

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

.....\*\*\*.....

**TRẦN THỊ HOÀI VÂN**

**NGHIÊN CỨU HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC  
CỦA MỘT SỐ LOÀI THỰC VẬT VIỆT NAM  
THEO ĐỊNH HƯỚNG KHÁNG CHỨNG  
*VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO**

**Chuyên ngành: Hoá học các Hợp chất thiên nhiên  
Mã số: 9.44.01.17**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC**

**HÀ NỘI - 2023**

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ -  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. PHẠM THỊ HỒNG MINH

Người hướng dẫn khoa học 2: GS.TS. PHẠM QUỐC LONG

Phản biện 1: ...

Phản biện 2: ...

Phản biện 3: ....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ .., ngày ... tháng ... năm 2023.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ

- Thư viện Quốc gia Việt Nam

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của luận án

Từ cuối năm 2010 đến nay, bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND) với tác nhân gây bệnh được cho là do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang plasmid có chứa gen độc lực gây hoại tử gan tụy cấp đã gây thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành nuôi tôm công nghiệp ở nước ta. Việc nghiên cứu tìm kiếm các loài thực vật có tác dụng tốt phòng trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản nói chung và tôm nuôi nói riêng hiện đang là xu hướng phát triển của thế giới. Trên cơ sở sàng lọc hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* kết hợp với kinh nghiệm đã được sử dụng trong dân gian, đã xác định được nhiều loài thảo dược thể hiện hoạt tính tốt và có nhiều ưu điểm tiềm năng cho phát triển thành thuốc.

Mô hình nghiên cứu thuốc sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính đang ngày càng phổ biến và có nhiều đóng góp quan trọng trong nghiên cứu và phát triển thuốc. Đây là một kỹ thuật đáng tin cậy và hiệu quả trong phát triển thuốc mới trong tương lai. Từ những lí do trên, chúng tôi thực hiện đề tài “**Nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học của một số loài thực vật Việt Nam theo định hướng kháng chủng *Vibrio parahaemolyticus* và gây độc tế bào**”.

### 2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Nghiên cứu thành phần hóa học chính định hướng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm nuôi và hoạt tính kháng u của một số loài thực vật Việt Nam bao gồm: Đơn châu chấu (*Aralia armata*), Bộ mắm (*Pouzolzia zeylanica*), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*), Ké hoa đào (*Urena lobata*), Thôm lôm (*Polygonum chinense*), Thầu dầu (*Ricinus communis*) và Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*).

Nghiên cứu hoạt tính sinh học theo định hướng tạo chế phẩm chống bệnh AHPND do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra cho

tôm và nghiên cứu hoạt tính sinh học theo định hướng gây độc tế bào ung thư phổi A549 của các *ent*-kaurane diterpenoid phân lập được.

Sàng lọc *in silico* cơ sở dữ liệu hợp chất từ các loài thực vật nghiên cứu dự đoán nhanh các hoạt chất tiềm năng tác dụng trên một số đích sinh học cụ thể sử dụng trong điều trị kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và kháng u. Nghiên cứu cơ chế hoạt động và xác định mối tương quan hoạt tính – cấu trúc của các hoạt chất tiềm năng.

### **3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án**

- Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất sạch phân lập từ 07 loài thực vật nghiên cứu.
- Đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus in vitro* của các cao chiết thô và một số hợp chất sạch phân lập được.
- Mô phỏng tìm hiểu cơ chế ảnh hưởng của một số hoạt chất đến sự chuyển hóa proline của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*
- Đánh giá hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus in vivo* của các cao chiết thô của thực vật nghiên cứu.
- Nghiên cứu docking phân tử các hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid định hướng ức chế con đường tín hiệu PI3K.

### **4. Cấu trúc của luận án**

Luận án gồm 126 trang đánh máy với 17 bảng, 50 hình. Phân bố cụ thể như sau: Mở đầu 02 trang, tổng quan 26 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 09 trang, thực nghiệm 18 trang, kết quả và thảo luận 58 trang, kết luận và kiến nghị 02 trang, danh mục các công trình đã công bố 01 trang, tài liệu tham khảo 10 trang.

## **NỘI DUNG CHÍNH CỦA LUẬN ÁN**

### **CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN**

Phần tổng quan tài liệu là tập hợp các nghiên cứu trong nước và quốc tế về các vấn đề: 1. Giới thiệu về 7 loài thực vật nghiên cứu; 2. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính kháng vi sinh vật và gây độc tế bào ung thư; 3. Các nghiên cứu thuốc thực vật chống chùng *Vibrio* gây

bệnh trong nuôi trồng thủy sản; 4. Sàng lọc ảo dự đoán hoạt chất định hướng hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào.

## **Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Nguyên liệu và phương pháp phân lập xác định cấu trúc hóa học**

#### **2.1.1. Mẫu thực vật**

Đối tượng nghiên cứu của luận án là 07 mẫu thực vật: thân lá Bọ mấm (*Pouzolzia zeylanica*), lá Thầu dầu (*Ricinus communis*), thân cây Ké hoa đào (*Urena lobata*), cành lá Khổ sâm (*Croton tonkinensis*), cành lá Thồm lồm (*Polygonum chinense*), thân lá Đơn châu châu (*Aralia armata*) và quả Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*) ở Việt Nam.

#### **2.1.2. Phương pháp xử lý và chiết mẫu**

Xử lý mẫu thực vật theo phương pháp thông thường trong hóa học, tạo cao methanol tổng, sau đó được bổ sung thêm nước và chiết phân bố lại lần lượt với các dung môi *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate và nước.

#### **2.1.3. Phương pháp phân tích, phân lập các hợp chất từ mẫu cây**

Phối hợp các phương pháp sắc ký khác nhau như: sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột thường (CC) với pha tĩnh là silica gel (Merck), sắc ký cột pha đảo với pha tĩnh là YMC RP 18 (Merck), sắc ký trên cột diaion và sắc ký rây phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20 (Merck) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) điều chế.

#### **2.1.4. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học**

Sử dụng các phương pháp phổ hiện đại đồng thời kết hợp phân tích, tra cứu tài liệu tham khảo: Đo độ quay cực  $[\alpha]$ ; phổ khối lượng (MS); phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS); phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR):  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  và DEPT, HSQC, HMBC, COSY, NOESY, ROESY; phổ lưỡng sắc tròn (CD).

### **2.2. Các phương pháp thử hoạt tính sinh học**

Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn *V. parahaemolyticus in vitro* bằng phương pháp lập kháng sinh đồ trên đĩa thạch của Kirby-Bauer và khuếch tán trên đĩa thạch của Chawee-pack (2015) và thử nghiệm *in vivo* được thực hiện tại Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I và II.

Hoạt tính gây độc tế bào được thử nghiệm bằng phương pháp MTT [3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide] trên dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2), và phổi (A549) tại Phòng Hoạt chất sinh học, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST.

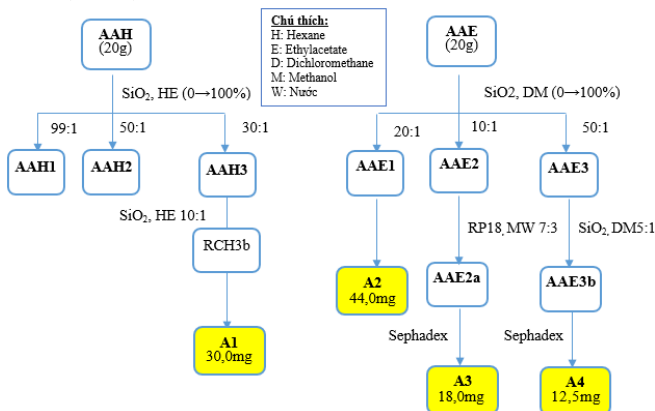
### 2.3. Phương pháp mô phỏng lắp ghép phân tử

Mô phỏng docking phân tử sử dụng các phần mềm AutoDock 4.2.6 và Molegro Virtual Docker để tìm hiểu cơ chế tác động lên quá trình chuyển hóa proline của *V. parahaemolyticus* và dự đoán các hợp chất tiềm năng ức chế con đường tín hiệu PI3K trong điều trị ung thư phổi tại Trung tâm Hóa thực vật và Công nghệ Nano Y Sinh, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST.

## Chương 3. THỰC NGHIỆM

### 3.1. Thân lá Đơn châu chấu (*Aralia armata*)

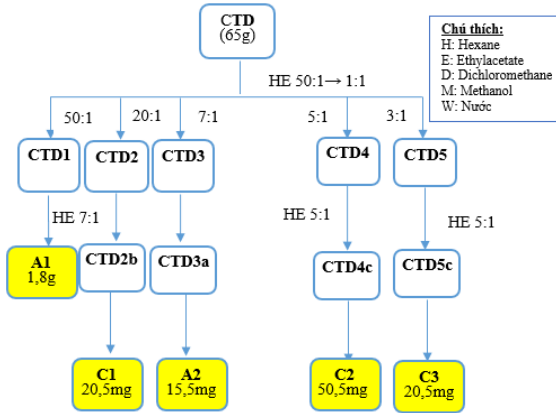
Quá trình phân lập các hợp chất từ cặn chiết *n*-hexane (AAH) và ethyl acetate (AAE) của Thân lá Đơn châu chấu như Sơ đồ 3.1



Sơ đồ 3.1 Phân lập cặn *n*-hexane và ethyl acetate thân lá Đơn châu chấu

### 3.2. Cành lá Khổ sâm (*Croton tonkinensis*)

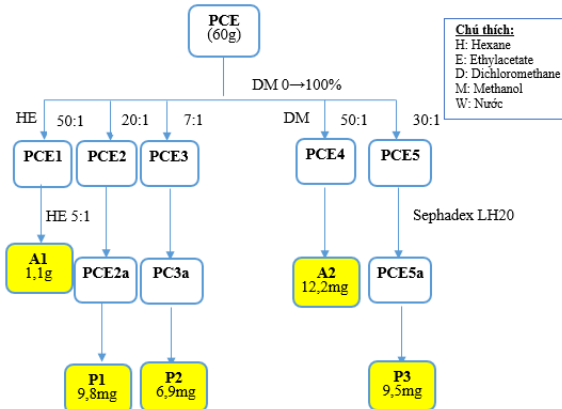
Quá trình phân lập các hợp chất từ cặn dichloromethane (CTD) cành lá cây Khổ sâm như sơ đồ 3.2



Sơ đồ 3.2. Sơ đồ phân lập từ cặn dichloromethane cành lá cây Khổ sâm

### 3.3. Cành lá Thồm lồm (*Polygonum chinense*)

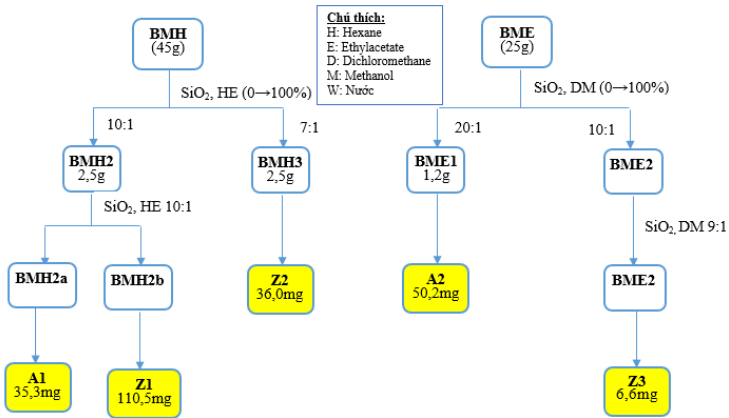
Quá trình phân lập các hợp chất từ cặn chiết ethyl acetate (PCE) của cành lá Thồm lồm như Sơ đồ 3.3



Sơ đồ 3.3. Phân lập cặn *n*-hexane và ethyl acetate cành lá Thồm lồm

### 3.4. Thân lá Bộ mắm (*Pouzolzia zeylanica*)

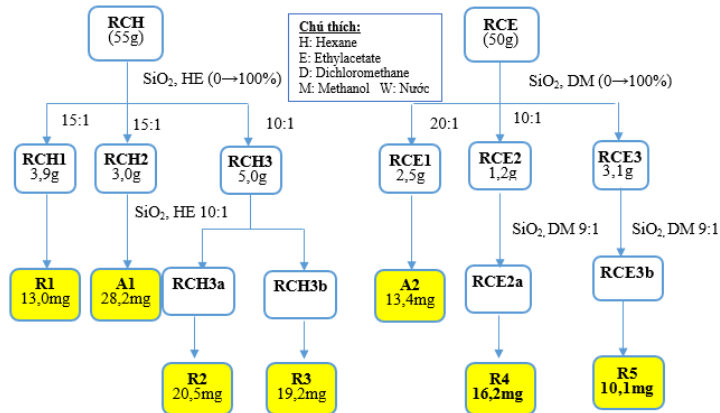
Quá trình phân lập các hợp chất từ cặn chiết *n*-hexane (BMH) và ethyl acetate (BME) của cành lá Bộ mắm như Sơ đồ 3.4



Sơ đồ 3.4. Phân lập cận *n*-hexane và ethyl acetate thân lá Bọ mắm

### 3.5. Lá Thầu dầu (*Ricinus communis*)

Quá trình phân lập các hợp chất từ cận chiết *n*-hexane (RCH) và ethyl acetate (RCE) của lá Thầu dầu như Sơ đồ 3.5

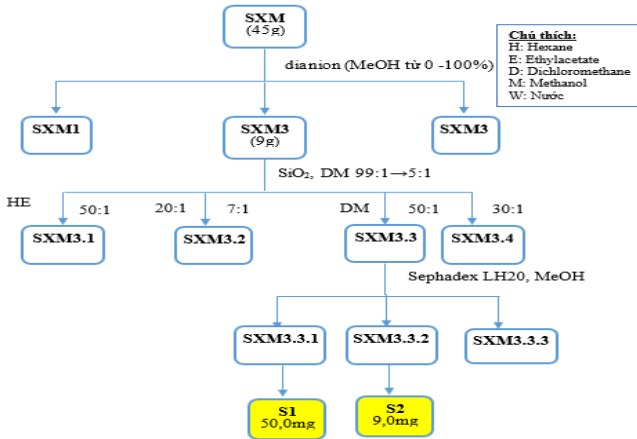


Sơ đồ 3.5. Phân lập cận *n*-hexane và ethyl acetate lá Thầu dầu

### 3.6. Quả Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*)

Quá trình phân lập các hợp chất từ cận methanol (SXM) của quả Cà trái vàng như Sơ đồ 3.6

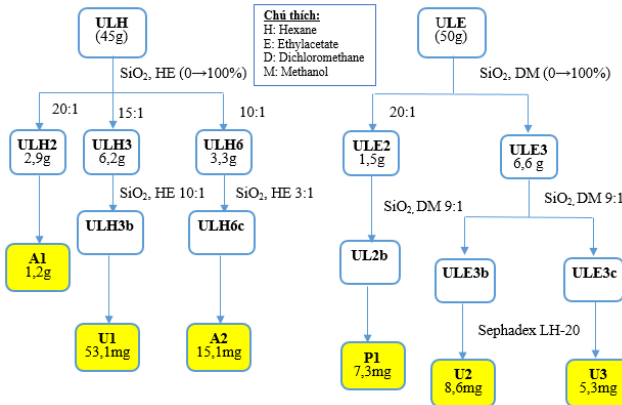




Sơ đồ 3.6. Phân lập căn *n*-hexane và ethyl acetate quả Cà trái vàng

### 3.7. Thân Ké hoa đào (*Urena lobata*)

Quá trình phân lập các hợp chất từ căn chiết *n*-hexane (ULH) và ethyl acetate (ULE) thân Ké hoa đào như Sơ đồ 3.7



Sơ đồ 3.7. Phân lập căn *n*-hexane và ethyl acetate thân Ké hoa đào

### 3.8. Mô phỏng docking phân tử

Mô phỏng docking phân tử tìm hiểu cơ chế hoạt động trên đích tác dụng PDH: Cấu trúc tinh thể của proline dehydrogenase được lấy từ cơ sở dữ liệu Protein Data Bank. Các hợp chất flavonoid và diterpenoid dùng trong nghiên cứu này được xây dựng cấu trúc ba chiều. Chất ức

chế PDH đã biết là naucleidinal được sử dụng làm chất chuẩn. Các mô phỏng được thực hiện bằng phần mềm AutoDock 4.2.6.

*Mô phỏng docking phân tử trên đích tác dụng con đường tín hiệu PI3K:* Cấu trúc tinh thể của các protein trong con đường tín hiệu PI3K gồm AKT, mTOR, COX-2, MDM2 và PDK1 được lấy từ cơ sở dữ liệu Protein Data Bank. Để tính điểm cho các hợp chất, hệ thống tính điểm MolDock Score [GRID] của phần mềm MVD được sử dụng. Oxaliplatin được dùng làm chất chuẩn so sánh.

### **3.9. Hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào của các Cao chiết và các hợp chất phân lập được**

*Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn in vitro:* theo phương pháp lập kháng sinh đồ trên đĩa thạch của Kirby-Bauer và phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch của Chawee-pack (2015). Hiệu quả được đánh giá dựa vào vòng vô khuẩn

*Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn in vivo:* theo phương pháp thí nghiệm sử dụng chiết phẩm thô trộn vào thức ăn cho tôm ăn và cho môi trường nước.

*Xác định giá trị LC<sub>50</sub> của cao chiết Khổ sâm:* được thực hiện dựa theo phương pháp của APHA (2005). Ghi nhận số tôm chết hàng ngày và theo dõi trong suốt 96 giờ để xác định giá trị LC<sub>50</sub> (nồng độ gây chết 50%) bằng chương trình máy tính (Stephan & Rodgers, 1985).

*Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp MTT:* dòng tế bào ung thư phổi người A549 được lấy từ Trung tâm Dinh dưỡng và nguyên liệu Dược phẩm, Đại học Myongji, Hàn Quốc. Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện theo phương pháp MTT. Nồng độ ức chế IC<sub>50</sub> được tính sử dụng phần mềm Graphpad Prism (USA).

Hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus in vitro* và *in vivo* của các Cao chiết và các hợp chất sạch được thử nghiệm tại Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I và Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II.

Hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư phổi (A549) được thử nghiệm tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST.

## Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### A. HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

#### 4.1. Kết quả tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* các cao chiết thô *in vitro*

Các cao chiết ethanol tổng của 13 mẫu: Thôm lồm (*Polygonum chinense*, **PC.M**), Thầu dầu (*Ricinus communis*, **RC.M**), Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*, **SX.M**), Ké hoa đào (*Urena lobata*, **UL.M**), Đơn châu châu (*Aralia armata*, **AA.M**), Bọ mắ (*Pouzolzia zeylanica*, **PZ.M**) và Khổ sâm (*Croton tonkinensis*, **CT.M**), Ké hoa vàng (*Sida rhombifolia*, **SR.M**), Hàn the (*Desmodium heterophyllum*, **DM.M**), Đơn buốt (*Biidens pilosal*, **BP.M**), Nghệ vàng (*Curcuma longa*, **CL.M**), Dầu giun (*Chenopodia abrosioides*, **CA.M**) và Thuốc dáu (*Euphorbia tithymaloides*, **ET.M**) được thử hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND. Kết quả thử nghiệm được thể hiện như bảng 4.1.

Bảng 4.1. Kết quả thử nghiệm kháng *V. parahaemolyticus* của các cao chiết thô

Mẫu	Nồng độ	d (mm)	Phương pháp	Kết luận
<b>AA.M</b>	1,2 mg/ còn 2%	25 ± 0,3	Chawee-pack (2015)	nhạy*
<b>CT.M</b>	1,2 mg/ còn 2%	18 ± 0,3	Chawee-pack (2015)	nhạy*
<b>PZ.M</b>	1,2 mg/ còn 2%	17 ± 0,3	Chawee-pack (2015)	nhạy*
<b>UL.M</b>	1,2 mg/ còn 2%	15 ± 0,3	Chawee-pack (2015)	nhạy*
<b>DM.M</b>	1,2 mg/ còn 2%	7 ± 0,0	Chawee-pack (2015)	kháng*
<b>ET.M</b>	1,2 mg/ còn 2%	7 ± 0,1	Chawee-pack (2015)	kháng*
<b>PC.M</b>	200 µg	20,6 ± 0,41	W. Kirby và A. Bauer (1961)	nhạy**
	66,7 µg	19,8 ± 0,45		nhạy**
	40 µg	15,3 ± 0,16		trung bình**
	22,2 µg	0		không **
<b>RC.M</b>	200 µg	15,3 ± 0,55	W. Kirby và A. Bauer (1961)	trung bình**
	66,7 µg	14,3 ± 0,22		trung bình**
	40 µg	11,0 ± 0,37		kháng**

	22,2 µg	0		không **
<b>SX.M</b>	200 µg	14,4 ± .24	W. Kirby và A. Bauer (1961)	trung bình**
	66,7 µg	14,2 ± 0,37		trung bình**
	40 µg	10,4 ± 0,24		kháng**
	22,2 µg	0		không **
<b>SR.M</b>	200 µg	0	W. Kirby và A. Bauer (1961)	không **
	66,7 µg	0		
	40 µg	0		
	22,2 µg	0		
<b>CL.M</b>	200 µg	11,2 ± 0,24	W. Kirby và A. Bauer (1961)	kháng **
	66,7 µg	10,3 ± 0,14		kháng **
	40 µg	8,9 ± 0,11		kháng**
	22,2 µg	0		không **
<b>CA.M</b>	200 µg	0	W. Kirby và A. Bauer (1961)	không **
	66,7 µg	0		
	40 µg	0		
	22,2 µg	0		
<b>BP.M</b>	200 µg	0	W. Kirby và A. Bauer (1961)	không **
	66,7 µg	0		
	40 µg	0		
	22,2 µg	0		

*Ghi chú:* \* Đường kính vùng ức chế sự phát triển vi khuẩn: Kháng:  $\leq 9$  mm; trung bình  $\geq 10-13$  mm; nhạy  $\geq 14$  mm. \*\* Đường kính vòng vô khuẩn: Kháng  $\leq 11$  mm, trung bình: 12-15 mm, nhạy:  $\geq 16$  mm

Bảng 4.1 cho thấy: 07 mẫu cao chiết ethanol tổng Thồm lồm (*Polygonum chinense*, **PC.M**), Thầu dầu (*Ricinus communis*, **RC.M**), Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*, **SX.M**), Ké hoa đào (*Urena lobata*, **UL.M**), Đơn châu châu (*Aralia armata*, **AA.M**), Bọ mắ ( *Pouzolzia zeylanica*, **PZ.M**) và Khổ sâm (*Croton tonkinensis*, **CT.M**) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn các mẫu còn lại nên được ưu tiên thử nghiệm tiếp theo.

Trong số các mẫu thử nghiệm theo phương pháp kháng khuẩn trên đĩa thạch theo W. Kirby và A. Bauer (1961) thì Cao chiết cây Thồm lồm (*Polygonum chinense*) có khả năng diệt chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND cao nhất. Ở nồng độ 66,7-200µg

mẫu thử nghiệm có hiệu quả diệt khuẩn không có sự khác biệt với thuốc Doxycycline (30 $\mu$ g).

Trong số các mẫu thử nghiệm theo phương pháp kháng khuẩn trên đĩa thạch theo Chawee-pack (2015) thì Cao chiết Đon châu châu (*Aralia armata*) có độ nhạy nhất, tiếp đến là cao chiết Khổ sâm (*Croton tonkinensis*), khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với đường kính trung bình vòng ức chế lần lượt là 25 và 18 mm.

Dựa vào kết quả trên:

Cao chiết tổng của 07 mẫu nói trên tiếp tục được nghiên cứu sâu hơn (thử nghiệm trên tôm, nghiên cứu hóa học để xác định thành phần hóa học có mặt những lớp chất chính nào trong các mẫu thử nghiệm có tác dụng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus*).

Kết quả lập kháng sinh đồ (Bảng 4.1) cho thấy nồng độ cao tách chiết được sử dụng tăng lên gấp 3 lần từ 66,7 $\mu$ g lên 200 $\mu$ g nhưng hiệu quả diệt khuẩn không có sự khác biệt ý nghĩa. Vì vậy khi áp dụng thử nghiệm trên tôm, nồng độ ở mức thấp tương ứng 66,7 $\mu$ g được lựa chọn để áp dụng nhằm tăng hiệu quả kinh tế (giảm chi phí tách chiết thảo dược nhưng hiệu quả diệt khuẩn vẫn đáp ứng tốt, tương ứng ở nồng độ cao (200 $\mu$ g).

Cao chiết tổng Đon châu châu (*A. armata*) mặc dù có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cao hơn cao chiết cây Khổ sâm (*C. tonkinensis*) nhưng do cây Đon châu châu ít phổ biến, phụ thuộc vào mùa vụ nên việc thu thập mẫu rất khó khăn, ảnh hưởng đến thử nghiệm thực nghiệm quy mô lớn. Ngược lại, cây Khổ sâm được sử dụng rộng rãi trong dân gian, mọc hoang và được trồng nhiều làm thuốc ở Ba Vì, Ninh Bình, Hòa Bình, ... Đây là nguồn nguyên liệu dễ kiếm. Mặt khác, kết quả thử hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của các hợp chất tinh (*ent*-kauran) phân lập từ lá cây Khổ sâm thể hiện hoạt tính tốt hơn nhiều so với các hợp chất tinh

(triterpenoid) phân lập được từ thân lá Đơn châu châu. Vì vậy, lựa chọn cao chiết cây Khổ sâm (*C. tonkinensis*) được đưa vào thử nghiệm trên tôm là hoàn toàn hợp lý.

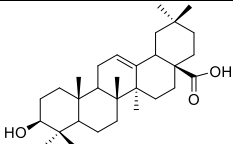
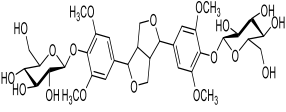
Cao chiết tổng cây Thồm lồm (*P. chinense*) và Thầu dầu (*R. communis*) được đưa vào thử nghiệm trên tôm. Thầu dầu được ưu tiên lựa chọn để thử nghiệm bởi một số lý do sau: Cà trái vàng (*S. xanthocarpum*) và Thầu dầu (*R. communis*) có hiệu quả tương tự nhau về kết quả lập kháng sinh đồ. Tuy nhiên, bảng 4.1 cho thấy đường kính vô khuẩn của Thầu dầu lớn hơn 0,9; 0,1 và 0,6mm so với Cà trái vàng ở nồng độ tương ứng 200, 66,7 và 40 $\mu$ g. Ngoài ra, ở Việt Nam trong nuôi trồng thủy sản Thầu dầu là 1 trong 6 loại thảo dược được khuyến cáo sử dụng trị bệnh cho cá nuôi chữa bệnh lở loét, đốm đỏ có kết quả cao (ngâm 15-20kg lá /8-10m<sup>3</sup> lồng nuôi cá).

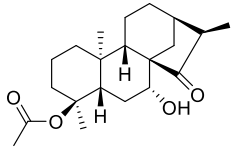
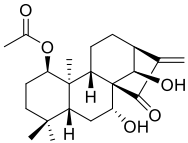
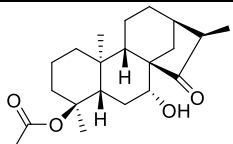
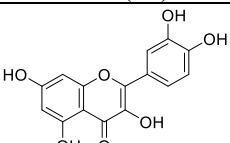
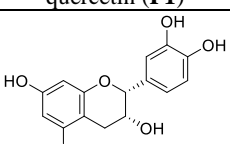
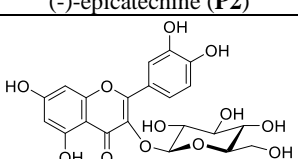
Trong nuôi trồng thủy sản, Thồm lồm đã được xác định có hiệu quả kháng khuẩn và nấm, phổ diệt khuẩn rộng với vi khuẩn Gr (+) và Gr (-) (*V. parahaemolyticus*) khi đường kính vòng vô khuẩn đạt 18,0 mm (*Staphylococcus aureus*) và 22,3 mm (*Bacillus subtilis*) tương ứng với hàm lượng 100  $\mu$ g/khoanh giấy.

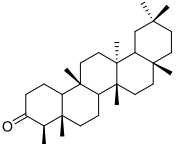
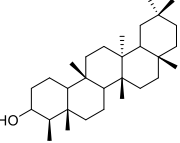
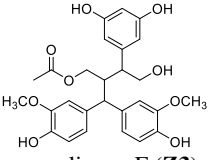
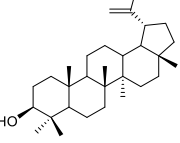
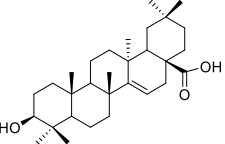
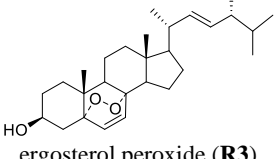
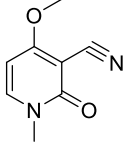
#### 4.2. Thành phần hóa học chính các thực vật có hoạt tính

Kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất trong 7 loài đã nghiên cứu được tóm tắt ở bảng 4.9.

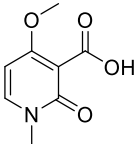
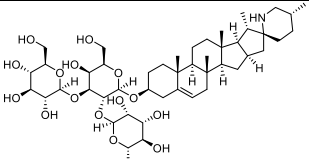
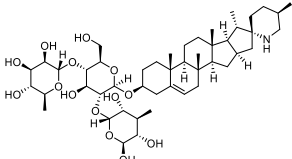
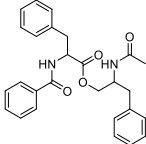
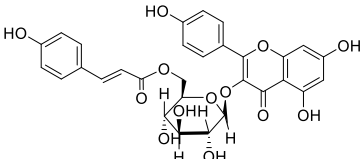
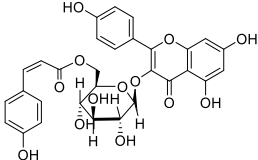
Bảng 4.9. Tổng hợp các hợp chất phân lập được từ 7 loài nghiên cứu

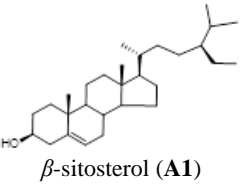
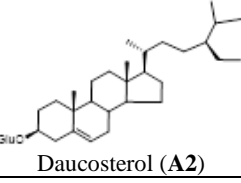
TT	Tên hợp chất	Lớp chất	Loài phân lập	KL (mg)	Tính mới
1	 oleanolic acid (A3)	Triterpenoit	<i>A. armata</i>	18,0	
2	 liriodendrin (A4)	Lignan	<i>A. armata</i>	12,5	L

3	 <p><i>ent</i>-18-axetoxy-7<math>\beta</math>-hydroxy-kauran-15-on (<b>C1</b>)</p>	Diterpenoid	<i>C. tonkinensis</i>	20,5	
4	 <p><i>ent</i>-1<math>\alpha</math>-axetoxy-7<math>\beta</math>,14<math>\alpha</math>-dihydroxykaur-16-en-15-on (<b>C2</b>)</p>	Diterpenoid	<i>C. tonkinensis</i>	50,5	
5	 <p><i>ent</i>-18-axetoxy-7<math>\beta</math>-hydroxykaur-16-en-15-on (<b>C3</b>)</p>	Diterpenoid	<i>C. tonkinensis</i>	20,3	
6	 <p>quercetin (<b>P1</b>)</p>	Flavonoid	<i>P. chinense</i> <i>U. lobata</i>	9,8 7,3	
7	 <p>(-)-epicatechine (<b>P2</b>)</p>	Flavonoid	<i>P. chinense</i>	6,9	L
8	 <p>quercetin-3-O-<math>\beta</math>-D-glucopyranoside (<b>P3</b>)</p>	Flavonoid	<i>P. chinense</i>	9,5	L

9	 <p>friedelan-3-one (<b>Z1</b>)</p>	Triterpenoid	<i>P. zeylanica</i>	110,5	L
10	 <p>3β-friedelanol (<b>Z2</b>)</p>	Triterpenoid	<i>P. zeylanica</i>	36,0	L
11	 <p>pouzolignan F (<b>Z3</b>)</p>	Lignan	<i>P. zeylanica</i>	6,6	H
12	 <p>lupeol (<b>R1</b>)</p>	Triterpenoid	<i>R. communis</i>	13,0	
13	 <p>epialeuritolic acid (<b>R2</b>)</p>	Triterpenoid	<i>R. communis</i>	20,5	L
14	 <p>ergosterol peroxide (<b>R3</b>)</p>	Steroid	<i>R. communis</i>	19,2	L
15	 <p>ricinine (<b>R4</b>)</p>	Alkaloid	<i>R. communis</i>	16,2	



16	 <p>3-carboxy-4-methoxy-N-methyl-2-pyridone (<b>R5</b>)</p>	Alkaloid	<i>R. communis</i>	10,1	H
17	 <p>solasonine (<b>S1</b>)</p>	Alkaloid	<i>S. xanthocarpum</i>	50,0	
18	 <p>solamargine (<b>S2</b>)</p>	Alkaloid	<i>S. xanthocarpum</i>	9,0	
19	 <p><math>\alpha</math>-acetylamino-phenylpropyl <math>\alpha</math>-benzoylamino-phenylpropanoate (<b>U1</b>)</p>	Alkaloid	<i>U. lobata</i>	53,1	H
20	 <p><i>trans</i>-tiliroside (<b>U2</b>)</p>	Flavonoid	<i>U. lobata</i>	8,6	H
21	 <p><i>cis</i>-tiliroside (<b>U3</b>)</p>	Flavonoid	<i>U. lobata</i>	5,3	H

22	 <p><math>\beta</math>-sitosterol (A1)</p>	Steroid (Phytosterol)	<i>A. armata</i> <i>C. tonkinensis</i> <i>P. chinense</i> <i>P. zeylanica</i> <i>R. communis</i> <i>U. lobata</i>	30,0 1800 1100 35,3 28,1 1200	
23	 <p>Daucosterol (A2)</p>	Steroid (Phytosterol)	<i>A. armata</i> <i>C. tonkinensis</i> <i>P. chinense</i> <i>P. zeylanica</i> <i>R. communis</i> <i>U. lobata</i>	44,0 15,5 9,5 50,2 13,4 15,1	

L: Lần đầu tiên phân lập từ loài

H: Lần đầu tiên phân lập từ họ

#### 4.3. Kết quả tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* của các chất sạch

Các hợp chất sạch thu được từ 7 loài nghiên cứu tiếp tục được thử nghiệm *in vitro* tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND. Chuẩn bị chủng khuẩn *V. parahaemolyticus* và phương pháp thử nghiệm được thực hiện như mục 3.9.

Kết quả thử nghiệm của các chất sạch: oleanolic acid, liriiodendrin (cây Đơn châu chấu), 3-friedelanone, 3 $\beta$ -friedelanol, pouzolignan F (cây Bọ mắ), lupeol, epialeuritolic acid, ergosterol peroxide, ricinine (cây Thầu dầu) và solasonine và solamagine (Cà trái vàng) đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ở 4 nồng độ 50, 100, 200 và 300 $\mu$ g/khoanh tằm bằng phương pháp khoanh giấy kháng sinh khuếch tán trên đĩa thạch theo W. Kirby và A. Bauer (1961) trong phòng thí nghiệm, đều không có hiệu quả kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND.

Kết quả thử nghiệm tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* các chất sạch: *ent*-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykauran-15-on (C1, hàm lượng 0,012%), *ent*-1 $\alpha$ -axetoxy-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-on (C2, hàm lượng 0,80%) và *ent*-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-on (C3, hàm lượng 0,52%) (cây Khổ sâm) và quercetin-3-O- $\beta$ -D-

glucopyranoside (**P3**, hàm lượng 1,11%) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được thể hiện như bảng 4.10.

*Bảng 4.10.* Hiệu quả ức chế của các chất sạch đến sự phát triển *Vibrio parahaemolyticus* (VP) được nuôi cấy trong môi trường ISB sau 24 giờ.

Tên chất	Nồng độ chất	Mật độ (CFU/ml)	Tỷ lệ ức chế vi khuẩn sau 24h
Còn tuyệt đối + VP + ISB		$1,37 \times 10^8$	
<b>P3</b>	0,1%	$2,4 \times 10^7$	82,5%
<b>C1</b>		$4,0 \times 10^7$	70,8%
<b>C2</b>		$7,6 \times 10^7$	44,5%
<b>C3</b>		$6,8 \times 10^7$	50,4%

Kết quả bảng 4.10 cho thấy tỷ lệ ức chế *V. parahaemolyticus* ở nghiệm thức chứa chất tinh **P3** là 82,5% và kể đến là nghiệm thức chứa chất tinh **C1** chiếm 70,8% ở nồng độ 0,1%. Ở các nghiệm thức chứa các chất tinh **C3** và **C2** có tỷ lệ ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* lần lượt là 50,4% và 44,5%. Điều này cho thấy **P3** và **C1** ở nồng độ 0,1% có khả năng ức chế sự phát triển của *V. parahaemolyticus*. Vì vậy, chúng được dùng cho thí nghiệm phòng bệnh AHPND ở phòng thí nghiệm với liều 0,1% (1g/kg thức ăn).

#### 4.4. Mô phỏng docking phân tử tìm hiểu cơ chế tác động của một số hoạt chất đến sự chuyển hóa proline của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Proline dehydrogenase (PDH) là một enzyme điều hòa đóng vai trò quan trọng trong việc tự tổ chức protein trong vi khuẩn. Cơ chế hoạt động của các hợp chất *ent-1 $\alpha$ -axetoxy-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-on* (**C2**), *ent-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxy-kauran-15-on* (**C1**), *ent-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-on* (**C3**) và quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**P3**) sẽ được phân tích sử dụng phương pháp mô phỏng lắp ghép phân tử giữa các hợp chất với đích enzyme PDH.

*Bảng 4.11.* Điểm năng lượng liên kết và tương tác tạo thành của các chất với PDH

Hợp chất	$\Delta G$ (kcal/mol)	Số liên kết	Amino axit tham gia tạo
----------	-----------------------	-------------	-------------------------

		<b>Hydrogen</b>	<b>liên kết Hydrogen</b>
<b>C2</b>	-9.91	2	Gly64; Asp281
<b>C1</b>	-10.85	2	Gly64; Gln102
<b>C3</b>	-10.34	3	Gly64; Asp281; Arg289
<b>P3</b>	-11.59	8	Asp61; Leu62; Gly64; Leu98; Leu100; Gln102 ; Arg288 ; Arg289
Naucleidinal	-7.82	2	Gly64; Arg289

Kết quả mô phỏng tương tác giữa các hợp chất tiềm năng với vùng hoạt động của enzyme proline dehydrogenase được trình bày tại bảng 4.11. Theo thuật toán của phần mềm Autodock 4.2.6, hợp chất có điểm năng lượng liên kết tự do càng âm nhiều có nghĩa ái lực liên kết của hợp chất với đích tác dụng càng lớn. Xét theo tiêu chí trên, cả bốn hợp chất sau mô phỏng đều cho kết quả ái lực liên kết tại vùng hoạt động của PDH tốt hơn so với chất chuẩn naucleidinal, trong đó hợp chất **P3** cho thấy ái lực liên kết cao nhất (-11.59 kcal/mol), hợp chất **C2** có ái lực liên kết thấp nhất trong bốn chất nghiên cứu (-9.91 kcal/mol).

Những số liệu ban đầu này cho thấy độ tương quan cao giữa tính toán với thực nghiệm thể hiện qua hệ số tương quan  $R^2 = 0.8014$ . Điều này gợi ý mô hình tính toán sử dụng trong nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng trong dự đoán các hợp chất có khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Nhìn chung, các hợp chất đều hình thành liên kết với các amino axit quan trọng nằm trong vùng hoạt động của enzyme PDH, điều này gợi ý sự giải thích hợp lý cho cơ chế tạo ra hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất nghiên cứu.

#### **4.5. Kết quả tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* các cao chiết thô *in vivo***

##### **4.5.1. Cao chiết Thỏm lỏm và Thầu dầu được bổ sung vào môi trường nước**

Kết quả thử nghiệm bổ sung cao chiết ethanol tổng Thỏm lỏm (PC.M) và Thầu dầu (RC.M) vào môi trường nước: cao chiết PC.M ở nồng độ 30g/m<sup>3</sup> sử dụng pha vào nước nuôi tôm có mầm bệnh AHPND ở 2 thời điểm (bắt đầu xuất hiện mầm bệnh và lặp lại sau 24h) đã nâng

cao tỷ lệ sống tôm (60%) so với lô đối chứng dương. Cao chiết **PC.M** ( $25\text{g}/\text{m}^3$ ) và **RC.M** ( $35\text{g}/\text{m}^3$ ;  $40\text{g}/\text{m}^3$ ) không diệt khuẩn trong nước hoàn toàn, vì vậy tỷ lệ chết 100% sau 6 ngày thí nghiệm.

#### **4.5.2. Cao chiết Khổ sâm, Đơn châu chấu, Bọ mả, và Ké hoa đào được bổ sung vào môi trường nước**

Kết quả thử nghiệm bổ sung cao chiết ethanol tổng Khổ sâm (**CT.M**), Đơn châu chấu (**AA.M**), Bọ mả (**PZ.M**), và Ké hoa đào (**UL.M**) vào môi trường nước trước khi gây nhiễm 1 giờ và ngâm lần 2 sau 24 giờ gây nhiễm với liều 20 ppm: tỷ lệ sống trung bình của tôm sau 7 ngày gây nhiễm được ghi nhận cao nhất là  $71,7 \pm 2,9\%$  ở nghiệm thức ngâm **CT.M**, kế đến ngâm **AA.M** là  $61,7 \pm 2,9\%$ , ngâm **PZ.M** là  $35\% \pm 10,0\%$  và thấp nhất là ngâm **UL.M** là  $11,7 \pm 7,6\%$ . Trong khi đó, tỷ lệ sống trung bình ở nghiệm thức đối chứng dương là  $10 \pm 5,0\%$  và đối chứng âm tôm vẫn sống 100% sau kết thúc thí nghiệm.

Tỷ lệ gây chết tôm được thu nhận, giá trị  $LC_{50}$  được xác định ở các thời điểm 48, 72 và 96 giờ lần lượt là 93,02ppm, 81,25ppm, và 81,25ppm. Trong khi, ở thời điểm 24 giờ, giá trị  $LC_{50}$  không xác định được do tỷ lệ chết thấp.

#### **4.5.3. Tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* trộn thức ăn nuôi tôm**

##### **4.5.3.1. Cao chiết Thồm lồm (**PC.M**) trộn thức ăn nuôi tôm**

Đối với công thức phối trộn cao chiết Thồm lồm **PC.M** vào thức ăn: tôm được ăn với 2 nồng độ 25 và  $30\text{g}/100\text{kg}$  tôm liên tục trong 6 ngày, sau đó công cường độc vi khuẩn bằng bổ sung vi khuẩn vào nước nuôi với mật độ  $10^5$ - $10^6$  cfu/mL. Kết quả cho thấy bằng biện pháp cho ăn ở nồng độ  $25\text{g}/100\text{kg}$  tôm tỷ lệ chết 27%, trong khi đó lô ăn  $30\text{g}/100\text{kg}$  tôm có tỷ lệ chết 60%. Tỷ lệ chết cao ở lô cho ăn  $30\text{g}/100\text{kg}$  tôm được ghi nhận do ở ngày thứ 3 sau khi công cường độc. Như vậy qua mô hình thí nghiệm này nhận thấy thảo dược **PC.M** có hiệu quả phòng bệnh AHPND với tỷ lệ sống đạt cao  $>60\%$  so với lô đối chứng dương.

#### 4.5.3.2. Cao chiết Khổ sâm (CT.M) trộn thức ăn nuôi tôm

Kết quả thí nghiệm phòng bệnh bằng cao chiết khổ sâm trộn vào thức ăn và cho tôm ăn suốt 7 ngày và 12 ngày: Tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức đối chứng dương (tôm ăn thức ăn không trộn cao chiết) là  $15\% \pm 5\%$  và tỷ lệ sống trung bình của tôm ở nghiệm thức đối chứng âm là 100%. Trong khi đó, các nghiệm thức phòng bệnh bằng dịch chiết ở các nồng độ 1%; 2% và 4% có tỷ lệ tôm sống lần lượt là  $43,3\% \pm 5,8\%$ ;  $63,3\% \pm 7,6\%$  và  $71,7\% \pm 2,9\%$ . Điều này có thể nói rằng dịch chiết Khổ sâm có hiệu quả phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng với cả hai liều 2% và 4% trộn vào thức ăn với tỷ lệ sống trung bình trên 60%. Kết quả phân tích mô bệnh học các mẫu tôm thí nghiệm phòng bệnh AHPND cho thấy gan tụy tôm ăn thức ăn trộn 2% và 4% cao Khổ sâm có cấu trúc bình thường.

Tỷ lệ chết trung bình của tôm thí nghiệm ở các thời điểm 24, 48, 72, và 96 giờ được thử nghiệm. Tôm được cho ăn hàng ngày với các nồng độ cao chiết khổ sâm được trộn vào thức ăn bao gồm 0, 25, 30, 35, 40, và 45%. Kết quả thí nghiệm cho thấy không có tôm chết ở nghiệm thức đối chứng (0%) trong suốt 96 giờ thí nghiệm. Ở tất cả các nghiệm thức ăn cao chiết, tôm chết sau 24 giờ, có tỷ lệ chết trung bình từ  $1,67\% \pm 2,89\%$  đến  $5\% \pm 0\%$ . Tỷ lệ trung bình tôm bị chết sau 48 giờ ở nồng độ cao chiết cao nhất (45%) là  $15\% \pm 5\%$ . Ở thời điểm 72 và 96 giờ, tỷ lệ trung bình tôm chết ở nồng độ cao nhất của thí nghiệm (45%) là tương đương nhau ( $21,67\% \pm 2,89\%$ ). Do các kết quả tỷ lệ tôm chết  $< 22\%$ , nên không xác định được giá trị  $LC_{50}$  ở các thời điểm quan. Gan tụy tôm có cấu trúc bình thường.

### **B. DOCKING PHÂN TỬ VÀ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO *IN VITRO***

#### **4.6. Nghiên cứu docking phân tử các hợp chất ent-kaurane diterpenoid định hướng ức chế con đường tín hiệu PI3K**

Mục tiêu của nghiên cứu này là tiến hành docking phân tử để xác định các hợp chất diterpenoid có khả năng ức chế con đường tín hiệu

PI3K, sau đó, nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của chúng trên dòng tế bào ung thư phổi người (A549).

Dựa trên các hợp chất đã phân lập từ lá cây Khổ sâm và tài liệu công bố quốc tế, tiến hành docking phân tử cho 7 hợp chất ent-kaurane diterpenoid gồm: ent-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-one (**1**); ent-1 $\alpha$ -axetoxy-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-one (**2**); ent-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-15-one (**3**); ent-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-one (**4**); ent-18 $\alpha$ -axetoxy-7 $\alpha$ ,14 $\beta$ -dihydroxykaur-16-en-15-one (**5**); ent-1 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -diacetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**); và ent-1 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diacetoxy-14 $\alpha$ -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**) định hướng ức chế trên các protein chính thuộc con đường tín hiệu PI3K gồm: AKT (PDB ID: 1UNQ), mToR (PDB ID: 4JSV), COX-2 (PDB ID: 3NT1), MDM2 (PDB ID: 4JRG), PDK1 (PDB ID: 5LOV) trong điều trị ung thư phổi.

Kết quả cho thấy, hợp chất **6** có điểm năng lượng dock với mToR cao nhất là -124.5 kcal/mol, đứng thứ hai là **1** liên kết với COX-2 có điểm năng lượng dock -110.2 kcal/mol. Xét trên phương diện liên kết hydro, **6** không tạo liên kết hydro với mToR do đó sự tương tác với mToR không bền vững mặc dù điểm năng lượng dock cao hơn so với các chất khác. Hợp chất **1** tạo liên kết hydro với Phe210, Gln289 and Tyr385 thông qua vị trí O17 và H1. Kết quả tính ái lực liên kết chỉ ra **7** và **1** có ái lực liên kết mạnh nhất với mToR lần lượt là -16.1 kJ/mol và -15.8 kJ/mol. Nhìn chung, ngoại trừ chất chuẩn Oxaliplatin thể hiện ái lực liên kết tốt với tất cả các protein, hợp chất **7** có ái lực liên kết mạnh nhất với AKT, mToR, MDM2 và PDK1, hợp chất có ái lực tốt nhất với COX-2 là **6**, hợp chất **2** cũng thể hiện năng lượng dock cao với AKT, mToR và MDM2, chỉ đứng sau hợp chất **6** và **7**. Do đó, **1**, **2**, **6** và **7** được dự đoán có tiềm năng ức chế con đường tín hiệu PI3K.

#### **4.7. Hoạt tính các ent-kaurane diterpenoid từ Khổ sâm gây độc trên dòng tế bào ung thư phổi người A549**

*Hoạt tính các ent-kaurane diterpenoid từ Khổ sâm gây độc trên dòng tế bào A549 ở người bằng phương pháp MTT: Tế bào được ủ với*

các hợp chất nghiên cứu trong 48 tiếng ở các nồng độ khác nhau. Giá trị  $IC_{50}$  của hợp chất **7**, **6**, **1** và **2** thu được lần lượt là  $11,17 \pm 0,8$ ;  $12,87 \pm 0,3$ ;  $18,55 \pm 1,3$  và  $20,07 \pm 0,8 \mu M$ , cao hơn chất chuẩn oxaliplatin ( $22,12 \pm 1,1 \mu M$ ). Các hợp chất còn lại thể hiện hoạt tính ở mức trung bình và yếu. Các kết quả ban đầu này cho thấy tiềm năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư phổi của các chất nghiên cứu và có sự tương đồng với kết quả mô phỏng docking phân tử.

## KẾT LUẬN

**Luận án đã thu được các kết quả chính như sau:**

### 1. Nghiên cứu về hóa học:

Từ 07 loài thực vật được khảo sát, gồm có Bộ mấm (*Pouzolzia zeylanica*), Thầu dầu (*Ricinus communis*), Ké hoa đào (*Urena lobata*), Khô sâm (*Croton tonkinensis*), Thồm lồm (*Polygonum chinense*), Đơn châu chấu (*Aralia armata*) và Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*) đã phân lập và xác định cấu trúc 33 hợp chất (trong đó trùng lặp 10 hợp chất, còn lại 23 hợp chất) chủ yếu thuộc các lớp chất diterpenoid, triterpenoid, steroid và polyphenol.

### 2. Nghiên cứu hoạt tính sinh học theo định hướng tạo chế phẩm chống bệnh hoại tử gan tụy cấp do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra cho tôm:

- Kết quả khảo sát sơ bộ khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus in vitro* của các cao chiết ethanol thô của 13 loài thực vật được lựa chọn cho thấy 07 loài: Ké hoa đào, Bộ mấm, Khô sâm và Đơn châu chấu (đường kính trung bình vòng ức chế lần lượt là 15 mm, 17 mm, 18 mm, và 25 mm theo phương pháp của Chawee-pack-2015); Thầu dầu và Thồm lồm (đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 10,4 - 15,3 mm và 15,3 - 20,6 mm tương ứng với nồng độ 40-200 $\mu g$ /khoanh theo phương pháp của W. Kirby và A. Bauer - 1961) thể hiện hoạt tính tốt nhất, được lựa chọn cho nghiên cứu kháng khuẩn V.



*parahaemolyticus* trên tôm (*in vivo*) bổ sung vào môi trường nước và thức ăn. Kết quả thử hoạt tính *in vivo* cho biết, cao chiết Khổ sâm (CT.M) ở liều 15 ppm và Thòmlỏm (PC.M) ở nồng độ 30g/m<sup>3</sup> bổ sung vào môi trường nước nuôi tôm có mầm bệnh AHPND *in vivo* cho kết quả kháng khuẩn tốt nhất, nâng cao tỷ lệ sống tôm hơn 60%. Cao chiết Khổ sâm (ở liều 2% (20g/kg thức ăn) và 4% (40g/kg thức ăn)) và Thòmlỏm (ở liều 25-30g/100kg tôm) bổ sung vào thức ăn cho tôm có hiệu quả nâng tỷ lệ sống của tôm lên trên 70,4%.

- Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học *in vitro* cho thấy các hợp chất quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, *ent*-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-on, *ent*-18 $\alpha$ -axetoxy-7 $\alpha$ ,14 $\beta$ -dihydroxykaur-16-en-15-on và *ent*-1 $\alpha$ -axetoxy-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-on ở nồng độ 0,1% có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh AHPND lần lượt là 82,5; 70,8; 50,4; 44,5 và 35,5%.

- Bước đầu tìm hiểu cơ chế ảnh hưởng của các hợp chất *ent*-1 $\alpha$ -axetoxy-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-on (C2), *ent*-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxy-kauran-15-on (C1), *ent*-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-on (C3) và quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (P3) đến sự chuyển hóa proline của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, kết quả mô phỏng docking phân tử cho thấy ái lực liên kết tại vùng hoạt động của protein PDH tốt hơn so với chất chuẩn nucleidinal, trong đó hợp chất P3 cho thấy ái lực liên kết cao nhất (-11.59 kcal/mol), hợp chất C2 có ái lực liên kết thấp nhất trong bốn chất nghiên cứu (-9.91 kcal/mol), những số liệu thu được có độ tương đồng cao so với kết quả thực nghiệm.

### 3. Nghiên cứu hoạt tính sinh học theo định hướng gây độc tế bào:

- Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên dòng tế bào ung thư phổi người A549 các ent-kaurane diterpenoid phân lập từ cây Khổ sâm gồm: *ent*-1 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diacetoxy-14 $\alpha$ -hydroxykaur-16-en-15-one (7); *ent*-1 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -diacetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-one (6); *ent*-18 $\alpha$ -axetoxy-

7 $\alpha$ ,14 $\beta$ -dihydroxykaur-16-en-15-one (**5**); *ent*-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-one (**4**); *ent*-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**); *ent*-1 $\alpha$ -axetoxy-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-one (**C2**); và *ent*-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-15-one (**C1**). Kết quả chỉ ra các hoạt chất có tiềm năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư phổi là các hợp chất **7**, **6**, **C3** và **C2** với lần lượt IC 50 là  $11,17 \pm 0,8$ ;  $12,87 \pm 0,3$ ;  $18,55 \pm 1,3$  và  $20,07 \pm 0,8$   $\mu\text{M}$ , cao hơn chất chuẩn oxaliplatin ( $22,12 \pm 1,1$   $\mu\text{M}$ ).

- Kết quả mô phỏng docking phân tử 7 hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid nguồn gốc từ lá cây Khổ sâm định hướng ức chế con đường tín hiệu PI3K trong ung thư phổi tế bào cũng chỉ ra 4 hợp chất: *ent*-18-axetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**), *ent*-1 $\alpha$ -axetoxy-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxykaur-16-en-15-one (**C2**), *ent*-1 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -diacetoxy-7 $\beta$ -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**) và *ent*-1 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diacetoxy-14 $\alpha$ -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**) thể hiện tiềm năng ức chế các protein khi so sánh với chất chuẩn oxaliplatin, như vậy có sự tương đồng cao giữa kết quả mô phỏng docking phân tử với kết quả thực nghiệm.

## KIẾN NGHỊ

Các kết quả nghiên cứu trong luận án cho thấy Khổ sâm và Thồm lồm là hai loài có thành phần hóa học và hoạt tính sinh học thú vị. Vì vậy, trong tương lai tiếp tục đánh giá hiệu quả phòng bệnh AHPND của dịch chiết thô thảo dược Khổ sâm và Thồm lồm để tạo ra các sản phẩm phòng bệnh AHPND do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra nói riêng và các bệnh do vi khuẩn *Vibrio* sp. gây ra nói chung, phục vụ chăm sóc sức khỏe cộng đồng. Các kết quả nghiên cứu về hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư phổi A549 cho thấy, các hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid có tiềm năng phát triển thành thuốc điều trị ung thư.

## CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

### ❖ International articles (ISI/Scopus):

1. Pham Thi Hong Minh, **Tran Thi Hoai Van**, et al. Identification of *ent*-kaurane diterpenoid compounds as potential inhibitors of the PI3K pathway in nonsmall cell lung cancer through molecular docking simulations, *Natural Product Communications*, (2021), 16(9): 1–8.

### ❖ National articles:

2. **Trần Thị Hoài Vân**, Đỗ Tiến Lâm và cộng sự. Đóng góp vào kết quả nghiên cứu thành phần hóa học cây Bộ mãm *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn). *Tạp chí Hóa học*, (2015), 53 (6e 1,2), p. 149 - 153.

3. Đỗ Tiến Lâm, Vũ Thị Thu Lê, **Trần Thị Hoài Vân** và cộng sự. Các kết quả nghiên cứu ban đầu về thành phần hóa học của thân cây Đơn châu chấu (*Aralia armata*) ở Thái nguyên. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Trường ĐH Thái Nguyên, KHTN-KT, (2016), 150 (05), p. 9-14. ISSN: 1859-2171.

4. **Tran Thi Hoai Van**, Luan Thi Thu và cộng sự. Contribution to results of the chemical constituents of *Ricinus communis*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, (2016), 54 (2C), p. 523-529. ISSN: 1859-2171.

5. Trương Thị Mỹ Hạnh, Phạm Thị Yến, Phạm Thị Huyền, Huỳnh Thị Mỹ Lê, Phạm Thị Hồng Minh, Đỗ Tiến Lâm, **Trần Thị Hoài Vân** và cộng sự. Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết thân lá Thồm lồm (*Polygonum chinenses* L.) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm nuôi nước lợ. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, (2017), 17 (6), p. 20-24. ISSN: 1859-4794.

6. Phạm Minh Quan, **Tran Thi Hoai Van**, Do Tien Lam et al. Study on the chemical composition of *Urena lobata* (L.) growing in Vietnam. *Tạp chí Vietnam Journal of Science and Technology*, (2019), 57 (2), p.162-169.

7. **Tran Thi Hoai Van**, Pham Thi Hong Minh, Pham Quoc Long, et al. Effect of some phyto-flavonoids and terpenoid on proline metabolism of *Vibrio parahaemolyticus*: inhibitory mechanism and interaction with molecular docking simulation. *Vietnam Journal of Science and Technology*, (2020), 58 (6A) p. 189-198.