 12,17-17,91 meq/100 g. Độ ẩm đất dao động 3,60-4,20%, tỷ trọng 2,72-2,75, dung trọng 1,14-1,22 và độ xốp 56,6-63,0% (khá xốp). Trong 3 tỉnh nghiên cứu, đất tại Hòa Bình có tầng dày hơn, hàm lượng đạm dễ tiêu và lân dễ tiêu cao hơn ở Sơn La và Điện Biên; cây Tai chua ở Hòa Bình sinh trưởng tốt nhất, kém nhất là tại Điện Biên.

Từ khóa: cây Tai chua, sinh trưởng, Tây Bắc Việt Nam, tính chất đất.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Tai chua là cây gỗ trung bình, cao 16-20 m, đường kính đạt 40-60 cm, thân thẳng, gỗ có màu trắng, cứng, thớ thô, được dùng trong xây dựng, đóng đồ đạc trong gia đình [1]. Cây Tai chua là loài cây bản địa đa tác dụng, vừa cho sản phẩm gỗ, vừa cho quả có giá trị thực phẩm cao, có tác dụng giải độc, tăng cường khả năng miễn dịch và năng lượng cho cơ thể. [2, 3]. Hiện nay, cây Tai chua ngày càng được người dân nước ta ưa chuộng, quả Tai chua là loại thức ăn rất quen thuộc của người dân miền Bắc. Ở nước ta, quả Tai chua là nguồn cung cấp acid citric tự nhiên quan trọng, thịt quả khá chua với vị chua thanh mát, thường được phơi khô dùng để nấu canh, đặc biệt để nấu canh riêu cua, kho cá hoặc ngâm với đường làm nước giải khát vào những ngày hè. Sản phẩm quả Tai chua tiêu thụ ngày càng thuận lợi và có giá cao, nhiều địa phương cũng đã lựa chọn Tai chua là một trong những loài cây được sử dụng để trồng rừng sản xuất, rừng phòng hộ.

Tuy nhiên ở Việt Nam, những nghiên cứu về cây Tai chua còn ít và chưa đầy đủ, mới chủ yếu tập trung vào phân bố, phân loại và mô tả hình thái. Gần đây cũng đã có một số tài liệu về sinh thái loài Tai chua nhưng còn khá sơ sài, chưa đáp ứng được nhu cầu đòi hỏi của thực tiễn sản xuất hiện nay, đặc biệt là vùng Tây Bắc. Do vậy, việc nghiên cứu bổ sung những đặc điểm sinh học, sinh thái học... làm cơ sở khoa học cho việc phát triển loài cây này là rất cần thiết.

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn trên, việc nghiên cứu một

số yếu tố môi trường sống ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của loài Tai chua đặt ra là rất cần thiết. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi đề cập tới ảnh hưởng của tính chất đất đến sinh trưởng của loài cây Tai chua tại vùng Tây Bắc Việt Nam. Kết quả nghiên cứu góp phần bổ sung các dữ liệu khoa học cho việc gây trồng, phát triển cây Tai chua tại vùng Tây Bắc, góp phần xóa đói giảm nghèo, nâng cao thu nhập, cải thiện đời sống người dân làm nghề rừng tại đây.

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đất nơi có loài cây Tai chua sinh sống tại 3 tỉnh Hòa Bình, Sơn La và Điện Biên. Nghiên cứu được thực hiện trong năm 2018.

Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số tính chất hóa học đất tới sinh trưởng của cây Tai chua.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của độ dày tầng đất tới sinh trưởng của cây Tai chua.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số tích chất vật lý của đất tới sinh trưởng của Tai chua.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp kế thừa: kế thừa, tham khảo có chọn lọc các tài liệu và kết quả nghiên cứu trước đây.

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

Effects of soil properties on the growth of *Garcinia cowa* Roxb. in the Northwest of Vietnam

Van Thanh Nguyen*, Thi Thu Trang Nguyen

College of Forestry Biotechnology

Received 15 August 2019; accepted 27 September 2019

Abstract:

Garcinia cowa Roxb. is the average tree species, with many uses, and it distributes and develops well on the acidic reaction soil. The soil properties have a direct impact on the growth of this species. Research in the area of Northwest showed soils where *Garcinia cowa* Roxb. lives have the available Nitrogen content ranging from poor to fair level (3.8-6.51 mg/100 g), the total phosphorus ranging from fair to rich (0.12-0.21%), the available kali and CEC at medium level, reaching 13.03-14.0 mg/100 g and 12.17-17.91 meq/100 g, respectively. Soil moisture ranged from 3.60 to 4.20%; proportion ranged from 2.72 to 2.75; density ranged from 1.14 to 1.22; and porosity ranged from 56.60 to 63.00% in fairly porous level. In the three provinces of the studied region, *Garcinia cowa* Roxb. in Hoa Binh province grew the best because Hoa Binh has the thicker layer of land, and the available N, available K₂O and total P₂O₅ contents that were higher than in Son La and Dien Bien provinces.

Keywords: *Garcinia cowa* Roxb., growth, Northwest of Vietnam, soil properties.

Classification number: 4.1

Phương pháp điều tra thực địa và lấy mẫu:

- Thu thập số liệu cây Tai chua: bằng phương pháp thiết lập 7 ô tiêu chuẩn đại diện điển hình cho mỗi dạng lập địa của mỗi tỉnh, tổng số ô tiêu chuẩn là 21. Các ô được lập có diện tích là 1.000 m²/ô (40x25 m) bằng máy GPS, để đánh giá sinh trưởng của cây Tai chua, các chỉ tiêu sinh trưởng của loài Tai chua bao gồm: đường kính ngang ngực (D_{1,3}), chiều cao vút ngọn (Hvn), đường kính tán (Dt) được thu thập theo các phương pháp điều tra lâm học.

- Lấy mẫu đất: tại mỗi ô tiêu chuẩn ở mỗi tỉnh nghiên cứu lấy mẫu đất để phân tích bằng cách đào 1 phần diện phụ, mẫu đất được lấy theo 3 tầng: 0-25, 25-50 và 50-75 cm, tổng số mẫu lấy để phân tích là 63 mẫu.

Phương pháp nội nghiệp: mẫu đất lấy về được tiến hành phân tích một số chỉ tiêu vật lý, hóa học trong phòng thí nghiệm của Viện Nghiên cứu Sinh thái và Môi trường rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, cụ thể như sau:

+ Dung trọng được xác định bằng ống dung trọng có thể tích 100 cm³.

+ Độ xốp (X) được xác định thông qua tỷ trọng và dung trọng [4].

$$X = (1 - D/d) * 100$$

Trong đó: D là dung trọng; d là tỷ trọng của đất.

+ CEC: theo TCVN 8568:2010.

+ Lân tổng số được xác định theo phương pháp thử TCVN 8940:2011.

+ Đạm dễ tiêu (mg/100 g đất): theo TCVN 5255:2009.

+ Kali dễ tiêu (mg/100 g đất): theo TCVN 8662:2011.

+ pH_{KCl}: theo TCVN 5797:2007.

+ Độ ẩm: theo TCVN 4048:2011.

+ Tỷ trọng: theo TCVN 6863:2001.

+ Toàn bộ số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê toán học trong lâm nghiệp trên phần mềm ứng dụng Excel 2013 và SPSS 20.0.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Ảnh hưởng của một số tính chất hóa học đất tới sự sinh trưởng của cây Tai chua

Tai chua là loài cây ưa sáng, sinh trưởng nhanh, thường mọc ở ven rừng rậm ẩm nhiệt đới, hoặc trong rừng thưa, ưa đất sâu, thoát nước [5, 6]. Tính chất hóa học của đất có ảnh hưởng rất lớn tới sự sinh trưởng của các loài thực vật nói chung và Tai chua nói riêng. Kết quả phân tích tính chất hóa học của đất và sinh trưởng của cây Tai chua phân bố tự nhiên trong khu vực nghiên cứu được tổng hợp ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của một số tính chất hóa học đất tới sinh trưởng của cây Tai chua tại khu vực nghiên cứu.

Địa điểm	Độ sâu (cm)	Chỉ tiêu hóa học đất					Sinh trưởng của Tai chua		
		pH _{KCl}	Ndt mg/100 g	P ₂ O ₅ ts %	K ₂ Odt mg/100 g	CEC meq/100 g	D _{1,3} (cm)	Hvn (m)	Dt (m)
Điện Biên	0-25	3,56	4,35	0,18	13,08	12,43	45,2	17,4	3,5
	25-50	3,63	3,63	0,07	12,96	11,86			
	50-75	3,43	3,44	0,11	13,04	12,21			
	Trung bình	3,54	3,80	0,12	13,03	12,17			
Son La	0-25	3,87	5,79	0,18	13,70	15,18	48,1	18,1	3,8
	25-50	3,80	4,83	0,12	13,69	12,82			
	50-75	4,06	4,80	0,13	13,38	11,81			
	Trung bình	3,91	5,14	0,14	13,59	13,27			
Hòa Bình	0-25	3,78	7,41	0,25	13,76	18,29	52,1	21,2	5,2
	25-50	4,19	6,51	0,22	14,50	17,27			
	50-75	4,27	5,63	0,18	13,75	18,17			
	Trung bình	4,08	6,51	0,21	14,00	17,91			

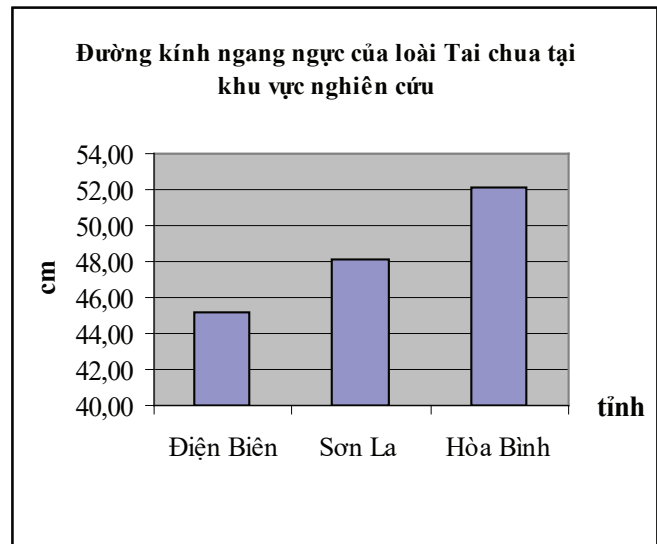
Ghi chú: số liệu phân tích tại Viện Nghiên cứu Sinh thái và Môi trường rừng; Ndt: đạm dễ tiêu; P₂O₅ts: lân tổng số; K₂Odt: kali dễ tiêu.

Từ số liệu bảng 1 cho thấy, đất ở các địa điểm có cây Tai chua phân bố là loại đất có phản ứng chua mạnh (trung bình pH_{KCl} đạt 3,54-4,08), tuy nhiên giá trị này ít có sự khác biệt; đạm dễ tiêu ở mức nghèo đến khá (đạt từ 3,80 mg/100 g, cụ thể nghèo tại Điện Biên, trung bình ở Sơn La và khá ở Hòa Bình). Hàm lượng lân tổng số dao động ở mức từ khá đến giàu (0,12-0,21%), cao nhất ở Hòa Bình. Hàm lượng kali dễ tiêu ở mức trung bình, dao động từ 13,03 đến 14,0 mg/100 g (cao nhất ở Hòa Bình, thấp nhất ở Điện Biên, nhưng sự biến động là không đáng kể). CEC ở mức trung bình, đạt 12,17-17,91 meq/100 g. Khi điều tra số liệu sinh trưởng cho thấy, loài cây Tai chua đạt sinh trưởng tốt nhất về đường kính, chiều cao ở Hòa Bình và thấp nhất ở Điện Biên. Điều này chứng tỏ, cây Tai chua phát triển tốt hơn ở những nơi có hàm lượng các chất dinh dưỡng cao hơn và là loài cây khá phù hợp với đất có pH thấp.

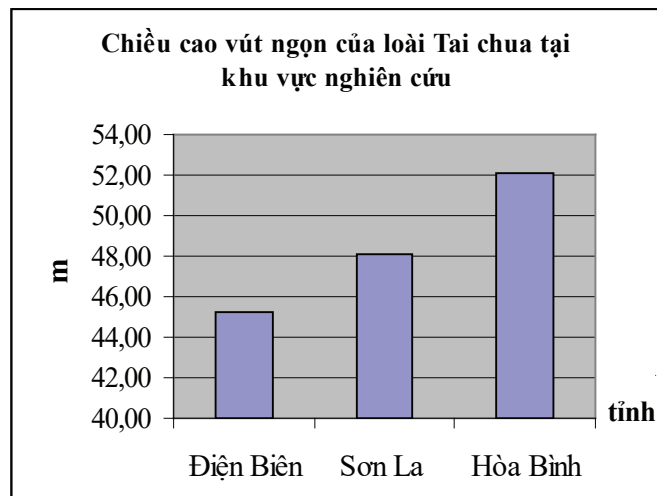
Ảnh hưởng của độ dày tầng đất tới khả năng sinh trưởng của Tai chua

Tai chua là loài cây sinh trưởng trung bình, sinh trưởng phát triển tốt trên đất feralit đỏ vàng phát triển trên đá mẹ phiến thạch sét, phiến thạch mica, riolit; đất có tầng dày, ẩm, thoát nước [2, 5]. Ở độ sâu 0-25 cm cây có rất nhiều rễ con lan rộng, ở độ sâu 25-75 cm gần như chỉ có các rễ to và rễ cọc đâm sâu để bám vào lòng đất. Độ dày tầng đất ở các độ sâu: 0-25 cm gồm tầng O và A; 25-50 cm là một phần tầng A và E; 50-75 cm chủ yếu là tầng B có lẫn tầng E (ảnh hưởng nhiều đến các chỉ tiêu như nitơ dễ tiêu, kali dễ tiêu, lân tổng số). Kết quả cho thấy, khả năng CEC ở các tầng đất cùng các chỉ số nitơ dễ tiêu, lân tổng số, kali dễ tiêu phần lớn cao nhất tại tỉnh Hòa Bình, sau đó đến Sơn La, Điện Biên (bảng 1).

Độ dày tầng đất khác nhau cho thấy, các yếu tố lý hóa tính khác nhau có ảnh hưởng trực tiếp đến hệ rễ của cây Tai chua, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng của loài cây này. Kết quả điều tra thực nghiệm tại hiện trường cho thấy, tại Hòa Bình đất có độ dày tầng đất sâu hơn ở Sơn La và thấp nhất ở Điện Biên, đây là điều kiện thuận lợi cho thực vật nói chung và cây Tai chua nói riêng phát triển hệ rễ đâm sâu... dẫn đến sự đa dạng của các loài sinh vật sinh sống trong hệ sinh thái tại đây. Ngoài ra, theo tổng hợp số liệu điều tra về đường kính ngang ngực ($D_{1,3}$), chiều cao vút ngọn (Hvn) được thu thập cho thấy, cây Tai chua ở Hòa Bình sinh trưởng tốt hơn cả, các yếu tố dinh dưỡng đất ở các độ sâu tầng đất khu vực Tai chua phân bố ở Hòa Bình có chỉ số nitơ dễ tiêu, lân tổng số và kali dễ tiêu cao nhất, thấp nhất là tỉnh Điện Biên. Do vậy ta có thể khẳng định độ phì của đất ở Hòa Bình là cao nhất, sau đó đến Sơn La và Điện Biên. Sự khác nhau này được thể hiện rõ hơn trong hình 1 và 2.



Hình 1. So sánh $D_{1,3}$ của loài Tai chua tại khu vực nghiên cứu.



Hình 2. So sánh Hvn của loài Tai chua tại khu vực nghiên cứu.

Ảnh hưởng của một số tích chất vật lý đất tới sinh trưởng của Tai chua

Đất có một số tính chất vật lý chủ yếu như tỷ trọng, dung trọng, độ xốp, độ ẩm, tính dính, tính dẻo, độ chặt, sức cản... Những tính chất này thường được quyết định bởi các thành phần khoáng vật (nguyên sinh, thứ sinh), thành phần các cấp hạt (cát, limon, sét), thành phần chất hữu cơ có trong đất và tính liên kết giữa các thành phần trên để tạo ra kết cấu của đất. Những tính chất nêu trên của đất có ảnh hưởng trực tiếp đến phân bố cũng như sinh trưởng và phát triển của các loài thực vật, tuy nhiên ở đây chúng tôi chỉ tập trung phân tích về các chỉ tiêu như tỷ trọng, dung trọng, độ xốp và độ ẩm. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng một số tích chất vật lý của đất tới sinh trưởng của Tai chua tại khu vực nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của một số tích chất vật lý đất tới sinh trưởng của Tai chua tại khu vực nghiên cứu.

TT	Địa điểm	Các chỉ tiêu vật lý đất			Sinh trưởng của Tai chua			
		Độ ẩm (%)	Dung trọng (g/cm ³)	Tỷ trọng	Độ xốp (%)	D ₁₅ (cm)	H _m (m)	Dt (m)
1	Điện Biên	3,60	1,22	2,72	56,80	45,20	17,40	3,50
2	Son La	3,80	1,19	2,73	58,60	48,10	18,10	3,80
3	Hòa Bình	4,02	1,14	2,75	63,00	52,10	21,20	5,20

Kết quả bảng 2 cho thấy, đất ở 3 tỉnh Tây Bắc có tính chất vật lý khác nhau. Về độ ẩm tại 3 tỉnh dao động trong khoảng 3,60-4,02%, cao nhất tại Hòa Bình, thấp nhất tại Điện Biên. Dung trọng của đất tại 3 tỉnh nghiên cứu cũng có sự khác nhau nhưng không nhiều, dao động từ 1,14 đến 1,22 g/cm³, ở Hòa Bình đất bị nén ít nhất, sau đó đến Sơn La và Điện Biên. Từ kết quả phân tích dung trọng cho thấy, đất tại khu vực nghiên cứu thuộc nhóm đất bị nén ít (theo đánh giá dung trọng đất của Katrinski).

Tỷ trọng đất dao động trong khoảng 2,72-2,75 tại 3 tỉnh, như vậy chúng không có sự khác biệt nhiều và đều thuộc loại đất nghèo mùn. Về độ xốp đất, kết quả tính toán cho thấy tại các tỉnh nghiên cứu nơi có Tai chua phân bố, đất có độ xốp dao động từ 56,8 đến 63,0%. Theo đánh giá của S.V. Astapôp thì độ xốp của đất tại khu vực nghiên cứu ở cấp độ II, đất pha xốp (đất xốp).

Điều này chứng tỏ Tai chua ưa phân bố ở những nơi đất có độ xốp tương đối cao. Đây cũng là cơ sở khoa học quan trọng để lựa chọn vùng đất phù hợp cho việc gây trồng Tai chua quy mô lớn. Sinh trưởng của Tai chua, qua điều tra bước đầu chúng tôi nhận thấy bị tác động bởi tính chất vật lý của đất nhưng ngoài ra còn chịu chi phối bởi nhiều yếu tố khác như mật độ cây, tổ thành loài. Cây Tai chua ở Hòa Bình sinh trưởng tốt, không sâu bệnh, mùa quả sớm hơn ở 2 tỉnh Sơn La và Điện Biên. Qua số liệu điều tra thực địa tại 3 tỉnh và kết quả phân tích một số tính chất vật lý đất tại khu vực nghiên cứu bước đầu cho thấy, đất ở tỉnh Hòa Bình thích

hợp hơn cả cho cây Tai chua sinh trưởng, kể đến là Sơn La và Điện Biên. Tuy nhiên, đây mới chỉ là những nhận xét ban đầu, cần có những nghiên cứu sâu hơn về điều kiện sinh trưởng tối ưu cho loài cây Tai chua tại khu vực nghiên cứu.

Kết luận

Nhìn chung tính chất đất có ảnh hưởng khá rõ rệt tới sinh trưởng của loài cây Tai chua tại vùng Tây Bắc Việt Nam, cụ thể: về tính chất hóa học đất, cây Tai chua là loài cây khá phù hợp ở những nơi đất có pH thấp (ở mức chua mạnh), sinh trưởng tốt hơn ở những nơi đất giàu dinh dưỡng, CEC trong đất ở mức trung bình; độ ẩm và độ dày tầng đất cũng ảnh hưởng tới sinh trưởng của loài cây Tai chua. Loài Tai chua sinh trưởng tốt hơn ở những nơi có độ ẩm cao nhưng thoát nước, độ dày tầng đất sâu; sinh trưởng của Tai chua bị tác động bởi dung trọng, tỷ trọng và độ xốp, thích hợp với những nơi đất có dung trọng và tỷ trọng cao, đất xốp, ít bị nén. Đất tại tỉnh Hòa Bình thích hợp hơn cả cho cây Tai chua sinh trưởng tốt so với Sơn La và Điện Biên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2006), *Dự án hỗ trợ chuyên ngành lâm sản ngoài gỗ tại Việt Nam pha II - Bộ tài liệu khuyến lâm về lâm sản ngoài gỗ - Kỹ thuật trồng Tai chua*.
- [2] Lê Mộng Chân, Lê Thị Huyền (2000), *Thực vật rừng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [3] Nguyen Thi Thu Hang, Nguyen Van Thanh, Nguyen Thi Hong Nhung (2018), "Determination of some ingredients of components and biological activity of Garcinia Cowa fruit", *Journal of Forestry Science and Technology*, **2**, pp.10-14.
- [4] Hà Quang Khải, Đỗ Đình Sâm, Đỗ Thanh Hoa (2000), *Đất lâm nghiệp*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [5] Trần Ngọc Hải (2007), *Kỹ thuật gây trồng một số loài cây lâm sản ngoài gỗ dưới tán rừng*, Trường Đại học Lâm nghiệp.
- [6] Trần Hợp (2002), *Tài nguyên cây gỗ Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Năng suất sinh sản và một số yếu tố ảnh hưởng đến năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2

Trịnh Hồng Sơn*, Phạm Duy Phẩm

Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 10/1/2020; ngày chuyển phản biện 15/1/2020; ngày nhận phản biện 17/2/2020; ngày chấp nhận đăng 26/2/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm đánh giá năng suất sinh sản và một số yếu tố ảnh hưởng đến năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2. Các chỉ tiêu về khả năng sinh sản được đánh giá đối với 35 nái YVN1 và 35 nái YVN2 qua 3 lứa đẻ (từ năm 2017 đến 2019). Kết quả nghiên cứu cho thấy, yếu tố giống ảnh hưởng đến số con sơ sinh (SS)/ổ và số con sơ sinh sống (SSS)/ổ, ảnh hưởng rõ rệt đến số con cai sữa/ổ và khối lượng cai sữa/ổ. Yếu tố lứa đẻ ảnh hưởng đến số con SSS/ổ và khối lượng SSS/ổ, ảnh hưởng rõ rệt đến số con cai sữa/ổ và khối lượng cai sữa/ổ. Lợn nái YVN1 và YVN2 có sinh lý phát dục bình thường với tuổi phối giống lần đầu tương ứng là 220,36 và 222,03 ngày, tuổi đẻ lứa đầu là 335,62 và 336,63 ngày. Năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 đạt cao (YVN2 cao hơn YVN1). Lợn nái YVN1 và YVN2 lần lượt có số con SSS/ổ là 11,51 và 12,12 con, số con cai sữa/ổ là 10,92 và 11,71 con, số con cai sữa/nái/năm là 26,68 và 27,75 con, khối lượng SSS/ổ là 16,46 và 17,49 kg, khối lượng cai sữa/ổ là 70,41 và 75,81 kg. Năng suất sinh sản của cả lợn nái YVN1 và YVN2 tại lứa 1 đều thấp hơn so với lứa 2 và 3.

Từ khóa: năng suất sinh sản, YVN1, YVN2.

Chỉ số phân loại: 4.2

Đặt vấn đề

Giống lợn Yorkshire được nhập từ Công ty Genplus của Pháp và Công ty Cedar Ridge Genetics của Mỹ, đây là các công ty đầu ngành về nghiên cứu di truyền nhằm nâng cao năng suất và chất lượng giống lợn. Đàn lợn nhập về có tiềm năng di truyền tốt, có khả năng sinh trưởng cao, năng suất sinh sản và chất lượng thịt tốt. Việc nhập các nguồn gen quý trên thế giới để đẩy nhanh tiến bộ di truyền trong quần thể, giúp nâng cao năng suất chất lượng đàn lợn tại Việt Nam nói chung và tại Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương nói riêng.

Giống lợn Yorkshire có nguồn gốc từ Pháp với ngoại hình trường mình và sinh sản tốt, giống lợn Yorkshire có nguồn gốc từ Mỹ với móng vai phát triển và sinh trưởng cao. Khi kết hợp hai nguồn gen quý trên sẽ tạo được giống lợn Yorkshire có tiềm năng di truyền tốt về khả năng sinh trưởng và sinh sản, trường mình và móng vai phát triển. Đây là cơ sở để phối hợp nguồn gen và chọn lọc nhân thuần để tạo ra giống lợn Yorkshire mang thương hiệu Việt Nam.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng sinh sản và một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của lợn YVN1 (♂ Yorkshire Pháp x ♀ Yorkshire Mỹ) và YVN2 (♂ Yorkshire Mỹ x ♀ Yorkshire Pháp) làm nguồn cơ

sở dữ liệu để chọn lọc nhân thuần nâng cao năng suất chất lượng đàn lợn giống.

Đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Đánh giá năng suất sinh sản: 35 lợn nái YVN1 (♂ Yorkshire Pháp x ♀ Yorkshire Mỹ) và 35 lợn nái YVN2 (♂ Yorkshire Mỹ x ♀ Yorkshire Pháp), từ tháng 1/2017 đến tháng 8/2019 tại Trạm Nghiên cứu và phát triển giống lợn hạt nhân Tam Điệp (xã Quang Sơn, TP Tam Điệp, tỉnh Ninh Bình) thuộc Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương.

Nội dung

Đánh giá ảnh hưởng của yếu tố giống và lứa đẻ đến một số chỉ tiêu sinh lý phát dục và năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2.

Đánh giá năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2.

Đánh giá năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 qua 3 lứa đẻ (từ lứa 1 đến lứa 3).

Phương pháp

Điều kiện nghiên cứu:

Lợn nái được chọn lọc theo quy định của Trung tâm

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

Reproductive performance and factors affecting reproductive performance of YVN1 and YVN2 sows

Hong Son Trinh*, Duy Pham Pham

National Pig Research and Development Center, NIAS

Received 10 January 2020; accepted 26 February 2020

Abstract:

This study was conducted to evaluate the reproductive performance and factors affecting the reproductive performance of the YVN1 and YVN2 sows in National Pig Research and Development Center. Data were collected from 35 YVN1 sows and 35 YVN2 sows over three litters from 2017 to 2019. The results showed that the breed factor affected the total number of newborn (NB) and newborn alive (NBA), number of pig weaned (NW), and litter weaning weight (LWW). Litter factor effected to NBA, litter birth weight (LBW), NW, and LWW. YVN1 and YVN2 pigs had normal reproductive physiology. The age of the first server of YVN1 and YVN2 was 220.36 and 222.03 days, respectively; age at first farrowing was 335.62 and 336.63 days. YVN1 and YVN2 sows had a high reproductive performance but the reproductive performance of YVN2 sows was higher than those in YVN1 sows. The NBA of YVN1 and YVN2 was 11.51 and 12.12 piglets, respectively, NW was 10.92 and 11.71 piglets, LBW was 16.46 and 17.49 kg, LWW was 70.41 and 75.81 kg. Total number weaning pig/sow/year was 26.68 (YVN1) piglets and 27.75 (YVN2) piglets. Besides, the reproductive performance of the YVN1 and YVN2 sows was the lowest at first litter and slightly increase in second and third litter.

Keywords: reproductive performance, YVN1 sows, YVN2 sows.

Classification number: 4.2

Nghiên cứu lợn Thụy Phương từ lợn cái hậu bị được kiểm tra năng suất đạt tiêu chuẩn chọn giống và được thụ tinh nhân tạo theo sơ đồ ghép phối.

Phương thức phối giống là thụ tinh nhân tạo (phối kép): tinh dịch lợn đực đảm bảo phẩm chất, đạt các chỉ tiêu kỹ thuật quy định tại Quyết định 675/QĐ-BNN-CN của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2014) [1] quy định đối với lợn đực ngoại sử dụng trong thụ tinh nhân tạo.

Các loại lợn được chăm sóc, nuôi dưỡng và phòng trị bệnh thú y theo quy trình của Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương.

Đàn lợn nái được nuôi theo phương thức công nghiệp, chuồng trại đảm bảo yêu cầu thiết kế kỹ thuật. Lợn nái hậu bị, nái chửa nuôi trong cũi trên nền chuồng bê tông; lợn nái đẻ nuôi con trên chuồng lồng.

Thức ăn (TĂ) cho các đối tượng lợn là thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh (bảng 1).

Bảng 1. Thành phần giá trị dinh dưỡng TĂ cho các loại lợn.

Loại TĂ	Số lượng (kg/ngày)	Thành phần giá trị dinh dưỡng					
		CP (%)	ME (Kcal)	Ca (%)	P (%)	Lysin (%)	Met/Cyst (%)
TĂ cho lợn tập ăn	Tự do	22,0	3350	0,95	0,75	1,15	0,70
TĂ cho lợn nái chờ phối	1,8-2,5	14,0	2950	0,75	0,55	0,70	0,50
TĂ cho lợn nái chửa	2,2-3,0	14,0	2950	0,70	0,50	0,60	0,40
TĂ cho lợn nái đẻ	4,0-8,0	16,0	3150	0,90	0,70	0,75	0,50

Ghi chú: CP: protein thô; ME: năng lượng trao đổi; Met/Cyst: Methionine/Cystine.

Phương pháp thu thập số liệu:

Theo dõi, cân đo và ghi chép số liệu năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 từ tháng 1/2017 đến tháng 8/2019.

Với các chỉ tiêu số lượng: đếm số lượng lợn con SS còn sống, để lại nuôi và số con còn sống ở các thời điểm SS, để nuôi và cai sữa.

Với các chỉ tiêu khối lượng: cân xác định khối lượng lợn con ở các thời điểm SS và cai sữa bằng một loại cân thống nhất ở tất cả các lần cân.

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm:

Tuổi phối giống lần đầu (ngày) là số ngày được tính từ khi lợn nái được sinh ra đến khi lợn nái được phối giống lần đầu.

Tuổi đẻ lứa đầu (ngày) là số ngày được tính từ khi lợn

nái được sinh ra đến khi lợn nái đẻ con lần đầu.

Số con SS/ổ (con) là tổng tất cả số lợn con sinh ra bao gồm số con SS sống, số con chết khi sinh và số con chết lưu.

Số con SSS/ổ (con) là tổng số con đẻ ra còn sống trong vòng 24 giờ kể từ khi lợn nái đẻ xong con cuối cùng của lứa đẻ đó (không tính những con có khối lượng dưới 0,8 kg).

Khối lượng SSS/ổ (kg) là tổng khối lượng của lợn con SS còn sống theo dõi trong 24 giờ sau khi lợn nái đẻ xong con cuối cùng.

Khối lượng SSS/con (kg) là khối lượng SSS/ổ chia cho số con SSS/ổ.

Số con cai sữa/ổ (con) là số con đẻ ra còn sống đến lúc cai sữa tách mẹ.

Khối lượng cai sữa/ổ (kg) là khối lượng toàn ổ lợn con vào thời điểm cai sữa.

Khối lượng cai sữa/con (kg) là khối lượng từng con vào thời điểm cai sữa.

Tuổi cai sữa (ngày) là khoảng thời gian từ ngày đẻ đến ngày cai sữa lợn con.

Số lứa đẻ/năm là thương giữa số ngày trong một năm/khoảng cách lứa đẻ.

Số con cai sữa/nái/năm (con) là tích giữa số lứa đẻ/năm và số con cai sữa/lứa.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1 (2002). Phân tích ảnh hưởng của một số yếu tố đến năng suất sinh sản của lợn YVN1 và YVN2 theo công thức sau:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + L_j + e_{ijk}$$

Trong đó: y_{ijk} : các chỉ tiêu về năng suất sinh sản; μ : giá trị trung bình; B_i : ảnh hưởng của giống thứ i ($i = 2, YVN1$ và $YVN2$); L_j : ảnh hưởng của lứa thứ j ($j=1, 2$ và 3); e_{ijk} : sai số ngẫu nhiên.

Ước tính giá trị trung bình bình phương nhỏ nhất (LSM), sai số của trung bình bình phương nhỏ nhất (SEM) bằng câu lệnh LSMeans với so sánh cặp bằng pdiff hiệu chỉnh bằng phương pháp Tukey.

Kết quả và thảo luận

Một số yếu tố ảnh hưởng đến năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2

Mức độ ảnh hưởng của một số yếu tố đến năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2.

Chỉ tiêu theo dõi	Yếu tố ảnh hưởng	
	Giống	Lứa
Tuổi phối giống lần đầu (ngày)	NS	-
Tuổi đẻ lứa đầu (ngày)	NS	-
Số con SS/ổ (con)	*	NS
Số con SSS/ổ (con)	*	*
Tỷ lệ SSS (%)	NS	NS
Khối lượng SSS/con (kg)	NS	NS
Khối lượng SSS/ổ (kg)	*	*
Số con cai sữa/ổ (con)	**	**
Tỷ lệ sống đến cai sữa (%)	NS	*
Khối lượng cai sữa/con (kg)	NS	NS
Khối lượng cai sữa/ổ (kg)	**	**
Số lứa/nái/năm	NS	NS
Số lợn con cai sữa/nái/năm (con)	NS	NS

Ghi chú: NS: $p>0,05$; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; -: không kiểm tra.

Kết quả bảng 2 cho thấy, giống ảnh hưởng đến số con cai sữa/ổ và khối lượng cai sữa/ổ ($p<0,01$); số con SS/ổ, số con SSS/ổ và khối lượng SSS/ổ ($p<0,05$), nhưng không ảnh hưởng đến tuổi phối giống lần đầu, tuổi đẻ lứa đầu, tỷ lệ SSS, khối lượng SSS/con, tỷ lệ sống đến cai sữa, khối lượng cai sữa/con, số lứa/nái/năm và số lợn con cai sữa/nái/năm ($p>0,05$). Lứa đẻ không ảnh hưởng đến các chỉ tiêu về năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 ($p>0,05$), ngoại trừ số con cai sữa/ổ và khối lượng cai sữa/ổ ($p<0,01$); số con SSS/ổ, khối lượng SSS/ổ và tỷ lệ nuôi sống đến cai sữa ($p<0,05$).

Kết quả nghiên cứu của Đặng Vũ Bình (1999) [2] cho thấy, lứa đẻ có ảnh hưởng đến tất cả các tính trạng về năng suất sinh sản của lợn nái. Kết quả công bố của Tạ Thị Bích Duyên (2003) [3] cũng cho thấy, lứa đẻ ảnh hưởng rõ rệt đến hầu hết các tính trạng về năng suất sinh sản của lợn nái. Kết quả công bố của Đặng Vũ Bình và cs (2005) [4] cũng cho thấy, các chỉ tiêu về năng suất sinh sản của nái Landrace, Yorkshire có xu hướng thấp nhất ở lứa 1, tăng dần và đạt giá trị cao nhất ở lứa 4. Kết quả công bố của Nguyễn Văn Thắng và Đặng Vũ Bình (2006) [5] cũng chỉ ra rằng, lứa đẻ có ảnh hưởng rõ rệt đến tất cả các chỉ tiêu về năng suất sinh sản của lợn nái. Kết quả công bố của Nguyễn Văn Thắng và Vũ Đình Tôn (2010) [6] cho thấy, yếu tố lứa đẻ có ảnh hưởng rõ rệt đến các chỉ tiêu về năng suất sinh sản của lợn nái ($p<0,001$). Kết quả công bố của Trần Thị Minh Hoàng và cs (2008) [7] khi nghiên cứu trên đàn lợn nái Landrace và Yorkshire nuôi tại Trại Mỹ Văn và Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương cho biết, yếu tố lứa đẻ ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê rõ rệt đến các tính trạng sinh sản.

Năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2

Kết quả theo dõi về khả năng sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương được trình bày ở bảng 3. Theo đó, lợn nái YVN1 và YVN2 có tuổi phối giống lần đầu là 220,36 và 222,03 ngày, tuổi đẻ lứa đầu là 335,62 và 336,63 ngày ($p>0,05$). Kết quả nghiên cứu này thấp hơn so với công bố của Lê Đình Phùng và cs (2011) [8], theo nhóm tác giả này tuổi phối giống lần đầu của lợn nái Yorkshire là 269,0 ngày tuổi.

Năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 đạt mức khá với số con SS/ổ (11,93 và 12,61 con), số con SSS/ổ (11,51 và 12,12 con), số con cai sữa/ổ (10,92 và 11,71 con). Số con SS/ổ tương đương nghiên cứu của Đoàn Phương Thúy và cs (2015) [9] - số con SS/ổ của lợn nái Yorkshire là 11,91, nhưng thấp hơn công bố của Nguyễn Ngọc Thanh Yên và cs (2018) [10] - số con SS/ổ của lợn Yorkshire có nguồn gốc từ Đan Mạch là 15,23 con. Số con SSS/ổ trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn công bố của Đoàn Phương Thúy và cs (2015) [9], Nguyễn Văn Đức và cs (2010) [11] (lần lượt là 10,85, 10,14 con/ổ), nhưng thấp hơn công bố của Nguyễn Ngọc Thanh Yên và cs (2018) [10] khi nghiên cứu trên lợn Yorkshire có nguồn gốc từ Đan Mạch (12,49 con). Số con cai sữa/ổ cao hơn so với công bố về số con cai sữa/ổ lợn Yorkshire của Đoàn Phương Thúy và cs (2015) [9] là 10,31 con; Nguyễn Văn Đức và cs (2010) [11] là 8,85 con; tương đương với công bố của Nguyễn Ngọc Thanh Yên và cs (2018) [10] là 11,66 con.

Bảng 3. Khả năng sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2.

Chỉ tiêu	n	YVN1		YVN2	
		LSM	SE	LSM	SE
Tuổi phối giống lần đầu (ngày)	35	220,36	0,58	222,03	0,69
Tuổi đẻ lứa đầu (ngày)	35	335,62	2,64	336,63	3,15
Số con SS/ổ (con)	105	11,93 ^b	0,17	12,61 ^a	0,20
Số con SSS/ổ (con)	105	11,51 ^b	0,16	12,12 ^a	0,20
Tỷ lệ SSS (%)	105	96,96	0,51	96,14	0,61
Khối lượng SSS/con (kg)	105	1,43	0,01	1,44	0,01
Khối lượng SSS/ổ (kg)	105	16,46 ^b	0,25	17,49 ^a	0,30
Số ngày cai sữa (ngày)	105	22,73	0,10	22,92	0,12
Số con cai sữa/ổ (con)	105	10,92 ^b	0,17	11,71 ^a	0,20
Tỷ lệ sống đến cai sữa (%)	105	94,80	0,57	96,54	0,69
Khối lượng cai sữa/con (kg)	105	6,46	0,03	6,46	0,04
Khối lượng cai sữa/ổ (kg)	105	70,41 ^b	1,13	75,81 ^a	1,35
Số lứa/nái/năm	70	2,38	0,02	2,36	0,03
Số lợn con cai sữa/nái/năm (con)	70	26,68	0,55	27,75	0,66

Ghi chú: trong cùng một chỉ tiêu, các giá trị LSM mang chữ cái khác nhau sai khác có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

Lợn nái YVN1 và YVN2 có khối lượng SSS/ổ đạt tương ứng là 16,46 và 17,49 kg, khối lượng cai sữa/ổ là 70,41 và 75,81 kg. Khối lượng cai sữa/con là 6,46 kg, cao hơn công bố của một số tác giả về lợn nái Yorkshire, cụ thể: khối lượng cai sữa/con theo nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Phục và cs (2009) [12] là 5,95 kg; Lê Đình Phùng và cs (2011) [8] là 6,14 kg;

Hoàng Thị Thủy (2011) [13] là 6,42 kg. Nhưng thấp hơn công bố của Đoàn Phương Thúy và cs (2015) [9] (6,61 kg).

Số con SS/ổ (11,93 con), số con SSS/ổ (11,51 con), số con cai sữa/ổ (10,92 con) và khối lượng cai sữa/ổ (70,41 kg) của lợn nái YVN1 có xu hướng thấp hơn so với lợn nái YVN2 (12,61 con; 12,12 con; 11,71 con và 75,81 kg). Sự sai khác về các chỉ tiêu này có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Như vậy, việc lựa chọn lợn nái YVN2 làm giống có thể cải thiện được số con SSS/ổ, số con cai sữa và khối lượng cai sữa/ổ so với lợn nái YVN1.

Như vậy, các chỉ tiêu về năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 trong nghiên cứu này có xu hướng cao hơn so với kết quả đã công bố của các tác giả nêu trên.

Năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 theo lứa đẻ

Kết quả theo dõi về năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 theo lứa đẻ được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 theo lứa đẻ (n=35).

Chỉ tiêu	Lứa 1	Lứa 2	Lứa 3	SEM
Số con SS/ổ (con)	11,60	11,92	12,26	0,33
Số con SSS/ổ (con)	11,00	11,62	11,92	0,30
Tỷ lệ SSS (%)	95,66	97,69	97,52	0,87
Khối lượng SSS/con (kg)	1,41	1,45	1,45	0,02
Khối lượng SSS/ổ (kg)	16,25	17,19	17,62	0,44
Số ngày cai sữa (ngày)	23,04	22,58	22,58	0,16
Số con cai sữa/ổ (con)	10,32	11,12	11,32	0,31
Tỷ lệ sống đến cai sữa (%)	93,98	95,65	94,79	1,09
Khối lượng cai sữa/con (kg)	6,42	6,49	6,49	0,03
Khối lượng cai sữa/ổ (kg)	66,05 ^b	71,96 ^a	73,23 ^a	1,91

Ghi chú: trong cùng một chỉ tiêu, các giá trị LSM mang chữ cái khác nhau, sai khác có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

Kết quả bảng 4 cho thấy, lợn nái YVN1 có số con SS/ổ, số con SSS/ổ và số con cai sữa/ổ có xu hướng đạt thấp ở lứa 1 (11,60; 11,00 và 10,32 con), tăng lên ở lứa 2 (11,92; 11,62 và 11,12 con) và đạt cao nhất ở lứa 3 (12,26; 11,92 và 11,32 con). Tuy nhiên, sự sai khác về các chỉ tiêu này của lợn nái YVN1 qua các lứa đẻ không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Khối lượng cai sữa/ổ của lợn nái YVN1 có xu hướng thấp ở lứa 1 (66,05 kg), tăng lên ở lứa 2 (71,96 kg) và đạt cao nhất ở lứa 3 (73,23 kg). Sự sai khác ở chỉ tiêu khối lượng cai sữa/ổ qua các lứa đẻ có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

Năng suất sinh sản của lợn nái YVN2 theo lứa đẻ

Kết quả bảng 5 cho thấy, lợn nái YVN2 có số con SS/ổ và số con cai sữa/ổ có xu hướng đạt thấp ở lứa 1 (12,06 và 11,14 con), tăng lên ở lứa 2 (12,86 và 11,97 con) và đạt cao nhất ở lứa 3 (12,91 và 12,03 con). Tuy nhiên, sự sai khác về các chỉ tiêu này của lợn nái YVN2 qua các lứa đẻ không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Tỷ lệ sống đến cai sữa của lợn nái YVN2 có xu hướng thấp ở lứa 1 (94,69%), tăng lên ở lứa 2 (96,30%) và đạt cao nhất ở lứa 3 (98,63%). Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

Bảng 5. Năng suất sinh sản của lợn nái YVN2 theo lứa đẻ (n=35).

Chỉ tiêu	Lứa 1	Lứa 2	Lứa 3	SEM
Số con SS/ổ (con)	12,06	12,86	12,91	0,28
Số con SSS/ổ (con)	11,77	12,40	12,20	0,31
Tỷ lệ SSS (%)	97,50	96,49	94,43	1,08
Khối lượng SSS/con (kg)	1,44	1,45	1,44	0,01
Khối lượng SSS/ổ (kg)	16,96	17,94	17,58	0,51
Số ngày cai sữa (ngày)	22,94	22,94	22,89	0,22
Số con cai sữa/ổ (con)	11,14	11,97	12,03	0,33
Tỷ lệ sống đến cai sữa (%)	94,69 ^b	96,30 ^{ab}	98,63 ^a	1,00
Khối lượng cai sữa/con (kg)	6,36	6,55	6,47	0,09
Khối lượng cai sữa/ổ (kg)	70,86	78,75	77,81	2,44

Ghi chú: trong cùng một chỉ tiêu, các giá trị LSM mang chữ cái khác nhau, sai khác có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 qua các lứa đẻ hoàn toàn phù hợp với những kết quả công bố của Aherne và Kirkwood (2011) [14]; Dan và Summers (1996) [15]; Phan Xuân Hào (2002) [16]; Tạ Thị Bích Duyên (2003) [3]. Kết quả công bố của Phan Xuân Hào (2002) [16] khi nghiên cứu trên đàn lợn nái sinh sản Landrace và Yorkshire từ lứa đẻ 1 đến 6 cho biết, số con đẻ ra trong ổ ở lứa đẻ thứ 1 là thấp nhất, sau đó tăng dần từ lứa đẻ thứ 2, đạt giá trị cao nhất ở lứa đẻ thứ 5 và giảm ở lứa đẻ thứ 6. Kết quả công bố của Tạ Thị Bích Duyên (2003) [3] khi theo dõi năng suất sinh sản lợn nái Landrace và Yorkshire qua các lứa đẻ cũng nhận thấy, số con SS tăng từ lứa 1 đến 4 tương ứng 8,74-10,10 con, đạt cao nhất ở lứa 5 (10,31 con) và giảm ở lứa 6. Kết quả công bố của Aherne và Kirkwood (2001) [14] cho thấy, số con đẻ ra sống thấp nhất ở lứa 1 (9,5 con), tăng lên 10,0 con ở lứa 2, đạt giá trị cao nhất từ lứa 3 đến 5 (10,5-11,5 con) và giảm xuống còn 11 con ở lứa 6. Kết quả công bố của Tretinjak và cs (2009) [17] cho thấy, số con đẻ ra sống đạt thấp nhất ở lứa 1, tăng lên và đạt giá trị cao nhất ở lứa 4, sau đó giảm dần từ lứa 5. Như vậy, năng suất sinh sản của lợn nái YVN1, YVN2 qua các lứa đẻ phù hợp với kết quả đã công bố của các tác giả trong, ngoài nước và tuân theo quy luật sinh sản chung của lợn nái.

Kết luận

Yếu tố giống ảnh hưởng đến số con SS/ổ, số con SSS/ổ và khối lượng SSS/ổ; ảnh hưởng rõ rệt đến số con cai sữa/ổ và khối lượng cai sữa/ổ. Yếu tố lứa đẻ ảnh hưởng đến số con SSS/ổ, khối lượng SSS/ổ và tỷ lệ nuôi sống đến cai sữa; ảnh hưởng rõ rệt đến số con cai sữa/ổ và khối lượng cai sữa/ổ.

Lợn nái YVN1 và YVN2 có sinh lý phát dục bình thường với tuổi phối giống lần đầu tương ứng là 220,36 và 222,03 ngày, tuổi đẻ lứa đầu 335,62 và 336,63 ngày. Năng suất sinh sản của lợn nái YVN1 và YVN2 đều đạt cao, nhưng lợn nái YVN2 đạt cao hơn YVN1. Số con cai sữa/nái/năm của lợn nái YVN1 và YVN2 là 26,68 và 27,75 con, tương ứng khối lượng cai sữa/ổ là 70,41 và 75,81 kg. Năng suất sinh sản của cả lợn nái YVN1 và YVN2 tại lứa 1 thấp hơn so với lứa 2 và 3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2014), *Quyết định 675/QĐ-BNN-CN về việc phê duyệt các chỉ tiêu định mức kinh tế - kỹ thuật cho các đàn vật nuôi giống gốc*.

[2] Đặng Vũ Bình (1999), “Phân tích một số yếu tố ảnh hưởng tới các tính trạng năng suất sinh sản trong một lứa đẻ của lợn nái ngoại”, *Kết quả nghiên cứu khoa học kỹ thuật Khoa Chăn nuôi - Thú y*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

[3] Tạ Thị Bích Duyên (2003), *Xác định một số đặc điểm di truyền, giá trị giống về khả năng sinh sản của lợn Yorkshire và Landrace nuôi tại các cơ sở An Khánh, Thụy Phương và Đông Á*, Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Viện Chăn nuôi.

[4] Đặng Vũ Bình, Nguyễn Văn Tường, Đoàn Văn Soạn và Nguyễn Thị Kim Dung (2005), “Khả năng sản xuất của một số công thức lai của đàn lợn nuôi tại Xi nghiệp chăn nuôi Đông Hiệp, Hải Phòng”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **3(4)**, tr.301-306.

[5] Nguyễn Văn Thắng, Đặng Vũ Bình (2006), “Năng suất sinh sản, nuôi thịt và chất lượng thịt của lợn nái Y phối giống với lợn đực L và Pi”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Chăn nuôi*, **12(94)**, tr.4-7.

[6] Nguyễn Văn Thắng, Vũ Đình Tôn (2010), “Năng suất sinh sản, sinh trưởng, thân thịt và chất lượng thịt của các lợn lai giữa lợn nái F1(Landrace x Yorkshire) với đực giống Landrace, Duroc và PiDu”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp*, **8(1)**, tr.98-105.

[7] Trần Thị Minh Hoàng, Tạ Thị Bích Duyên, Nguyễn Quế Côi (2008), “Một số yếu tố ảnh hưởng đến năng suất sinh sản của đàn lợn nái Landrace và Yorkshire nuôi tại Mỹ Văn, Tam Điệp và Thụy Phương”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, **10**, tr.23-30.

[8] Lê Đình Phùng, Lê Lan Phương, Phạm Khánh Từ, Hoàng Nghĩa Duyệt, Mai Đức Chung (2011), “Ảnh hưởng của một số nhân tố đến khả năng sinh sản của lợn nái Landrace, Yorkshire & F1(Landrace x Yorkshire) nuôi trong các trang trại tại tỉnh Quảng Bình”, *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, **64**, tr.99-114.

[9] Đoàn Phương Thủy, Phạm Văn Học, Trần Xuân Mạnh, Lưu Văn Tráng, Đoàn Văn Soạn, Vũ Đình Tôn, Đặng Vũ Bình (2015), “Năng suất sinh sản và định hướng chọn lọc đối với lợn nái Duroc, Landrace và Yorkshire tại Công ty TNHH lợn giống hạt nhân Dabaco”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **13(8)**, tr.1397-1404.

[10] Nguyễn Ngọc Thanh Yên, Nguyễn Hữu Tinh, Trần Văn Hào (2018), “Yếu tố ảnh hưởng đến năng suất sinh sản ở đàn lợn Landrace và Yorkshire nhập từ Đan Mạch”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Chăn nuôi*, **229**, tr.34-39.

[11] Nguyễn Văn Đức, Bùi Quang Hộ, Giang Hồng Tuyền, Đặng Đình Trung, Nguyễn Văn Trung, Trần Quốc Việt, Nguyễn Thị Viễn (2010), “Năng suất sinh sản, sản xuất của lợn Móng Cái, Pietrain, Landrace, Yorkshire và ưu thế lai của lợn F1(LRxMC), F1(YxMC) và F1(PixMC)”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, **22**, tr.29-36.

[12] Nguyễn Ngọc Phục, Lê Thanh Hải, Đinh Hữu Hùng (2009), “Đánh giá năng suất sinh sản của lợn nái thuần Landrace (L) Yorkshire (Y), nái lai F1(LY-YL), nái VCN22 và khả năng sinh trưởng, cho thịt của lợn thương phẩm hai, ba và bốn giống trong điều kiện chăn nuôi trang trại tại Quảng Bình”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, **16**, tr.1-6.

[13] Hoàng Thị Thùy (2011), *Năng suất sinh sản của lợn Landrace, Yorkshire nhân thuần và các tổ hợp lai chéo giữa chúng nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương*, Luận văn thạc sỹ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

[14] F. Aherne, R. Kirkwood (2011), *Factors Affecting Litter Size*, <https://thepigsite.com/articles/factors-affecting-litter-size>.

[15] T.T. Dan, P.M. Summers (1996), “Reproductive performance of sows in the tropics”, *Trop. Anim. Health and Pro.*, **28**, pp.247-256.

[16] Phan Xuân Hào (2002), *Xác định một số chỉ tiêu về sinh sản, năng suất và chất lượng thịt của lợn Landrace và Yorkshire có các kiểu gen halothan khác nhau*, Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

[17] M. Tretinjak, D. Skorput, M. Ikic, Z. Lukovic (2009), “Litter size of sows at family farms in Republic of Croatia”, *Stocarsvo*, **63(3)**, pp.175-185.

Thiết kế cấu trúc Polycistronic tRNA-gRNA để ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 nhằm nghiên cứu chức năng gen một số gen mã hóa motif ankyrin liên quan đến cấu trúc bông lúa

Phạm Tiên Dũng¹, Lê Thị Nhu^{2,3}, Lê Quang Hòa¹, Stefan Jouannic⁴, Helene Adam⁴, Phạm Xuân Hội², Phạm Thị Mai², Không Ngân Giang^{2*}

¹Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

²Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

⁴Đại học Montpellier, Pháp

Ngày nhận bài 6/1/2020; ngày chuyển phân biện 16/1/2020; ngày nhận phân biện 3/3/2020; ngày chấp nhận đăng 16/3/2020

Tóm tắt:

Motif ankyrin (ANK) là một trong những motif protein lớn nhất trong giới tự nhiên và có vai trò sinh học đa dạng. Hai gen mã hóa protein miền ankyrin *OsANK1*, *OsANK2* được xác định liên quan đến cấu trúc bông lúa thông qua nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) các tính trạng năng suất trên một quần thể lúa bản địa Việt Nam. Các cấu trúc polycistronic tRNA-gRNA (PTG) cho phép chỉnh sửa gen đa điểm được xây dựng nhằm nghiên cứu chức năng 2 gen *OsANK1* và *OsANK2* bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Hai RNA dò (gRNA) được thiết kế để gây đột biến tại 2 điểm trong vùng exon 4 mã hóa motif ANK cho mỗi gen và được đưa vào cấu trúc PTG bằng công nghệ Golden Gate. Ít nhất một cấu trúc PTG đã được xây dựng thành công nhằm chỉnh sửa riêng rẽ từng gen *OsANK1*, *OsANK2* hoặc đồng thời cả 2 gen.

Từ khóa: cấu trúc bông lúa, CRISPR/Cas9, lúa, motif ankyrin, polycistronic tRNA-gRNA.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Motif ANK là một trong những motif protein được bảo tồn và phân bố đa dạng nhất trong các loài sinh vật, từ virus đến người [1]. Hầu hết protein ANK chứa 2-6 motif ANK lặp lại, số lần lặp lại lớn nhất được biết đến là 34 [2]. Các protein tín hiệu Swi6/Cdc10 và Notch là các protein ANK đầu tiên được phát hiện từ nấm men và *Drosophila* [3]. Sau đó, những protein này được đặt tên từ việc phát hiện 24 motif ANK trong protein ANK [4].

Ở người và động vật, protein ANK có ý nghĩa quan trọng và vai trò sinh học đa dạng. Chúng tham gia vào kiểm soát con đường sống sót của tế bào, điều hòa phiên mã [5]. Một số protein ANK trực tiếp tham gia vào ngăn ngừa sự phát triển của ung thư [6]. Hơn nữa, protein ANK còn là các thành phần quan trọng của kênh ion và vận chuyển phức hợp tín hiệu trong hệ thống tim mạch [7].

So với rất nhiều công bố về protein ANK được tìm thấy ở người và động vật, chỉ có một số lượng nhỏ protein ANK đã được nghiên cứu chức năng ở thực vật, tuy nhiên cơ chế hoạt động của motif ANK vẫn chưa được làm rõ. Protein có nguồn gốc thực vật đầu tiên được báo cáo là AKR từ

Arabidopsis, đóng vai trò điều hòa trong quá trình biệt hóa tế bào và phát triển của cây [8]. NPR1 mã hóa một loại protein ANK mới, giữ vai trò trung tâm trong hệ thống phòng ngự qua trung gian axit salicylic ở *Arabidopsis* [9]. ANKR2 cũng từ *Arabidopsis* có thể tham gia vào việc điều hòa chuyển hóa chống oxy hóa trong kháng bệnh và phản ứng với stress. Một số protein ANK tham gia vào sự biệt hóa tế bào và sự phát triển của cây [10], hình thành và phát triển rễ, trong khi đó LIANK đóng vai trò quan trọng đối với sự nảy mầm của phấn hoa và phát triển ống phấn ở cây Lily [11]. Một số protein ANK khác liên quan đến các cơ chế phản ứng với stress và kháng bệnh ở *Arabidopsis*, hạt tiêu và cà chua.

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây trồng quan trọng nhất, cung cấp lương thực cho hơn 50% dân số thế giới và là cây mô hình cho các nghiên cứu về biểu hiện và chức năng gen. Mặc dù một số lượng lớn gen mã hóa protein miền ankyrin đã được xác định ở lúa nhưng mới chỉ có 2 protein ANK được nghiên cứu chức năng ở lúa. XB25 là một protein liên kết có khả năng tương tác với miền xuyên màng của protein XA21, cần thiết để duy trì khả năng kháng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae*, tác nhân

*Tác giả liên hệ: Email: nganngiang.khong2010@gmail.com

Construction of Polycistronic tRNA-gRNA structures to study the function of some genes encoding ankyrin motif, related to rice panicle architecture, by using CRISPR/Cas9 technology

Tien Dung Pham¹, Thi Nhu Le^{2,3}, Quang Hoa Le¹, Stefan Jouannic⁴, Helene Adam⁴, Xuan Hoi Pham², Thi Mai Pham², Ngan Giang Khong^{2*}

¹School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology

²National Key Laboratory of Plant Cell Biotechnology, Agricultural Genetics Institute

³University of Science, Vietnam National University, Hanoi

⁴University of Montpellier, France

Received 6 January 2020; accepted 16 March 2020

Abstract:

The ankyrin repeat is one of the most common protein sequence motifs and has been detected in organisms ranging from viruses to human. Two genes *OsANK1* and *OsANK2* were determined implicated in rice panicle architecture through a GWAS analysis using a Vietnamese landrace panel of rice. The polycistronic tRNA-gRNA (PTG) structures that allow gene editing at multiple sites, were built to characterize the function of *OsANK1* and *OsANK2*, by using CRISPR/Cas9 technology. Two guide RNAs (gRNAs) were designed to cause gene mutation in the exon 4 region encoding ANK motif for each gene and were inserted into PTG structure using Golden Gate technology. At least one PTG structure was successfully obtained to edit *OsANK1* and *OsANK2* separately or together.

Keywords: ankyrin motif, CRISPR/Cas9, polycistronic tRNA-gRNA, rice, rice panicle architecture.

Classification number: 4.6

gây ra bệnh bạc lá ở lúa [12]. Protein thứ hai là OsCBT hoạt động như một yếu tố điều hòa tăng cường phiên mã [13]. Ngoài ra, gen *OsPIANK1* được biết đến liên quan tới việc điều chỉnh đáp ứng kháng bệnh đạo ôn [14]. Cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ, sự ra đời của các thể hệ giải trình tự mới trong những năm gần đây đã tạo điều kiện cho hàng loạt các dự án giải trình tự các giống lúa khác nhau trên thế giới, cung cấp cơ hội tuyệt vời cho các phân tích trên toàn hệ gen. Bằng cách phân tích các bộ dữ liệu ở lúa, Huang và cs (2009) [11] đã xác định được 175 gen *OsANK* dựa vào thành phần miền protein. Kết quả phân tích GWAS các tính trạng năng suất của một tập đoàn lúa bản địa Việt Nam đã xác định được một số QTLs liên quan đến sự phân nhánh của bông và số hoa trên bông. Trong đó đáng chú ý là QTL9 liên kết với cả 2 tính trạng quan trọng quyết định trực tiếp đến năng suất lúa: số gié thứ cấp/bông và số hoa/bông [15]. 11 gen tiềm năng được xác định bằng phân tích tin sinh, sử dụng các dữ liệu phiên mã có sẵn (<http://qtaro.abr.affrc.go.jp/>, <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/field-development.php?featurenum=16794>) và các dữ liệu RNA-seq của Trung tâm Nghiên cứu phát triển Pháp. Trong số đó, duy nhất gen *SPOTTED LEAF 11 (SL11)* đã được xác định chức năng liên quan đến điều chỉnh việc nở hoa ở lúa, thông qua tương tác với gen *SPINI*. Ngoài ra, có 5 gen mã hóa protein miền ANK, một gen mã hóa Cytokinin-O-glucosyltransferase biểu hiện mạnh ở rễ và lá, 1 gen liên quan đến độ xòe của lá và 3 gen mã hóa protein miền TPR (tetratricopeptide repeat) nhưng chưa biết chức năng. Phân tích biểu hiện 11 gen này ở 2 nhóm lúa có cấu trúc bông tương phản (bông to và bông nhỏ) cho thấy 2 gen mã hóa protein miền ankyrin (đặt tên là *OsANK1* và *OsANK2*) có biểu hiện trái ngược nhau, gen *OsANK1* biểu hiện mạnh hơn ở nhóm lúa có cấu trúc bông to, ngược lại gen *OsANK2* biểu hiện cao hơn ở nhóm lúa bông nhỏ. Bên cạnh đó, sử dụng kỹ thuật Gene Capture kết hợp với giải trình tự vùng QTL9 ở 2 nhóm lúa đã xác định được một số SNPs ở 2 gen (kết quả chưa công bố). Giả thiết đặt ra là gen *OsANK1* và *OsANK2* có thể liên quan đến cấu trúc bông lúa, trong đó gen *OsANK1* đóng vai trò như một yếu tố làm tăng cường khả năng phân nhánh của bông, còn gen *OsANK2* có tác động ngược lại (gây ức chế quá trình này).

Cấu trúc bông lúa là một tính trạng nông học phức tạp được quy định bởi nhiều gen. Để xác định chức năng của hai gen *OsANK1* và *OsANK2* liên quan đến cấu trúc bông lúa, cách tiếp cận hiệu quả nhất là tiến hành bất hoạt riêng rẽ và đồng thời cả hai gen. CRISPR/Cas9 là công cụ chỉnh sửa gen tiên bộ nhất ở thực vật hiện nay, cho phép bất hoạt đồng thời nhiều gen [16, 17]. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để bất hoạt các gen không mong muốn nhằm tạo giống lúa mới năng suất cao. Để chỉnh sửa nhiều gen, Xie và cs (2015) [17] đã xây dựng các cấu trúc PTG chứa các đoạn lặp tRNA-gRNA scaffold để tạo đồng

thời nhiều sgRNA ở lúa. Sau khi các cấu trúc này được phiên mã trong tế bào thực vật, hệ thống tRNA-processing RNases nội sinh sẽ nhận biết thành phần tRNA và cắt chính xác, giải phóng các sgRNA. Kết quả thử nghiệm cho thấy, phương pháp này cho phép bất hoạt đồng thời 4 gen với hiệu suất chỉnh sửa trên cả hai alen từ 57% trở lên. Trong nghiên cứu này, các cấu trúc PTG đã được xây dựng nhằm ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để nghiên cứu chức năng của hai gen *OsANK1* và *OsANK2*. Hai gRNA được thiết kế để gây đột biến tại 2 điểm trong vùng exon 4 mã hóa motif ANK của mỗi gen. Các cấu trúc PTG được xây dựng thành công để bất hoạt 2 gen *OsANK1*, *OsANK2* riêng rẽ hoặc đồng thời cả 2 gen.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

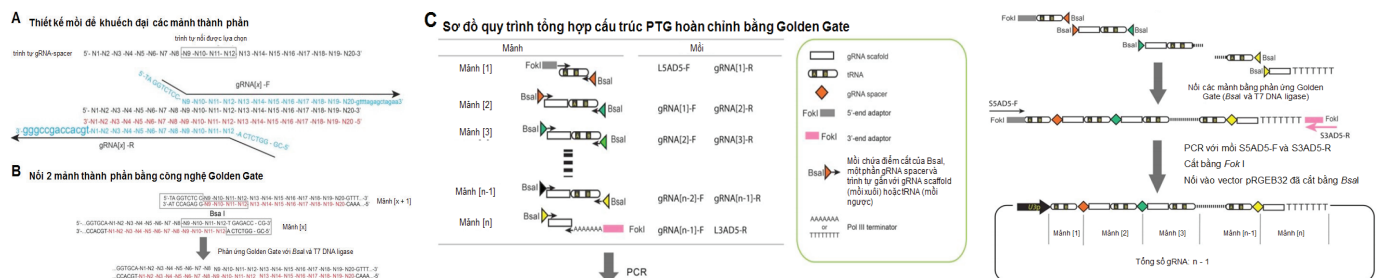
Oligonucleotide có nguồn gốc từ Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Plasmid pGTR được sử dụng làm ADN khuôn cho các phản ứng PCR khuếch đại các mảnh thành phần, plasmid pRGEB32 được sử dụng làm vector biểu hiện đồng thời Cas9 và cấu trúc PTG [16]. Các hóa chất khác có nguồn gốc từ QIAGEN, NEB và Thermo Scientific.

Phương pháp

Thiết kế gRNA: các trình tự gRNA spacer được thiết kế bằng phần mềm CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) bằng cách nhập dữ liệu của vùng gen *OsANK1* và *OsANK2* của giống lúa Nipponbare. Số hiệu GenBank của 2 vùng gen *OsANK1* và *OsANK2* lần lượt là: AP014958.1: 17203282-17202908 và AP014958.1: 17333775-17333401. Để xem xét khả năng cắt không đặc hiệu (off-target) của gRNA spacer đối với thể gen của giống lúa Nipponbare, thông số “Specificity check” được lựa chọn là: Rice (*Oryza sativa* ssp. japonica) genome, Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0 (Oct, 2011). Các trình tự gRNA spacer có chỉ số off-target thấp nhất được lựa chọn.

Thiết kế mồi: các mồi được thiết kế để nối các mảnh tạo cấu trúc gRNA bằng công nghệ Golden Gate theo nghiên cứu của Xie và cs (2015) [17].

Tổng hợp PTG bằng Golden Gate:



Hình 1. Nguyên tắc tạo cấu trúc PTG bằng Golden Gate [16].

Nguyên tắc của phương pháp Golden Gate tổng hợp PTG được trình bày trong hình 1. (A) Cách thiết kế mồi đặc hiệu cho mỗi gRNA spacer với 4 bp gối lên nhau trong phản ứng nối Golden Gate. Hai mồi thành phần tạo một gRNA spacer gối lên nhau dựa vào 4 nucleotide liên tiếp bất kỳ trong vùng spacer. (B) Nguyên tắc tạo một cấu trúc gRNA spacer hoàn chỉnh bằng Golden Gate. Sau khi các mảnh thành phần được khuếch đại bằng PCR và cắt bằng *BsaI*, đầu dính dài 4 nucleotide được tạo thành giúp nối 2 mảnh thành phần để tạo thành một cấu trúc gRNA hoàn chỉnh. Trình tự ADN trong hộp thể hiện điểm cắt của *BsaI*. (C) Sơ đồ quy trình tổng hợp cấu trúc PTG hoàn chỉnh bằng Golden Gate. Một cấu trúc PTG với (n-1) gRNA được chia thành n mảnh thành phần. Mỗi mảnh thành phần được khuếch đại bằng mồi đặc hiệu chứa điểm cắt của *BsaI*, ngoại trừ 2 vùng đầu và cuối của một cấu trúc sử dụng mồi chứa điểm cắt của *FokI* (L5AD5-F và L3AD5-R). Những mảnh PCR này được nối với nhau bằng Golden Gate để tạo ra PTG hoàn chỉnh. Sản phẩm của phản ứng tiếp tục được khuếch đại bằng mồi S5AD5-F và S3AD5-R. Sau khi được cắt bằng *FokI*, sản phẩm PCR được chèn vào vector pRGEB32 đã được cắt mở vòng bằng *BsaI* để tạo cấu trúc PTG hoàn chỉnh.

PCR khuếch đại các mảnh thành phần: trong nghiên cứu này, mỗi gen được chỉnh sửa bằng hai gRNA tại hai vị trí lân cận nhau.

Các mảnh tạo cấu trúc gRNA bất hoạt gen *OsANK1* (ANK-1), *OsANK1* (ANK-2) và bất hoạt đồng thời gen *OsANK1* và *OsANK2* [ANK(1+2)] được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) với cặp mồi tương ứng (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR có thể tích 50 µl, bao gồm 10 µl 5X Phusion HF Buffer; 1 µl 10 mM dNTPs; 2,5 µl 10 µM mồi xuôi; 2,5 µl 10 µM mồi ngược; 0,5 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase và 0,1 ng plasmid pGTR. Sau đó, phản ứng được thực hiện với chương trình nhiệt: 98°C, 2 phút; 35 chu kỳ (98°C, 10 giây; 50°C, 20 giây; 72°C, 20 giây); 72°C, 2 phút 30 giây.

Các mảnh P1, P2 và P3 được sử dụng để tạo cấu trúc ANK-1, các mảnh P4, P5 và P6 được sử dụng để tạo cấu trúc ANK-2, các mảnh P1, P2, P5, P6 và P7 được sử dụng để tạo cấu trúc ANK(1+2).

Bảng 1. Các mảnh PCR thành phần cần tổng hợp với cặp mỗi tương ứng.

Mảnh PCR	Mũi xuôi	Mũi ngược	Ký hiệu	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
P1	L5AD5-F	ANK1a-R	L5AD-ANK1a	140
P2	ANK1a-F	ANK1b-R	ANK1a-ANK1b	190
P3	ANK1b-F	L3AD5-R	ANK1b-L3AD	120
P4	L5AD5-F	ANK2c-R	L5AD-ANK2c	140
P5	ANK2c-F	ANK2d-R	ANK2c-ANK2d	190
P6	ANK2d-F	L3AD5-R	ANK2d-L3AD	120
P7	ANK1b-F	ANK2c-R	ANK1b-ANK2c	190

Tổng hợp các cấu trúc PTG bằng Golden Gate: sản phẩm PCR các mảnh thành phần tiếp tục được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) trước khi được đưa vào phản ứng Golden Gate. Thành phần phản ứng 20 µl bao gồm: 10 µl 2X T7 DNA Ligase Buffer (132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 15% PEG 6000, pH 7,6); 2 µl Bovine Serum Albumin (1 mg/ml); 0,5 µl *Bsa*I (10 U/µl); 0,5 µl T7 DNA ligase (3000 U/µl) 25 ng mỗi mảnh PCR thành phần. Sau đó, phản ứng được thực hiện với chương trình nhiệt: 50 chu kỳ (37°C, 5 phút và 20°C, 10 phút); và sau đó giữ tại 20°C trong 1 giờ. Sản phẩm của phản ứng Golden Gate được pha loãng 10 lần trong H₂O để làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại toàn bộ cấu trúc với cặp mũi S5AD5-F và S3AD5-R. Phản ứng PCR có thể tích 50 µl bao gồm: 10 µl 5X Phusion HF Buffer; 1 µl 10 mM dNTPs; 2,5 µl 10 µM mũi xuôi; 2,5 µl 10 µM mũi ngược; 0,5 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase; và 2 µl sản phẩm pha loãng của phản ứng GG. Sau đó, phản ứng được thực hiện với chương trình nhiệt: 98°C, 2 phút; 35 chu kỳ (98°C, 10 giây; 60°C, 20 giây; 72°C, 20 giây); 72°C, 2 phút 30 giây.

Sản phẩm PCR khuếch đại toàn bộ cấu trúc được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) trước khi được cắt bằng *Fok*I (Thermo Scientific). Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1% để tinh sạch trên gel bằng QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) trước khi được nối với vector pRGEB32 đã được cắt bằng *Bsa*I, enzyme T4 ADN ligase (Thermo Scientific). Sản phẩm nối sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH10b (Thermo Scientific) bằng phương pháp sốc nhiệt trước khi được trải trên đĩa thạch LB có bổ sung kháng sinh kanamycin. Sau khi nuôi qua đêm, các dòng tế bào mọc trên đĩa được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mũi S5AD5-F và S3AD5-R. Các dòng tế bào cho kết quả sàng lọc PCR dương tính được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin qua đêm để tách chiết lấy plasmid bằng QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Giải trình tự gen: các dòng plasmid sau đó được gửi đi giải trình tự tại Công ty 1st Base Malaysia để kiểm tra tính chính xác của cấu trúc.

Kết quả

Thiết kế gRNA spacer

Để ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa và nghiên cứu chức năng của gen, gRNA spacer được lựa chọn cần hạn chế tối đa khả năng phức hợp Cas9-gRNA off-target. Kết quả cho thấy, dựa vào chỉ số 20mer + PAM được trình bày ở bảng 2 và 3, các trình tự gRNA spacer thu được đều chỉ bắt cặp đặc hiệu (on-target) đúng một trình tự trên thể gen của Nipponbare. Tuy nhiên, dựa vào chỉ số 12mer + PAM, vẫn có khả năng off-target xảy ra. Chỉ số này càng lớn thì khả năng off-target càng cao. Do vậy, hai trình tự gRNA spacer đối với mỗi gen có chỉ số 12mer + PAM thấp nhất đã được lựa chọn: GCCACTGATTTATGCAGTTCTGG và CCTCTCCATTTAGCAGTTGAACA đối với *OsANK-1*, GTGGACACAGTCGCAAACCGTGG và TGGTGCTATGAAGATTTTATTGG đối với *OsANK-2*.

Bảng 2. Thiết kế gRNA spacer bắt hoạt ANK-1.

TT	Vị trí bắt cặp trên thể gen Nipponbare chr2	Trình tự gRNA spacer	Khả năng bắt cặp với các trình tự trên thể gen Nipponbare	
			20mer + PAM	12mer + PAM
1	17203075 - 17203053	CCTCTCCATTTAGCA GTTGAACA	1	3
2	17203175 - 17203153	GCCACTGATTTATGC AGTTCTGG	1	3
3	17203216 - 17203194	CCCTGATTTGTTTT TTTTCAAT	1	15
4	17202959 - 17202937	CCTGCAAATAATGA AAGTTGCGA	1	9
5	17202985 - 17202963	TATATTATTGTTTC TAGTTTGG	1	7
6	17203279 - 17203257	CCTATCTTTTGTGG TTGATAAG	1	18

Ghi chú: trình tự PAM được gạch chân. 20mer + PAM: khả năng gRNA spacer bắt cặp 20 nucleotide liên tiếp với trình tự PAM (NGG) trên thể gen của giống lúa Nipponbare. 12mer + PAM: khả năng gRNA spacer bắt cặp 12 nucleotide liên tiếp với trình tự PAM (NGG) trên thể gen của giống lúa Nipponbare.

Bảng 3. Thiết kế gRNA spacer bắt hoạt ANK-2.

TT	Vị trí bắt cặp trên thể gen Nipponbare chr2	Trình tự gRNA spacer	Khả năng bắt cặp với các trình tự trên thể gen Nipponbare	
			20mer + PAM	12mer + PAM
1	17333593 - 17333571	GTGGACACAGTCGCA AACCGTGG	1	2
2	17313923 - 17313901	TGGTGCTATGAAGATT TTATTGG	1	7
3	17333637 - 17333659	GGCTTTCTGTGTGT TTTCAGG	1	13
4	17333701 - 17333679	CCCCCGCCAAAAAA AAAGGGAA	1	14
5	17333694 - 17333672	CCAAAAAAAAGGGGA AAAAAAC	1	37
6	17333704 - 17333682	CCCCCGCCAAAAA AAAAAAGG	1	13

Thiết kế môi để tạo cấu trúc gRNA

Sau khi xác định được trình tự gRNA spacer, trình tự môi sử dụng để tạo cấu trúc PTG được thiết kế tương tự như nghiên cứu của Xie và cs (2015) [17]. Trình tự các môi được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Các môi sử dụng để tạo cấu trúc PTG.

Tên môi	Trình tự (5'-3')
ANK1a-F	TA GGTCTCC <u>GATTTATGCAGTTC</u> gttttagagctagaa
ANK1a-R	AT GGTCTCA <u>AATCAGTGGC</u> tgcaccagccgggaa
ANK1b-F	TA GGTCTCC <u>CTGCTAAATGGAG</u> gttttagagctagaa
ANK1b-R	AT GGTCTCA <u>GCAGTTGAACA</u> tgcaccagccgggaa
ANK2c-F	TA GGTCTCC <u>ACAGTCGCAAACCG</u> gttttagagctagaa
ANK2c-R	AT GGTCTCA <u>CTGTGTCCAC</u> tgcaccagccgggaa
ANK2d-F	TA GGTCTCC <u>TATGAAGATTTTAT</u> gttttagagctagaa
ANK2d-R	AT GGTCTCA <u>CATAGCACCA</u> tgcaccagccgggaa
L5AD5-F	CG GGTCTC A GGCA GGATG GGCAGTCTG GGCA ACAAGCACCAAGTGG
L3AD5-R	TA GGTCTC C AAAC GGATG AGCGACAGC AAAC AAAAAAAAAA GCACCGACTCG
S5AD5-F	CG GGTCTC A GGCA GGATG GGCAGTCTG GGCA
S3AD5-R	TA GGTCTC C AAAC GGATG AGCGACAGC AAAC

Gạch chân: trình tự nối giữa các mảnh ADN thành phần.

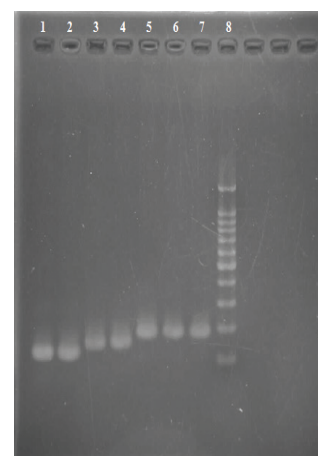
PCR khuếch đại các mảnh thành phần để tạo các cấu trúc gRNA

Trong nghiên cứu này, các mảnh thành phần để tạo các cấu trúc gRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với khuôn ADN là plasmid pGTR và các môi tương ứng (bảng 1 và 4). Kết quả hình 2 cho thấy, các sản phẩm PCR đều cho kết quả phù hợp với tính toán lý thuyết là: 120 bp đối với môi ANK1b-F, L3AD5-R (P3), ANK2d-F và L3AD5-R (P6); 140 bp đối với môi L5AD5-F, ANK1a-R (P1), L5AD5-F và ANK2c-R (P4); 190 bp đối với môi ANK1a-F, ANK1b-R (P2), ANK2c-F, ANK2d-R (P5), ANK1b-F và ANK2c-R (P7).

Sau đó các mảnh PCR thành phần được trộn với nhau để tạo cấu trúc gRNA trong phản ứng Golden Gate sử dụng *BsaI* và T7 ADN ligase.

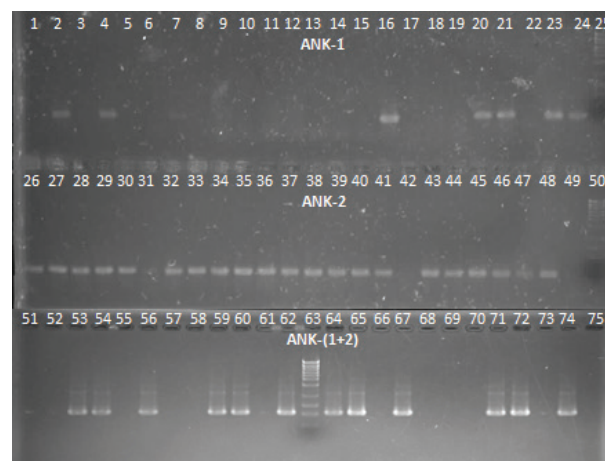
Sàng lọc các cấu trúc PTG bất hoạt ANK-1, ANK-2 và ANK-(1+2)

Cấu trúc ANK-1 được sàng lọc bằng cặp môi ANK1a-F và ANK1b-R cho sản phẩm PCR có kích thước lý thuyết là 200 bp. Cấu trúc ANK-2 được sàng lọc bằng cặp môi ANK2c-F và ANK2d-R với sản phẩm PCR 200 bp. Cấu



Hình 2. Kết quả PCR khuếch đại các mảnh thành phần tạo cấu trúc PTG bất hoạt ANK-1, ANK-2 và bất hoạt đồng thời ANK-1 và ANK-2. 1: sản phẩm PCR với môi ANK1b-F và L3AD5-R (P3); 2: sản phẩm PCR với môi ANK2d-F và L3AD5-R (P6); 3: sản phẩm PCR với môi L5AD5-F và ANK1a-R (P1); 4: sản phẩm PCR với môi L5AD5-F và ANK2c-R (P4); 5: sản phẩm PCR với môi ANK1a-F và ANK1b-R (P2); 6: sản phẩm PCR với môi ANK2c-F và ANK2d-R (P5); 7: sản phẩm PCR với môi ANK1b-F và ANK2c-R (P7); 8: SiZer™-100 ADN Marker Solution (Intron).

trúc ANK(1+2) được sàng lọc bằng cặp môi ANK1a-F và ANK2d-R với sản phẩm PCR 550 bp. Kết quả (hình 3) cho thấy, 6/22 dòng cho kết quả dương tính với cấu trúc ANK-1, 20/22 dòng cho kết quả dương tính với cấu trúc ANK-2, 12/23 dòng cho kết quả dương tính với cấu trúc ANK(1+2).



Hình 3. Kết quả sàng lọc các dòng E. coli mang cấu trúc PTG bất hoạt ANK-1, ANK-2 và bất hoạt đồng thời ANK-1 và ANK-2 bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc sử dụng lần lượt các cặp môi ANK1a-F*ANK1b-R, ANK2c-F*ANK2d-R và ANK1a-F*ANK2d-R. 1-24: sàng lọc cấu trúc ANK-1, trong đó: 1 là âm tính, 24 là dương tính; 26-49: sàng lọc cấu trúc ANK-2, trong đó: 49 là âm tính, 26 là dương tính; 51-75: sàng lọc cấu trúc ANK-(1+2), trong đó: 51 là mẫu âm tính; 25, 50, 63: HighRanger 1 kb ADN Ladder (Norgen).

Các dòng tế bào *E. coli* cho kết quả PCR khuẩn lạc dương tính được nuôi cấy để tách chiết plasmid.

Kết quả giải trình tự các dòng plasmid mang cấu trúc gRNA

Các dòng plasmid được xác định trình tự theo cả hai chiều. Kết quả giải trình tự gen (bảng 5) cho thấy, toàn bộ các cấu trúc đều có ít nhất một dòng plasmid cho kết quả như mong đợi.

Bảng 5. Kết quả giải trình tự các dòng plasmid mang cấu trúc PTG bất hoạt ANK-1, ANK-2 và bất hoạt đồng thời ANK-1 và ANK-2.

Cấu trúc	Số lượng dòng gửi đi giải trình tự	Kết quả giải trình tự
ANK-1	3	3/3 dòng trình tự đúng với thiết kế
ANK-2	3	2/3 dòng trình tự đúng với thiết kế
ANK-(1+2)	5	1/5 dòng trình tự đúng với thiết kế

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng thành công các cấu trúc PTG bất hoạt riêng rẽ *OsANK1*, *OsANK2* và đồng thời cả hai gen. Hiện nay, các cấu trúc này đã được biến nạp vào giống lúa Kitaaké và các công việc đặc tính hóa các dòng lúa đột biến đang được tiến hành để xác định chức năng của hai gen này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 106-NN.02-2016.60. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S.G. Sedgwick, et al. (1999), "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework", *Trends Biochem. Sci.*, **24(8)**, pp.311-316.

[2] H.G. Elmendorf, et al. (2005), "Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains", *Int. J. Parasitol.*, **35(9)**, pp.1001-1011.

[3] L. Breeden, et al. (1987), "Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*", *Nature*, **329(6140)**, pp.651-654.

[4] S.E. Lux, et al. (1990), "Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8",

Nature, **345(6277)**, pp.736-739.

[5] Y. Chinenov, et al. (1998), "Identification of redox-sensitive cysteines in GA-binding protein-alpha that regulate DNA binding and heterodimerization", *J. Biol. Chem.*, **273(11)**, pp.6203-6209.

[6] P.M. Neilsen, et al. (2008), "Identification of ANKRD11 as a p53 coactivator", *J. Cell Sci.*, **121(21)**, pp.3541-3552.

[7] S.M. Hashemi, et al. (2009), "Cardiac ankyrins in health and disease", *J. Mol. Cell Cardiol.*, **47(2)**, pp.203-209.

[8] H. Zhang, et al. (1992), "Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in arabidopsis", *Plant Cell*, **4(12)**, pp.1575-1588.

[9] H. Cao, et al. (1997), "The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats", *Cell*, **88(1)**, pp.57-63.

[10] S. Albert, et al. (1999), "The EMB 506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of Arabidopsis embryos", *Plant*, **17(2)**, pp.169-179.

[11] J. Huang, et al. (2009), "The ankyrin repeat gene family in rice: genome-wide identification, classification and expression profiling", *Plant Mol. Biol.*, **71(3)**, pp.207-226.

[12] Y.S. Wang, et al. (2006), "Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance", *Plant Cell*, **18(12)**, pp.3635-3646.

[13] M.S. Choi, et al. (2005), "Isolation of a calmodulin-binding transcription factor from rice (*Oryza sativa* L.)", *J. Biol. Chem.*, **280(49)**, pp.40820-40831.

[14] X. Zhang, et al. (2010), "Molecular characterization of rice OsBIANK1, encoding a plasma membrane-anchored ankyrin repeat protein, and its inducible expression in defense responses", *Mol. Biol. Rep.*, **37(2)**, pp.653-660.

[15] K.N. Ta, et al. (2018), "A genome-wide association study using a Vietnamese landrace panel of rice (*Oryza sativa*) reveals new QTLs controlling panicle morphological traits", *BMC Plant Biology*, **18(1)**, p.282.

[16] X. Ma, et al. (2015), "A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants", *Mol. Plant*, **8(8)**, pp.1274-1284.

[17] K. Xie, et al. (2015), "Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112(11)**, pp.3570-3575.