



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0004276

(51) **G01N 33/00; G01N 1/28; G01N 21/31**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00533

(22) 02/12/2021

(45) 25/08/2025 449

(43) 26/06/2023 423A

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội (VN)
Số 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân Trung, Thanh Xuân, Hà Nội

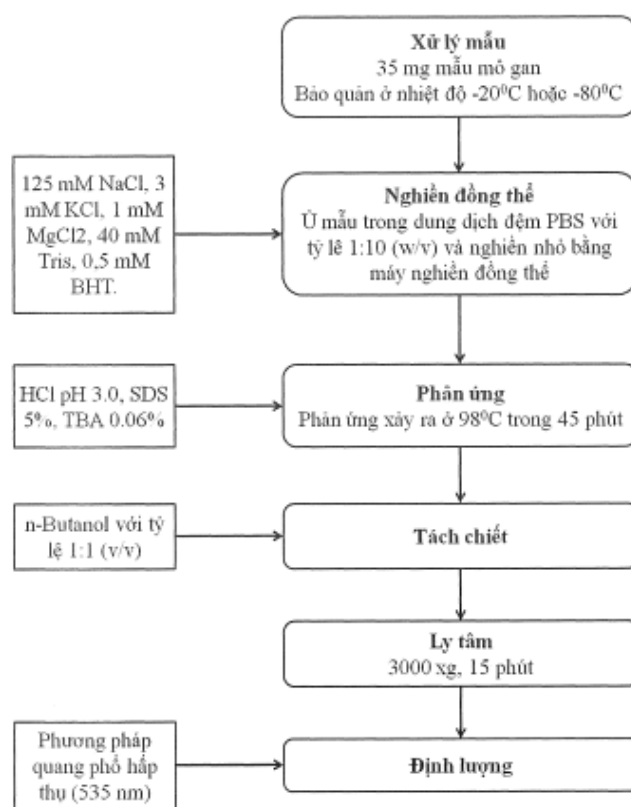
(72) Đỗ Minh Hà (VN); Phạm Ngọc Sơn (VN); Trịnh Hồng Thái (VN).

(54) QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG MALONDIALDEHYT TỪ MẪU MÔ GAN CHUỘT

(21) 2-2021-00533

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình định lượng malondialdehyt có trong mẫu mô gan chuột, trong đó quy trình này bao gồm các bước: xử lý mẫu, nghiền đồng thể, phản ứng, tách chiết, ly tâm và định lượng. Quy trình này có ưu điểm là thực hiện dễ dàng, đơn giản, thời gian thực hiện nhanh, chi phí thấp, có thể áp dụng trên quy mô lớn, kết quả định lượng malondialdehyt có độ ổn định cao.

Hình 1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, y học và dược phẩm, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình định lượng malondialdehyt từ mẫu mô gan chuột.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Malondialdehyt (MDA) là một gốc tự do có mạch chính ba cacbon với tâm hoạt động oxy (ROS), với hai đầu là hai nhóm aldehyt (dialdehyt), đây là sản phẩm của quá trình phân giải làm đứt gãy mạch và oxy hóa axit arachidonic và các phân tử axit béo không no (PUFAs). Trong tế bào, MDA được hình thành ở ti thể thông qua hai con đường, được xúc tác bởi enzym và phi enzym.

Từ những năm 1960, rất nhiều phương pháp được phát triển để đánh giá stress oxy hóa thông qua định lượng MDA có trong mẫu sinh học đặc biệt là cho quá trình peroxid hóa lipid của axit béo omega-3 và omega-4. Phương pháp định lượng MDA thông qua phản ứng của nó với axit thiobarbituric (TBA) là phương pháp được sử dụng một cách phổ biến. Trong phương pháp này, một phân tử MDA sẽ phản ứng với hai phân tử TBA để tạo thành phức có màu, phức này có thể định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ với bước sóng hấp thụ cực đại 532-535nm.

Tuy nhiên, độ đặc hiệu của phương pháp này không cao, do TBA có thể phản ứng với nhiều hợp chất khác có trong tế bào. Hơn nữa, nhiệt độ phản ứng (100°C) có thể tạo ra nhiều gốc oxy mới sinh ra, gây ảnh hưởng tới kết quả của phép định lượng. Để giảm thiểu tác động của các yếu tố gây stress oxy hóa trong quá trình thí nghiệm, rất nhiều phương pháp cải tiến được đưa ra, ví dụ như sử dụng kết hợp với sắc ký lỏng cao áp (HPLC), hay sử dụng các chất chống oxy hóa.

Một trong những phương pháp cải tiến đầu tiên và vẫn còn được sử dụng đến nay được phát triển bởi Yagi, thực hiện phản ứng TBA trên mẫu lipid máu. Trong phương pháp này, protein được kết tủa trong môi trường axit ở 98°C. Phương pháp này được gọi là phương pháp TBARS (TBA reacting substances). Trong giai đoạn từ 1970 đến 1995, rất nhiều phương pháp được phát triển để xác định lượng MDA trong mẫu gan, ví dụ năm 1981, Kakuda và cộng sự đã nghiên cứu về quy trình tách chiết và định lượng sản phẩm phản ứng giữa MDA và TBA bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

So với phương pháp TBARS ban đầu của Yagi, phương pháp sử dụng HPLC nhanh hơn, hạn chế được phần nào các tác động từ bên ngoài. Toàn bộ quá trình chạy sắc ký chỉ kéo dài 5 phút và có thể định lượng được MDA một cách tương đối chính xác. Arthus và cộng sự (1985) cũng đã phát triển kỹ thuật HPLC bắt cặp ion (HPLC Ion-pairing) nhằm định lượng MDA có trong mẫu mô gan. Kết quả cho thấy, sau khi loại bỏ các thành phần tạp chất, lượng MDA tối thiểu có thể phát hiện được là 4nmol. Cũng trong thời gian này, phương pháp TBARS được sử dụng trong các thí nghiệm lâm sàng. Tuy nhiên, tất cả các kỹ thuật trên đều rất phức tạp và khó có thể áp dụng trên quy mô lớn, bên cạnh đó, môi trường phản ứng chưa được tối ưu hóa lại là điều kiện để oxy hóa mẫu, từ đó ảnh hưởng đến kết quả định lượng.

Ở Việt Nam, đến nay, đã có một số công trình liên quan đến công nghệ tách chiết và định lượng MDA trên nhiều đối tượng khác nhau, Nguyễn Thị Thùy Linh và Võ Phùng Nguyên (2011) đã thực hiện nghiên cứu "*Tác động chống oxy hóa, bảo vệ gan của chế phẩm nấm tai vàng*" trên đối tượng mẫu mô gan chuột. Tuy nhiên, cũng tương tự như các nghiên cứu khác trên thế giới, các nghiên cứu ở Việt Nam chưa có quá trình tối ưu hóa quy trình để hạn chế các gốc tự do mới sinh ra, bên cạnh đó, các kỹ thuật sử dụng còn phức tạp và chưa thể áp dụng trên quy mô lớn.

Đến nay, malondialdehyt đã được nhiều nơi sử dụng như một dấu chuẩn trong việc phát hiện, chẩn đoán và theo dõi tiến trình điều trị một số bệnh, đặc biệt là các bệnh về thần kinh, tim mạch, gan, ví dụ như Alzheimer, xơ vữa động mạch, ngộ độc rượu, viêm gan B, C, và ngộ độc kim loại nặng. Tuy nhiên, các quy trình định lượng MDA hiện tại vẫn chưa được chuẩn hóa để hạn chế lượng MDA mới được sinh ra cũng như các tác động không cần thiết đến mẫu. Do đó, các quy trình chưa có sự thống nhất và đồng đều về số liệu. Bên cạnh đó, các kỹ thuật được sử dụng cũng rất phức tạp và khó có thể áp dụng với số lượng mẫu lớn.

Hiện nay, đa phần các quy trình định lượng MDA đều được xác định trên đối tượng là mẫu máu (trên màng hồng cầu hoặc trong huyết thanh). Ưu điểm của việc sử dụng máu là có thể dễ dàng lấy được mẫu từ người bệnh, tuy nhiên, việc định lượng MDA từ mẫu máu lại không thể sử dụng để làm chỉ thị cho một mô cụ thể nào, do máu được tuần hoàn trong toàn bộ các cơ quan trong cơ thể, nên lượng MDA có trong máu sẽ được tích tụ từ nhiều cơ quan khác nhau. Do đó, kết quả đưa ra khi sử dụng quy trình định lượng MDA trong máu để xác định các bệnh như Alzheimer, viêm gan, xơ vữa động mạch không thật sự chính xác. Ngoài ra, lượng MDA trong máu của bệnh nhân có thể biến động do các yếu tố khách quan như tình trạng tâm lý, thể chất.

Bên cạnh đó, tỷ lệ người Việt mắc các bệnh về gan như viêm gan C, viêm gan B, xơ gan, ung thư gan hiện đang tăng mạnh theo từng năm do các thói quen xấu như uống rượu, hút thuốc lá và chế độ ăn uống không lành mạnh. Tại Hội thảo “*Phổ biến kết quả mô hình ước tính gánh nặng bệnh tật do viêm gan virus B và C và phân tích hiệu quả đầu tư*” do Bộ Y tế phối hợp với Tổ chức Y tế thế giới (WHO) tại Hà Nội ngày 21/07/2017, WHO đã thống kê, trên thế giới có khoảng 325 triệu người (tương đương 4% dân số thế giới) đang bị nhiễm virus viêm gan B và C, trong đó có 57% đang tiến triển thành xơ gan. Ở Việt Nam, tỷ lệ viêm gan B là khoảng 6%, có vùng lên đến 20%, đặc biệt là các khu vực vùng sâu vùng xa. Tỷ lệ viêm gan C rơi vào khoảng 4%. Vì vậy, gánh nặng bệnh tật của virus viêm gan B và C tại nước ta rất lớn. Ước tính mỗi năm, có hàng ngàn người tử vong do 2 bệnh này. Trên cả nước, có khoảng 7,8 triệu trường hợp viêm gan B mãn tính. Bên cạnh đó có hơn 991.000 người nhiễm virus viêm gan C, gần 6.000 ca bị ung thư tế bào gan và hơn 6.400 ca tử vong do các bệnh về gan. Đặc biệt, chỉ có 74.000 người được điều trị trước đó.

Tuy nhiên, ở Việt Nam vẫn chưa có nhiều nghiên cứu theo hướng này và chủ yếu mới chỉ dừng lại ở quy mô nhỏ hoặc kỹ thuật xác định phức tạp, tốn nhiều thời gian.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nghiên cứu, tối ưu hóa toàn bộ quy trình tách chiết, định lượng MDA trên từng đối tượng mô cụ thể, mà ở đây là mẫu gan trên động vật thực nghiệm. Việc xây dựng quy trình tối ưu nhằm định lượng MDA trong mẫu mô gan tạo tiền đề phát triển các bộ kit phát hiện nhanh, đơn giản và chính xác các bệnh lý viêm nhiễm, quá trình đào thải thuốc và các bệnh về gan, từ đó hỗ trợ điều trị và theo dõi tiến triển bệnh tốt hơn, giảm các ca tử vong do phát hiện muộn hoặc không phát hiện các bệnh lý viêm nhiễm hoặc liên quan tới gan.

Nhằm đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình định lượng MDA từ mẫu mô gan chuột bao gồm các bước sau:

- Xử lý mẫu;
- Nghiền đồng thể;
- Phản ứng;
- Tách chiết;
- Ly tâm; và
- Định lượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện quy trình định lượng MDA từ mẫu gan chuột theo phương pháp TBARS cải tiến.

Hình 2 thể hiện đường chuẩn tương quan giữa nồng độ MDA và cường độ hấp thụ của phức TBA-MDA tại bước sóng 535nm.

Hình 3 thể hiện phổ hấp thụ của phức TBA-MDA với bước sóng từ 400nm đến 800nm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình định lượng MDA từ mẫu gan chuột bao gồm các bước:

a) Xử lý mẫu

Mẫu gan được thu lấy sau khi mổ. Mẫu được rửa sạch bằng dung dịch muối sinh lý và bảo quản ở nhiệt độ -20°C trước khi tiến hành thí nghiệm. Trong trường hợp cần phải vận chuyển và bảo quản lâu dài, mẫu được ngâm trong dung dịch đệm bảo quản bao gồm 125mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl_2 , 40mM Tris, 0,5 mM hydroxytoluen butylat (BHT) và giữ ở nhiệt độ -80°C . Khi tiến hành thí nghiệm, mẫu được chia nhỏ thành các phần có khối lượng 35mg. Mẫu được chia trong trạng thái đông cứng và hạn chế tối đa sự chênh lệch nhiệt độ trong toàn bộ quá trình chia mẫu.

MDA chuẩn được pha thành nồng độ 1×10^{-3} mM ban đầu, sau đó sẽ pha loãng dần theo các mốc nồng độ nhất định.

b) Nghiền đồng thể

Mẫu gan được đem cân, chia nhỏ và bổ sung đệm bảo quản theo tỷ lệ 1:10 (w/v). Sau khi bổ sung đệm, mẫu được nghiền đồng thể bằng máy nghiền trong 2 phút.

c) Phản ứng

Dung dịch phản ứng bao gồm 2,0ml HCl (pH 3,0), 1,0ml TBA 0,06%, 0,5ml natri dodecyl sulfat (sodium dodecyl sulfate-SDS) 5% và 0,5ml dịch nghiền đồng thể. Phản ứng với MDA chuẩn cũng bao gồm các thành phần trên nhưng thay 0,5ml dịch nghiền đồng thể bằng 0,5ml MDA chuẩn. Sau khi bổ sung đầy đủ các thành phần, hỗn hợp được đem ủ ở 98°C trong 45 phút.

d) Tách chiết

Dịch phản ứng sau khi ủ sẽ được để nguội ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó bổ sung n-Butanol với tỷ lệ 1:1 (v/v).

e) Ly tâm

Hỗn hợp dịch phản ứng và n-Butanol được đem đi lắc mạnh trước khi ly tâm 3000 xg, trong 15 phút ở nhiệt độ phòng nhằm loại bỏ các thành phần khác. Sau khi ly tâm, thu dịch nổi.

f) Định lượng

Dịch chiết sau khi ly tâm được đem đi định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ ở bước sóng 535nm và xác định nồng độ thông qua đường chuẩn.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Dựng đường chuẩn MDA

MDA chuẩn được pha thành nồng độ 1×10^{-3} mM, sau đó sẽ pha loãng dần theo các mức nồng độ 0,017mM, 0,0085 mM, 0,0034mM và 0,0017mM. Dung dịch phản ứng gồm 2,0ml HCl (pH 3,0), 1,0ml TBA 0,06%, 0,5ml SDS 5% và 0,5ml MDA chuẩn ở các mức nồng độ. Toàn bộ hỗn hợp được ủ ở 98°C trong 45 phút. Sau khi thực hiện phản ứng, để hỗn hợp nguội ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và bổ sung 4,0ml n-Butanol. Hỗn hợp dịch phản ứng và n-Butanol được trộn đều và ly tâm với lực ly tâm 3000 xg trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, dịch nổi thu được sẽ đem đi định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ ở bước sóng 535 nm. Đường chuẩn MDA được xây dựng dựa trên giá trị hấp thụ ở 535nm của dung dịch và nồng độ MDA chuẩn trong dung dịch phản ứng. Kết quả ở hình 2 cho thấy, đường chuẩn được xây dựng với độ tuyến tính cao, $R^2 = 99,79\%$.

Ví dụ 2: Định lượng MDA trong mẫu mô gan

Mẫu mô gan chuột sau mổ được bảo lạnh ở -20°C và chia nhỏ thành các phần với lượng nhỏ nhất là 35mg. Mẫu được bỏ vào trong các ống epp và bổ sung 0,35ml đệm bảo quản. Sau khi bổ sung đệm, mẫu được nghiền đồng thể bằng máy nghiền trong 2 phút. Dung dịch phản ứng bao gồm 2,0ml HCl (pH 3,0), 1,0ml TBA 0,06%, 0,5ml SDS 5% và 0,5ml dịch nghiền đồng thể. Sau khi bổ sung đầy đủ các thành phần, hỗn hợp được đem ủ ở 98°C trong 45 phút. Dịch phản ứng sau khi ủ sẽ được để nguội ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó bổ sung 4,0ml n-Butanol. Hỗn hợp dịch phản ứng và n-Butanol được đem đi lắc mạnh trước khi ly tâm 3000 xg, trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, dịch nổi thu được sẽ đem đi định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ ở

bước sóng 535 nm. Lượng MDA ($\mu\text{g/g}$ mẫu) trong mẫu được xác định thông qua cường độ hấp thụ của dịch chiết ở bước sóng 535nm và sử dụng đường chuẩn MDA để xác định có bao nhiêu μg MDA trong 1g mẫu. Thí nghiệm được thực hiện trên 34 con chuột dòng Swiss, được cung cấp từ Học viện Quân Y từ ngày 27/08/2018 đến ngày 14/09/2018, mỗi con được đo lặp lại 9 lần, lấy giá trị trung bình, phương sai và xác định hệ số biến thiên (CV).

Bảng 1: Lượng MDA thu được trong 1g mẫu mô gan chuột

STT	Mã chuột	Độ hấp thụ trung bình (A)	MDA ($\mu\text{g/g}$ mẫu)	Phương sai	CV (%)
1	C9	0,276	1,919	0,009	3%
2	C11	0,547	3,749	0,023	4%
3	C20	0,209	1,474	0,005	2%
4	C1	0,155	1,108	0,016	10%
5	C2	0,203	1,431	0,029	14%
6	C3	0,232	1,623	0,035	15%
7	C169	0,155	1,102	0,017	11%
8	C168	0,110	0,804	0,008	7%
9	C183	0,182	1,288	0,010	6%
10	C211	0,200	1,409	0,013	6%
11	C209	0,140	1,001	0,014	10%
12	C175	0,213	1,498	0,025	12%
13	C165	0,303	2,101	0,018	6%
14	C176	0,184	1,297	0,004	2%
15	C181	0,173	1,227	0,027	16%
16	C179	0,126	0,907	0,005	4%
17	C174	0,229	1,603	0,003	1%
18	C178	0,180	1,272	0,014	8%
19	C180	0,207	1,458	0,006	3%
20	C210	0,228	1,194	0,086	38%
21	C170	0,195	1,372	0,015	8%
22	C167	0,118	0,854	0,011	10%
23	C254	0,219	1,537	0,034	16%
24	C250	0,262	1,826	0,080	30%
25	C193	0,171	1,211	0,028	16%
26	C281	0,323	2,234	0,025	8%
27	C256	0,162	1,152	0,047	29%
28	C199	0,262	1,826	0,066	25%
29	C204	0,226	1,581	0,046	21%
30	C272	0,203	1,426	0,010	5%
31	C208	0,379	2,613	0,106	28%
32	C207	0,206	1,446	0,022	11%
33	C213	0,201	1,413	0,058	29%
34	C206	0,264	1,837	0,090	34%

Kết quả định lượng trên 34 mẫu gan chuột cho thấy độ đồng đều cao về số liệu, $CV = 12,37\%$

Ví dụ 3: Kiểm tra độ tinh sạch của dịch chiết bằng phương pháp quang phổ hấp thụ

Dịch chiết được đem đi đo phổ hấp thụ với dải bước sóng từ 400nm đến 800nm, độ chia nhỏ nhất 2nm. Đồ thị hình 3 cho thấy, sản phẩm tách chiết bằng phương pháp TBARS cải tiến có độ tinh sạch cao, đỉnh hấp thụ nhọn ở bước sóng 532-536nm, không có đỉnh phụ.

Hiệu quả kỹ thuật đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình định lượng MDA trong mẫu mô gan chuột: Có các thông số kỹ thuật được tối ưu hóa, được tiến hành trong điều kiện phòng thí nghiệm. Quy trình định lượng nhanh, đơn giản, phù hợp với điều kiện cơ sở vật chất của các phòng thí nghiệm cơ bản ở Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu có tính ứng dụng thực tiễn cao và có thể được sử dụng như một dấu chuẩn sinh học bổ sung cho chẩn đoán và hỗ trợ theo dõi điều trị các bệnh viêm nhiễm, các bệnh lý về gan.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình định lượng malondialdehyt (MDA) từ mẫu mô gan chuột bao gồm các bước được tiến hành như sau:

(i) xử lý mẫu

mẫu gan được thu lấy sau khi mổ, sau đó mẫu được rửa sạch bằng dung dịch muối sinh lý và bảo quản ở nhiệt độ -20°C trước khi tiến hành thí nghiệm; trong trường hợp cần phải vận chuyển và bảo quản lâu dài, mẫu được ngâm trong dung dịch đệm bảo quản bao gồm 125mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl_2 , 40mM Tris, 0,5 mM hydroxytoluen butylat (BHT) và giữ ở nhiệt độ -80°C ; trước khi tiến hành thí nghiệm, mẫu được chia nhỏ thành các phần có khối lượng 35mg và được chia trong trạng thái đông cứng, hạn chế tối đa sự chênh lệch nhiệt độ trong toàn bộ quá trình chia mẫu; song song với đó MDA chuẩn được pha thành nồng độ 1×10^{-3} M ban đầu, sau đó sẽ pha loãng dần theo các mốc nồng độ nhất định;

(ii) nghiền đồng thể

mẫu gan được đem cân, chia nhỏ và bổ sung đệm bảo quản theo tỷ lệ 1:10 (w/v), sau khi bổ sung đệm, mẫu được nghiền đồng thể bằng máy nghiền trong 2 phút;

(iii) phản ứng

chuẩn bị dung dịch phản ứng bao gồm 2,0ml HCl (pH 3,0), 1,0ml axit thiobarbituric (TBA) 0,06%, 0,5ml natri dodecyl sulfat (SDS) 5% và 0,5ml dịch nghiền đồng thể; phản ứng với MDA chuẩn cũng bao gồm các thành phần trên nhưng thay 0,5ml dịch nghiền đồng thể bằng 0,5ml MDA chuẩn; sau khi bổ sung đầy đủ các thành phần, hỗn hợp được đem ủ ở 98°C trong 45 phút; sản phẩm tạo thành có màu hồng nhạt đặc trưng;

(iv) tách chiết

dịch phản ứng sau khi ủ sẽ được để nguội ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó bổ sung n-Butanol với tỷ lệ 1:1 (v/v);

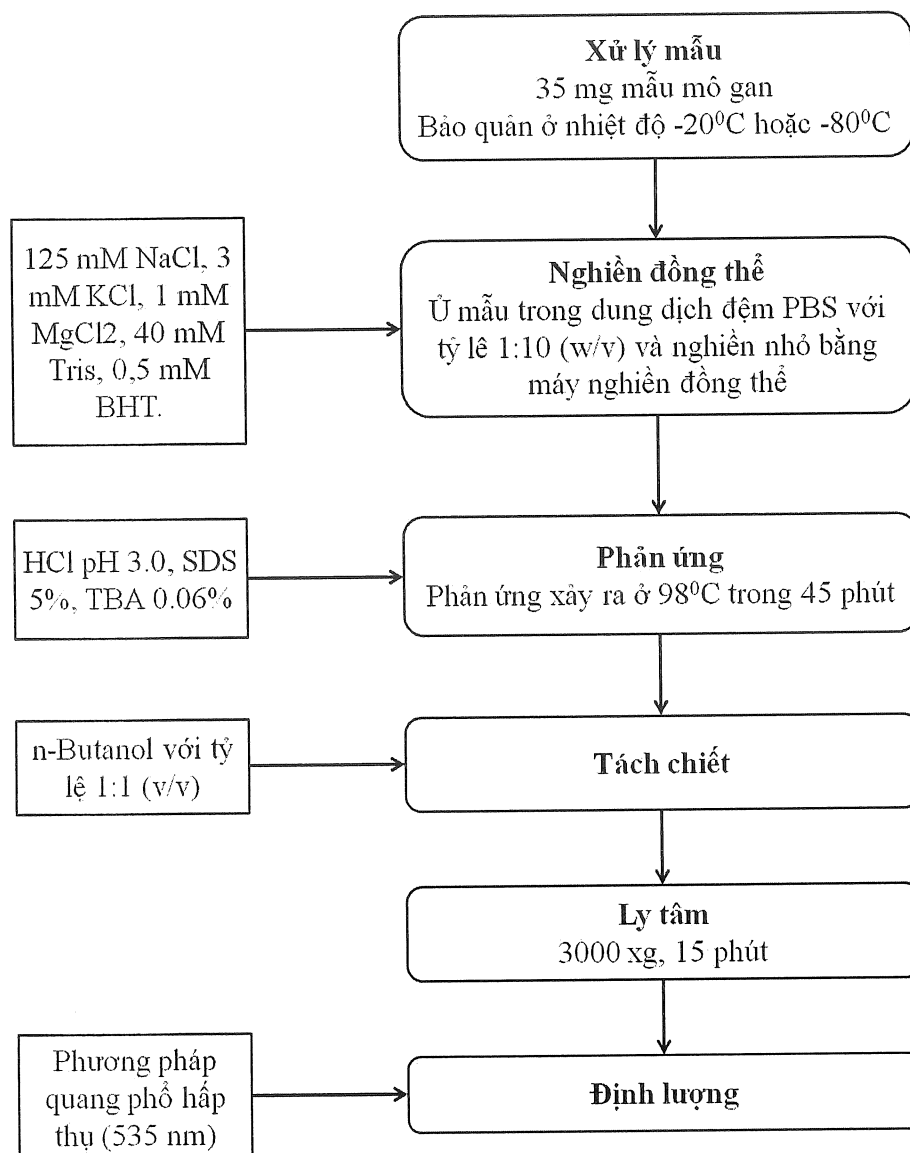
(v) ly tâm

hỗn hợp dịch phản ứng và n-Butanol được đem đi lắc mạnh trước khi ly tâm 3000 xg, trong 15 phút ở nhiệt độ phòng nhằm loại bỏ các thành phần khác; sau khi ly tâm, thu dịch nổi; và

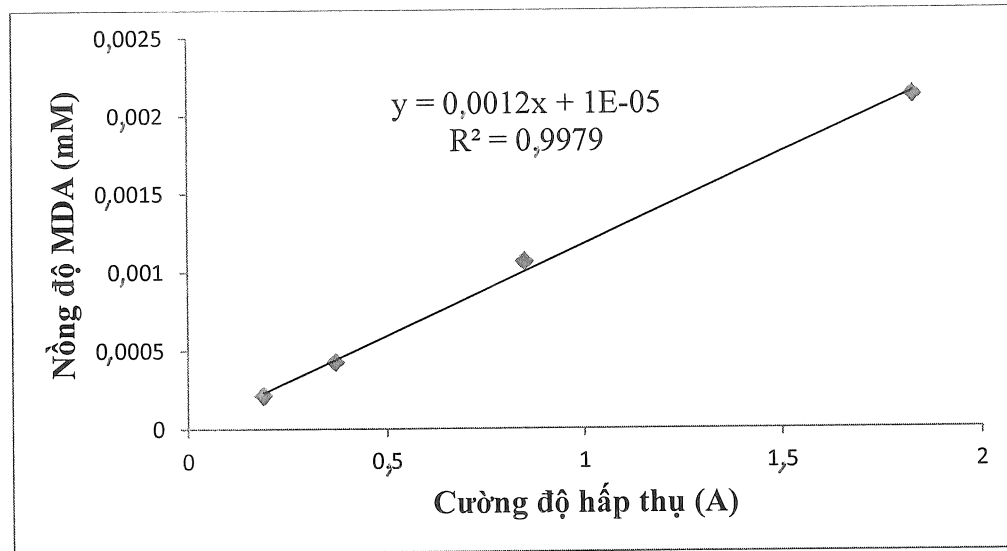
(vi) định lượng sản phẩm giữa TBA với MDA

dịch chiết sau khi ly tâm được đem đi định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ ở bước sóng 535nm và xác định nồng độ thông qua đường chuẩn.

Hình 1



Hình 2



Hình 3

