

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



HOÀNG THẾ HÙNG

**NGHIÊN CỨU KHU HỆ VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT
BẰNG KỸ THUẬT METAGENOMICS VÀ TIỀM NĂNG
ỨNG DỤNG PROBIOTICS TRONG HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ
BỆNH TIỂU ĐƯỜNG TYPE 2**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9 42 01 07

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH 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:

Người hướng dẫn 1: TS Nguyễn Trung Nam

Người hướng dẫn 2: TS Nguyễn Thị Tuyết Nhung

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án 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 202...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Tiểu đường type 2 là một trong những bệnh chuyển hóa tiến triển được đặc trưng bởi rối loạn chức năng tế bào β của tuyến tụy và hiện tượng kháng insulin ngoại vi, dẫn đến khiếm khuyết trong chuyển hóa glucose và viêm mãn tính. Sự phát triển của bệnh tiểu đường type 2 có liên quan chặt chẽ với các yếu tố di truyền và môi trường. Theo báo cáo, hơn 460 triệu người trưởng thành trên thế giới mắc bệnh tiểu đường vào năm 2019 và con số này sẽ tăng lên 700 triệu người vào năm 2045. Người mắc bệnh tiểu đường mãn tính sẽ làm tổn thương và suy yếu chức năng của mắt, thận, thần kinh và tim mạch. Do đó, việc khám phá cơ chế bệnh sinh và điều trị bệnh tiểu đường type 2 có ý nghĩa rất lớn.

Hệ vi sinh vật đường ruột được coi là một hệ sinh thái phức tạp trong môi trường đường tiêu hóa, bao gồm vi khuẩn, cổ khuẩn, nấm, virus và động vật nguyên sinh. Hệ vi sinh vật đường ruột có vai trò quan trọng trong tiêu hóa thức ăn, trao đổi chất, hệ miễn dịch, và sức khỏe của con người. Ngày càng có nhiều bằng chứng chỉ ra rằng hệ vi khuẩn đường ruột đóng một vai trò quan trọng đối với sức khỏe con người và tình trạng rối loạn hệ vi khuẩn đường ruột có liên quan đến nhiều bệnh lý, trong đó có bệnh tiểu đường type 2. Hơn nữa, probiotics có khả năng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường nhờ tác dụng bảo vệ các tiểu đảo và tế bào β của tuyến tụy, làm chậm sự khởi phát của bệnh tiểu đường type 2, ngăn ngừa các biến chứng liên quan đến bệnh tiểu đường type 2. Hệ vi sinh vật có thể di truyền, nhiều vi khuẩn được di truyền trực tiếp từ mẹ sang con. Một người trưởng thành khỏe mạnh thì chỉ riêng trong ruột đã có khoảng 100 tỷ vi khuẩn. Ở người béo có nhiều vi khuẩn Firmicutes và ít vi khuẩn Bacteroidetes hơn so với người gầy và khoảng 80% người mắc bệnh tiểu đường type 2 bị thừa cân.

Trước đây, việc nghiên cứu đa dạng vi sinh vật thường dựa vào các phương pháp phân lập và nuôi cấy truyền thống nên chỉ giúp chúng ta hiểu biết được 0,1-1% vi sinh vật trong hệ sinh thái. Phương pháp đánh giá đa dạng vi sinh vật tiềm năng nhất hiện nay là phân tích đa hệ gen bằng công cụ Metagenomics. Công cụ Metagenomics được xem là sự tổng hợp sức mạnh và các thành tựu mới nhất của các công nghệ genomics, tin sinh học, sinh học hệ thống. Công nghệ này là chìa khóa góp phần làm sáng tỏ về khu hệ vi khuẩn đường ruột của người, đặc biệt là các vi khuẩn không phân lập được. Những kết quả về nghiên cứu metagenome khu hệ vi khuẩn trong đường

ruột của người sẽ góp phần vào việc xác định các tác nhân gây bệnh tiểu đường type 2 cũng như xác định các vi khuẩn có lợi tiềm năng, qua đó góp phần định hướng cho sử dụng vi sinh vật trong điều trị bệnh tiểu đường.

Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài luận án “*Nghiên cứu khu hệ vi khuẩn đường ruột bằng kỹ thuật Metagenomics và tiềm năng ứng dụng probiotics trong hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường type 2*”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

1) Xác định được sự thay đổi về thành phần của khu hệ vi khuẩn đường ruột người mắc bệnh tiểu đường type 2.

2) Chỉ ra mối liên quan của sự thay đổi khu hệ vi khuẩn đường ruột với các yếu tố gây ra bệnh tiểu đường.

3) Phân lập, tìm ra các vi khuẩn tiềm năng và lựa chọn các chủng có lợi cho người mắc bệnh tiểu đường type 2.

3. Nội dung nghiên cứu

1) Đánh giá sự thay đổi khu hệ vi khuẩn đường ruột ở nhóm người bị bệnh tiểu đường type 2 và người không tiểu đường trên cơ sở dữ liệu giải trình tự gen 16S rRNA metagenome.

2) Phân tích mối liên quan của vi khuẩn đường ruột với một số chỉ số dùng chẩn đoán và tiên lượng bệnh tiểu đường type 2.

3) Nghiên cứu phân lập và kiểm tra đặc điểm của một số chủng vi khuẩn có khả năng liên quan đến bệnh tiểu đường type 2. Đánh giá khả năng giảm đường huyết của chủng vi khuẩn phân lập trên chuột thí nghiệm.

4. Những đóng góp mới của luận án

1) Là nghiên cứu đầu tiên xây dựng được cơ sở dữ liệu metagenome khu hệ vi khuẩn đường ruột ở người bị bệnh tiểu đường type 2 và người không tiểu đường ở Việt Nam.

2) Đánh giá đặc tính sinh học của một số chủng *Lactobacillus* phân lập từ mẫu phân của người bị bệnh tiểu đường Việt Nam. Thử nghiệm chủng *Lactobacillus plantarum* 16 trên động vật thí nghiệm để đánh giá khả năng tăng tiết GLP-1 giúp hỗ trợ hạ đường huyết.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Kết quả của luận án góp phần bổ sung cơ sở khoa học và thực tiễn về sự thay đổi khu hệ vi khuẩn đường ruột ở người mắc bệnh tiểu đường type 2, tìm kiếm và đưa ra

chủng vi khuẩn có tiềm năng trong điều trị bệnh tiểu đường.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Tiểu đường là nhóm những rối loạn không đồng nhất gồm tăng đường máu và rối loạn dung nạp glucose do thiếu insulin, do giảm tác dụng của insulin hoặc cả hai. Tiểu đường type 2 đặc trưng bởi kháng và thiếu insulin, một trong hai rối loạn này có thể xuất hiện ở thời điểm có triệu chứng lâm sàng bệnh tiểu đường. Bệnh tiểu đường type 2 là một bất thường chuyển hóa mãn tính với tăng đường huyết lúc đói, thiếu insulin do giảm tiết insulin từ tế bào β tuyến tụy. Kháng insulin hoặc không đáp ứng là do tế bào β không nhận biết mức độ insulin bình thường, đặc biệt là trong các mô gan và cơ. Các cơ chế quan trọng khác có thể có liên quan đến bệnh tiểu đường type 2 là do thiếu hụt hoặc không đáp ứng hormone incretin, tăng dị hóa lipid, tăng glucagon trong máu, giữ nước và muối cao hơn và các bất thường chuyển hóa khác. Hệ vi sinh vật đường ruột ở người là một cộng đồng vi sinh vật với khoảng 10^{11} sinh vật trên mỗi gram phân với hơn 1000 loài, hầu hết trong số đó là vi khuẩn kỵ khí bắt buộc, với tổng kích thước gen lớn hơn gấp 150 lần so với gen của người. Các chức năng cơ bản của hệ vi sinh vật đường ruột là: (1) chức năng bảo vệ niêm mạc ruột bao gồm ngăn ngừa các bệnh nhiễm trùng niêm mạc bằng cách ức chế các tác nhân gây bệnh xâm nhập và duy trì một hàng rào ruột nguyên vẹn; (2) chức năng trao đổi chất bao gồm nội cân bằng năng lượng, tiêu hóa và tích lũy sinh học các chất dinh dưỡng, hỗ trợ chuyển hóa chất béo, lên men carbohydrate không tiêu hóa được, đồng thời sản xuất các acid béo chuỗi ngắn; (3) chức năng điều hòa miễn dịch bao gồm điều hòa thần kinh ruột, duy trì nội cân bằng biểu mô đường ruột và điều hòa miễn dịch ở niêm mạc, trong đó hệ vi sinh vật hoạt động như một nguồn kích thích miễn dịch quan trọng. Nhiều bằng chứng cho thấy rằng, ở người sự gia tăng chất béo trong chế độ ăn uống làm giảm số lượng vi khuẩn *Lactobacillus* và gây ra sự gia tăng vi khuẩn Gram âm. Các nghiên cứu cũng cho thấy ở người béo phì có lượng *Lactobacillus reuteri* cao, trong khi đó các loài như *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* và *Lactobacillus plantarum* có tỷ lệ thấp hơn.

Một số nghiên cứu cho thấy ở những người kháng insulin thì khả năng vận chuyển acid amin chuỗi nhánh (BCAA) của máu vào các tế bào giảm. BCAA có thể giúp duy trì lượng đường trong máu ở mức độ bình thường, ngoài ra còn giúp cơ thể tăng tiết insulin. Nguồn BCAA cung cấp cho cơ thể có thể được lấy từ thức ăn hoặc do vi sinh vật tổng hợp. Một số loài vi khuẩn được coi là “nhà sản xuất” BCAA đó là *Prevotella*

copri và *Bacteroides vulgatus*. Đây là nguồn BCAA rất quan trọng giúp làm giảm khả năng kháng insulin của cơ thể.

Kỹ thuật metagenomics là sự kết hợp giữa sinh học phân tử với tin sinh học để nghiên cứu một cách có hệ thống quần xã vi sinh vật cũng như toàn bộ vật liệu di truyền có trong mẫu môi trường nghiên cứu. Bằng các công cụ tin sinh học chuyên dụng, sự đa dạng vi sinh vật tới mức loài, đa dạng hệ gen chức năng tham gia vào các quá trình trao đổi chất và các con đường trao đổi chất giả định đã được làm sáng tỏ. Những năm gần đây, khi các hệ máy giải trình tự gen thế hệ mới được áp dụng, kỹ thuật metagenomics đã được sử dụng rất hiệu quả để nghiên cứu thành phần loài, đa dạng vi sinh vật từ nhiều môi trường khác nhau như đất, nước, các hệ tiêu hóa... cũng như phân tích sự tương tác của các vi sinh vật trong các môi trường như đất, nước, hệ tiêu hóa của người và nhiều đối tượng động vật.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Hóa chất, bộ kit sinh phẩm

Hóa chất dùng để tách chiết DNA và đọc trình tự là: PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio, Mỹ), QIAamp DNA Sool Mini Kit (Qiagen, Đức), RevertAid First Strand cDNA (Thermo Fisher Scientific Inc, Singapore), TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, Mỹ), agarose (Sigma-Aldrich, Mỹ), ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Mỹ).

Hóa chất dùng nuôi cấy vi sinh vật: Nước muối sinh lý NaCl 0,9%, hóa chất nhuộm Gram (gentitans, lugol, fucshin, glycerol), muối mật oxgall (Sigma-Aldrich, Mỹ), glycocholate, taurocholate, glycodeoxycholate, taurodeoxycholate...

Hóa chất dùng trong định danh vi khuẩn

Đệm tách: NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM (pH=8), EDTA 100 mM (pH=8), SDS 0,5% w/v; thành phần hỗn hợp PCI bao gồm phenol: chloroform: isopropanol với tỷ lệ 25: 24 :1; thành phần TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM.

Dung dịch cho điện di: Tris base: 121 g, CH₃COOH: 28,6 g, EDTA 0,5M (pH 8,0) 50 mL, H₂O 500 mL; thành phần gel agarose 1%: agarose 1g, đệm TAE 1X 100 mL.

Thành phần phản ứng PCR: H₂O 8,5 µL, Master Mix 12,5 µL, mỗi xuôi 1 µL (10 pmol), mỗi ngược 1 µL (10 pmol), DNA khuôn 2 µL (200 ng).

Các hóa chất dùng trong định danh vi khuẩn của hãng ThermoFisher Scientific.

Hóa chất dùng cho định lượng glucagon like peptide-1

Streptozotocin và sitagliptin (Sigma-Aldrich, Mỹ), kit ELISA mua từ RayBio® (BioAssay Systems).

2.1.2. Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm

Các thiết bị và dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu gồm: Máy Agilent Bioanalyzer 2100 system (Aligent, Mỹ), máy li tâm Sorvall RT 1900W (Đức); nồi khử trùng HA-240MIV (Hirayama, Nhật Bản); máy đo pH (Toledo, Đức); máy PCR Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Mỹ) và PCR-9700 (Applied Biosystem, Mỹ); máy đọc trình tự tự động Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); máy đọc trình tự Illumina Hiseq 2500 (Illumina, Mỹ); pipetteman các loại (Eppendorf, Đức); màng lọc polycarbonate membranes 0,8 và 0,22 μm (Milipore, Ireland), bể ổn nhiệt WNB14 (Mettler, Đức) và một số dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm.

Máy chủ tính toán hiệu năng cao với bộ vi xử lý gồm 24 CPU Intel(R) Xeon(R) CPU X5650 @2.67GHz, dung lượng RAM là 188GB, dung lượng lưu trữ là 8TB và được cấu hình trên hệ điều hành Ubuntu phiên bản 15.04 Vivid với các phần mềm tin sinh học và thống kê mới nhất.

Máy đo đường huyết Accu check one touch glucometer (Johnson & Johnson, Mumbai, Ấn Độ).

2.1.3. Các chủng vi sinh vật kiểm định

Các chủng vi sinh vật *Staphylococcus aureus* ATCC13709 và *Escherichia coli* ATCC 11105.

2.1.4. Môi trường phân lập, nuôi cấy vi sinh vật

Môi trường MRS nuôi cấy và phân lập vi khuẩn lactic; môi trường LB (g/L) nuôi vi khuẩn kiểm định (*E. coli* và *S. aureus*).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lựa chọn người tham gia nghiên cứu

Người mắc bệnh tiểu đường type 2: Bệnh nhân đã mắc bệnh ít nhất là 5 năm, có chỉ số glucose máu tăng cao được xác định bằng xét nghiệm dung nạp glucose đường uống lúc đói (OGTT); các chỉ số cholesterol, LDL-C, HDL-C, triglyceride, AST, ALT nằm ngoài khoảng giá trị thông thường và chỉ số khối cơ thể lớn hơn 30.

Nhóm đối chứng (người không tiểu đường): có chỉ số glucose máu, cholesterol, LDL-C, HDL-C, triglyceride, AST và ALT nằm trong khoảng giá trị thông thường, chỉ số khối cơ thể nhỏ hơn 23.

2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu phân

Các mẫu phân của bệnh nhân tiểu đường type 2 (nữ, từ D1-D7; nam, từ D8-D10) và nhóm đối chứng (nữ, từ C1-C7; nam, từ C8-C10) cùng với số liệu về chỉ số glucose máu, cholesterol tổng số, HDL-C, LDL-C, triglyceride, AST, ALT và chỉ số khối cơ thể (BMI) được cung cấp bởi Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Giao thông vận tải Trung ương. Mẫu phân được thu từ những người sống ở khu vực Hà Nội trên 5 năm, và để trong hộp vô trùng. Mẫu sau đó được giữ lạnh ở 4°C và chuyển ngay đến phòng thí nghiệm để phân tích.

2.2.3. Phương pháp tách chiết DNA vi sinh vật từ mẫu phân

Khoảng 200 mg phân sẽ được chuyển vào ống Zirco - prep loại nhỏ trong đó có chứa các hạt giúp nghiền nát mẫu trước khi dung dịch tách chiết ADN được thêm vào. Tiến hành tách chiết DNA bằng bộ kit QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ tinh sạch và nồng độ DNA sau khi tách được kiểm tra bằng điện di trên agarose 1% và định lượng bằng máy Nanodrop lite (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

2.2.4. Phương pháp giải và phân tích trình tự DNA vùng V3-V4 gen 16S rRNA

2.2.4.1. Giải trình tự DNA gen 16S rRNA từ DNA metagenome

Sau khi tách được DNA tổng số, các mẫu DNA này được sử dụng làm khuôn để giải trình tự gen 16S rRNA. Vùng V3-V4 gen 16S rRNA được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu, mồi xuôi 341F và mồi ngược 806R có gắn 6 nucleotide ở đầu 5' cho phép phân tích các mẫu đồng thời. Sau đó, sản phẩm PCR được gửi cho công ty First Base (Malaysia) để đọc trình tự. Thư viện giải trình tự được chuẩn bị bằng bộ kit TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation (Illumina, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chất lượng thư viện được đánh giá bằng máy Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent, Mỹ). Sau đó, thư viện được giải trình tự trên máy Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Mỹ) để tạo ra các đoạn đọc paired-end 250 bp.

2.2.4.2. Phân tích dữ liệu giải trình tự DNA metagenome

Xử lý trình tự: Các đoạn đọc trình tự paired-end trên máy Illumina HiSeq 2500 có kích thước khoảng 250 bp.

Xác định vị trí phân loại: Để xác định vị trí phân loại, các read tinh sạch sau khi xử lý được phân tích bằng phần mềm Uparse, những read có độ tương đồng trên 97% sẽ được nhóm vào một đơn vị phân loại chức năng (OTU).

Phân tích đa dạng và hiển thị hóa: Nghiên cứu đa dạng hệ vi sinh vật (alpha

diversity) được thực hiện dựa trên xác định một số chỉ số cơ bản, trong đó quan trọng nhất là các chỉ số Shannon, Simpson, ACE và Chao1.

Phương pháp tọa độ (ordination) được sử dụng để mô tả mối quan hệ giữa các kiểu thành phần loài và biến thiên môi trường cơ bản, sử dụng phổ biến trong các phân tích thống kê với những bộ dữ liệu lớn (big data).

Phân tích tọa độ chính (PCoA) để đánh giá sự khác biệt trong các mẫu hệ vi khuẩn đường ruột, các OTU vi khuẩn ở mức độ chi đã được gắn vào ma trận PCoA thay vì PCA, sử dụng phần mềm R phiên bản 2.15.3.

Số lượng các đơn vị phân loại (OTUs) có mức độ tương đồng lần lượt 97%, 95% và 90% được sử dụng để xây dựng đường cong rarefaction.

2.2.5. Phân lập chủng *Lactobacillus*, xác định đặc tính sinh học và đặc tính kháng khuẩn

*2.2.5.1. Phương pháp phân lập và làm thuần vi khuẩn *Lactobacillus**

Môi trường MRS agar có bổ sung 0,5% CaCO₃ nhằm phân biệt vi khuẩn lactic với các nhóm vi khuẩn khác và đồng thời sử dụng 0,01% (w/v) sodium azide ức chế nhóm vi khuẩn Gram âm. Vi khuẩn lactic được xác định bởi vòng tan CaCO₃ xung quanh khuẩn lạc nhờ sự xuất hiện của acid lactic.

Vi khuẩn sẽ được làm thuần bằng cách cấy ria trên môi trường MRS cho tới khi quan sát thấy chỉ có một dạng khuẩn lạc duy nhất trên môi trường.

*2.2.5.2. Phương pháp xác định đặc tính sinh học của *Lactobacillus**

Xác định khả năng kháng khuẩn.

Xác định khả năng chịu axit.

Xác định khả năng chịu muối mật.

2.2.5.3. Xác định khả năng ức chế sinh trưởng trên vi khuẩn gây bệnh

Xác định khả năng ức chế vi khuẩn *S. aureus*.

Xác định khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli*.

2.2.5.4. Định danh loài dựa trên giải trình tự gen 16S rRNA

Để định danh vi khuẩn, tiến hành như sau:

Tách DNA tổng số vi khuẩn

Phản ứng PCR

Tinh sạch sản phẩm PCR

Giải trình tự 16S rRNA

Kết quả giải trình tự được xử lý với phần mềm BioEdit. Cây phát sinh chủng loài

được hình thành từ phần mềm Mega X.

2.2.6. Thử nghiệm khả năng cải thiện glucagon like peptide-1 trên chuột của chủng *Lactobacillus*

2.2.6.1. Xử lý chuột thí nghiệm

Chuột được nuôi nhốt 3-4 con/chuồng và được làm quen với điều kiện phòng nuôi trong một tuần trước khi bắt đầu thí nghiệm. Phòng nuôi được duy trì với chu kỳ ánh sáng là 12 giờ, tối là 12 giờ, nhiệt độ nuôi $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm $55 \pm 5\%$.

2.2.6.2. Khởi phát bệnh tiểu đường trên chuột

Bệnh tiểu đường trên chuột được gây ra bằng một liều dung dịch streptozotocin (50 mg/kg thể trọng) trong dung dịch đệm natri citrat 0,1 M vô trùng (pH = 4,5) cho chuột đã được nhịn đói qua đêm. Nồng độ glucose huyết thanh lớn hơn 250 mg/mL được coi là chuột bị tiểu đường.

2.2.6.3. Chuẩn bị và định lượng *Lactobacillus*

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus* nuôi trong dịch MRS và được ủ ở 37°C trong hệ thống kỵ khí Mark II (Anaero Gas Pack, LE002. HiMedia, India) 48 giờ. Sau thời gian ủ, 1 mL dung dịch nuôi cấy được pha loãng là 10^7 CFU/mL. Liều *Lactobacillus* được chuẩn bị mới hàng ngày và được dùng cho động vật điều trị trong 4 tuần.

2.2.6.4. Thiết kế thí nghiệm

Chuột được chia thành bốn nhóm thí nghiệm, mỗi nhóm 6 con ($n = 6$).

Thuốc và liều vi khuẩn được dùng qua đường uống bằng kim bơm ngày một lần, liên tục trong 4 tuần.

2.2.5.5. Kiểm tra khả năng dung nạp đường sucrose

Chuột được nhịn ăn qua đêm và sử dụng đường sucrose (2 g/kg thể trọng) bằng đường uống, lượng đường được hòa tan trong 1 mL nước cất. Các mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch đuôi ở 0, 30, 60, 90 và 120 phút sau khi uống sucrose, xác định mức đường huyết bằng máy đo đường huyết.

2.2.5.6. Đo GLP-1 trong huyết thanh

Vào ngày thứ 28, những con chuột cho sử dụng đường sucrose ở trên được lấy mẫu máu ở 0, 20, 30, 40, 50 và 60 phút từ tĩnh mạch đuôi. Việc định lượng GLP-1 thực hiện bằng bộ kit ELISA chuột. Sau khi lấy máu từ tĩnh mạch đuôi, những con chuột được gây mê nhẹ bằng ether và thu nhận máu từ tim. Huyết thanh chuột được phân lập bằng cách ly tâm mẫu máu ở 3000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và được bảo quản trong nhiệt độ -80°C cho đến khi phân tích.

2.2.6. Thống kê phân tích số liệu

Các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel theo phương pháp t-test và IBM SPSS Statistics 22 với giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá sự sai khác khu hệ vi khuẩn đường ruột của các đối tượng nghiên cứu

3.1.1. Kết quả tách DNA metagenome vi khuẩn đường ruột

Bộ KIT DNA QIAamp cung cấp kit tinh sạch (dựa vào màng silic - với sự có mặt của các chất ức chế PCR) lên đến 30 μ g DNA từ mẫu phân của các đối tượng nghiên cứu. Hoạt động kết hợp của InhibitEX, một loại nhựa hấp phụ duy nhất, với dung dịch đệm tối ưu làm loại bỏ chất ức chế PCR.

Kết quả thu được cho thấy, ảnh điện di DNA của các mẫu đều rõ nét, thể hiện chất lượng và hàm lượng DNA tổng số khá tốt. Kết quả này chứng tỏ việc tách chiết DNA tổng số đã thành công.

Độ tinh sạch của DNA tổng số được xác định bằng máy Nanodrop lite thông qua tỷ lệ độ hấp thụ tại các bước sóng 260/280 nm. Độ tinh sạch của các mẫu đều rất tốt, nằm trong khoảng từ 1,77-2,06. Kết quả trên chứng tỏ DNA được tách chiết có hàm lượng và chất lượng tốt, các mẫu DNA đạt tiêu chuẩn cho giải trình tự gen thế hệ mới trên hệ máy Illumina.

3.1.2. Chỉ số đa dạng khu hệ vi khuẩn đường ruột

3.1.2.1. Kết quả phân tích đa dạng khu hệ vi khuẩn đường ruột ở nhóm nữ giới

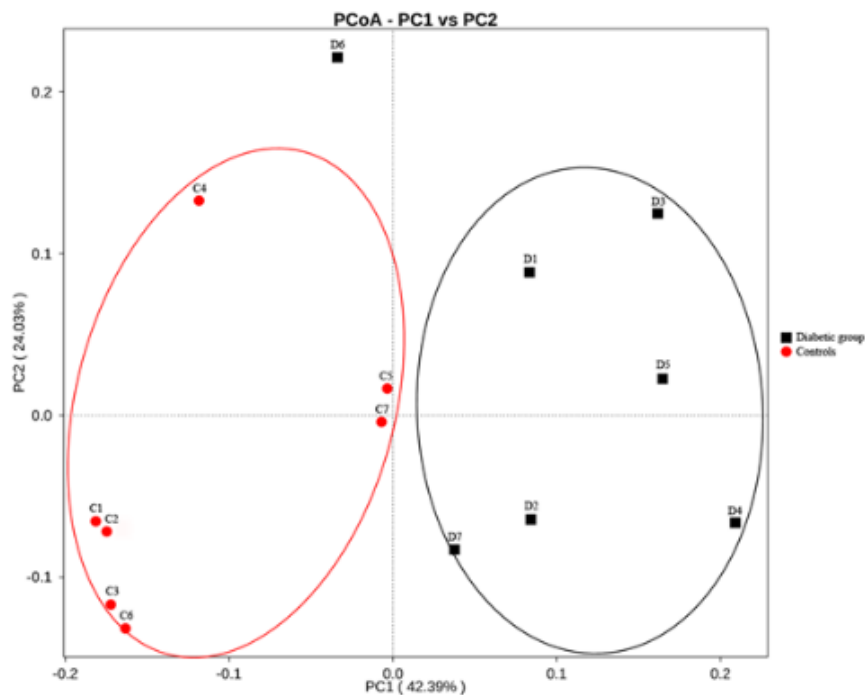
Kết quả tính toán các chỉ số đa dạng sinh học: Trong tổng số 1.627.646 trình tự có độ tin cậy cao, có 99,9378% thuộc về nhóm vi khuẩn (Bacteria) và 0,0602 thuộc về các nhóm vi khuẩn cổ (Archaea). Phần còn lại chiếm 0,002% là dữ liệu thuộc các nhóm vi sinh vật khác (Others). Hai nhóm mẫu đọc trình tự bao gồm mẫu phân của những người không mắc bệnh tiểu đường (từ C1-C7) và mẫu phân của những người bị bệnh tiểu đường type 2 (từ D1-D7). Các trình tự được sắp xếp vào OTU với 97% tương đồng. Kết quả cho thấy, số lượng OTU của mẫu đối chứng từ 204-367, trung bình là 288 (độ lệch chuẩn SD 62,796) và ở mẫu mắc bệnh tiểu đường type 2 từ 175-287, trung bình là 214 (độ lệch chuẩn SD 42,146). Kết quả này cho thấy mẫu đối chứng có số lượng OTU phong phú hơn. Chỉ số Good coverage ở các mẫu đều $> 0,994$ cho thấy các OTU ở các mẫu đều đại diện cho các loài có trong mẫu. Giá trị

ước lượng số loài còn được thể hiện bởi các giá trị ACE và Chao1. Kết quả phân tích alpha diversity cho thấy giá trị ACE và Chao1 của các mẫu tỷ lệ thuận với giá trị OTUs ($P < 0,01$). Trong tất cả các mẫu, giá trị ACE và Chao1 luôn cao hơn giá trị OTUs, điều này có nghĩa nếu số lượng các trình tự tăng lên thì số lượng các loài được dự đoán sẽ tăng lên. Kết quả trong phân tích alpha diversity cũng chỉ ra rằng sự khác nhau về giá trị Shannon và Simpson là đáng kể. Giá trị cao nhất của Shannon và Simpson từ phân của nhóm đối chứng (6,419 và 0,977 tương ứng), giá trị thấp nhất (4,819 và 0,874 tương ứng). Trong khi đó, giá trị Shannon và Simpson cao nhất từ phân của nhóm tiểu đường type 2 (5,193 và 0,936 tương ứng), giá trị thấp nhất (3,495 và 0,758 tương ứng).

Kết quả phân tích so sánh các chỉ số đa dạng sinh học:

Kết quả phân tích rarefaction cho thấy, độ phủ dữ liệu của các OTU vi sinh vật chưa đủ. Hệ vi sinh vật ở nhóm bị bệnh tiểu đường type 2 có xu hướng kém đa dạng hơn nhóm đối chứng.

Phân tích thành phần chính dựa trên các chỉ số đa dạng sinh học (Hình 3.5) cho thấy, thành phần vi khuẩn trong phân của nhóm bệnh tiểu đường type 2 (hình vuông màu đen) và nhóm đối chứng (hình tròn màu đỏ) có xu hướng phân thành các nhóm khác nhau. Kết quả này cho thấy thành phần hệ vi sinh vật đường ruột của nhóm đối chứng có sự tương đồng cao hơn so với nhóm bị bệnh tiểu đường type 2.



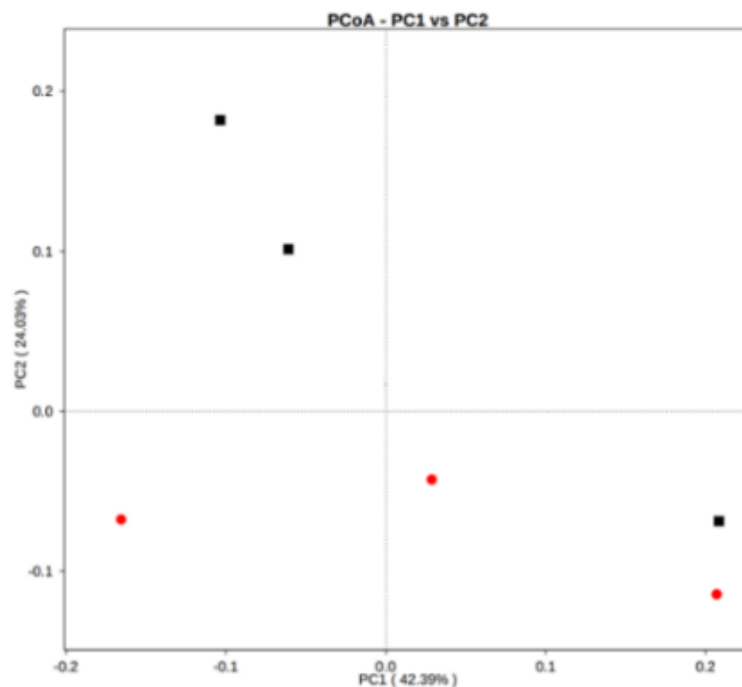
Hình 3.5. Kết quả phân tích tọa độ chính (PCoA) ở các mẫu phân của nữ giới mắc bệnh tiểu đường type 2 và nữ giới không mắc bệnh tiểu đường

3.1.2.2. Kết quả phân tích đa dạng khu hệ vi khuẩn đường ruột ở nhóm nam giới

Kết quả tính toán các chỉ số đa dạng sinh học: phân tích trình tự cho thấy, tổng số 559.756 trình tự có độ tin cậy cao, trong đó 99,9883% thuộc về các nhóm vi khuẩn (Bacteria) và phần còn lại chiếm 0,0117% thuộc về nhóm vi khuẩn cổ (Archaea). Sáu tập mẫu đọc trình tự bao gồm 3 mẫu phân của nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2 (D8, D9, D10) chứa lần lượt 31.369, 125.250, 121.284 trình tự và 3 mẫu phân của nam giới không tiểu đường (C8, C9, C10) chứa lần lượt 23.932, 126.976, 130.945 trình tự. Chỉ số Good coverage ở các mẫu đều > 0,995 cho thấy các OTU ở các mẫu đều đại diện cho các loài có trong mẫu.

Kết quả phân tích so sánh các chỉ số đa dạng sinh học: phân tích rarefaction cho thấy các đường cong chưa đạt đến trạng thái bão hòa trong các mẫu nghiên cứu nên sự phong phú của vi khuẩn chưa được xác định đầy đủ. Hệ vi sinh vật ở nhóm nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2 có xu hướng đa dạng hơn nhóm đối chứng.

Phân tích thành phần chính (Principal coordinate analysis - PCoA)



Hình 3.9. Kết quả phân tích tọa độ chính (PCoA) ở các mẫu phân của nam giới

Phân tích thành phần chính (Principal coordinate analysis - PCoA) dựa trên các chỉ số đa dạng sinh học (Hình 3.9) cho thấy, thành phần vi khuẩn trong phân của nhóm nam giới mắc bệnh tiểu đường (hình vuông màu đen) và nhóm đối chứng (hình tròn màu đỏ) có xu hướng phân thành các nhóm khác nhau. Nói cách khác, có sự khác biệt các quần thể vi sinh vật từ nhóm nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2 (diabetes

group) và nhóm đối chứng (control). Thành phần hệ vi sinh vật đường ruột của nhóm đối chứng có sự tương đồng cao hơn so với nhóm bị bệnh tiểu đường type 2. Sự cân bằng vi sinh vật thường tồn tại ở người không tiểu đường và bị phá vỡ sự ổn định ở nhóm mắc bệnh tiểu đường type 2.

3.1.3. Thành phần loài vi khuẩn

Mặc dù các kết quả nghiên cứu khu hệ vi khuẩn đường ruột là không nhất quán, nhưng giới tính có thể mang đến sự khác biệt về thành phần loài khu hệ vi khuẩn đường ruột. Vì vậy, chúng tôi phân tích kết quả theo 2 giới riêng biệt.

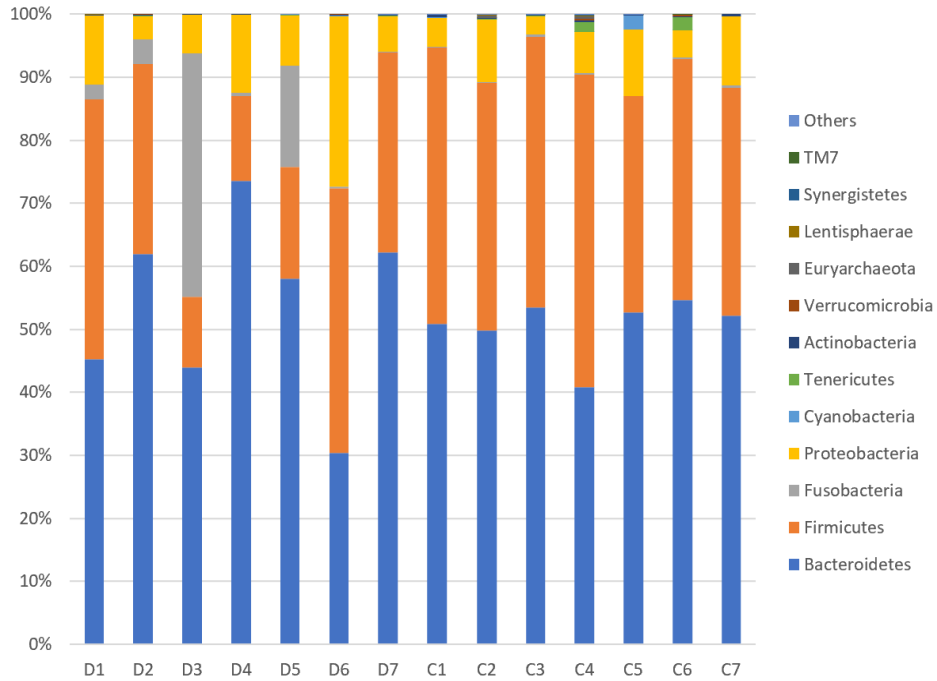
3.1.3.1. Kết quả phân tích thành phần loài ở nhóm nữ giới

Kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy, số lượng trình tự đọc của hai nhóm gồm 13 ngành chính. Các OTU vi khuẩn tập trung ở bốn ngành chính và chiếm > 98,56% tổng số OTU xác định được, đó là Bacteroidetes (30,42%-73,58%), Firmicutes (11,25%-49,58%), Proteobacteria (2,97%-27,05%) và Fusobacteria (0%-38,49%).

Trong số 4 ngành chiếm ưu thế, chỉ duy nhất sự khác biệt của ngành Firmicutes là có ý nghĩa thống kê. Bên cạnh đó, 2 ngành còn lại, như Synergistetes và các vi sinh vật khác (Others), sự khác biệt giữa 2 nhóm nghiên cứu cũng có ý nghĩa thống kê với p lần lượt là 0.042 và 0.047.

Kết quả trên cho thấy đặc trưng của các ngành vi khuẩn trong phân. Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy bệnh tiểu đường loại 2 có liên quan đến những thay đổi về thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột chủ yếu rõ ràng ở cấp độ ngành. Sự phong phú của Firmicutes bị giảm đi đáng kể, trong khi tỷ lệ Bacteroidetes, Proteobacteria và Fusobacteria ở những người mắc bệnh tiểu đường có xu hướng cao hơn so với những người không mắc bệnh tiểu đường. Những kết quả này tương tự với công bố của Larsen và cộng sự. Những phát hiện của chúng tôi ủng hộ giả thuyết rằng sự thay đổi về vi khuẩn đường ruột và tình trạng rối loạn vi khuẩn có liên quan đến bệnh tiểu đường type 2

Hệ vi khuẩn đường ruột của con người có thể khác nhau giữa các dân tộc. Tùy đối tượng người nghiên cứu khác nhau sẽ có đặc thù riêng về các ngành vi khuẩn ưu thế trong đường tiêu hóa. Khi tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes < 0,8 chúng tỏ cơ thể bị rối loạn vi khuẩn đường ruột. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chỉ số Firmicutes/Bacteroidetes ở nhóm người tiểu đường type 2 là 0,49, điều này chứng tỏ vi khuẩn thuộc ngành Firmicutes giảm và vi khuẩn thuộc ngành Bacteroides tăng.



Hình 3.10. Độ phong phú tương đối ở mức độ ngành của hệ vi sinh vật trong phân 7 nữ giới tiểu đường type 2 (D1-D7) và 7 nữ giới không tiểu đường (C1-C7)

Khi nghiên cứu thành phần vi sinh vật ở mức độ chi chúng tôi thấy trong tổng số 94 chi được tìm thấy chỉ 9 chi có sự khác biệt thành phần vi sinh vật giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chi *Bacteroides* tăng mạnh ở nhóm bệnh tiểu đường type 2 (47,93%) so với nhóm đối chứng (22,9%). Qua tìm hiểu của 8 nghiên cứu được thực hiện thì 5 nghiên cứu có kết quả *Bacteroides* tăng cao ở người tiểu đường type 2. Đối với chi *Prevotella*, ở người tiểu đường type 2 giảm so với đối chứng (0,85% so với 21,48%). Tác dụng của vi khuẩn này phụ thuộc vào chủng vì một số chủng *Prevotella* trong ruột cải thiện quá trình chuyển hóa glucose nhưng một số chủng khác lại thúc đẩy các bệnh như hội chứng chuyển hóa và béo phì.

Chi *Ruminococcus* và *Desulfovibrio* giảm ở nhóm bệnh tiểu đường type 2 so với nhóm đối chứng, sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê ($p = 0,001$ và $0,003$ tương ứng). Tương tự nghiên cứu của Singh và cộng sự, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, có sự suy giảm của vi khuẩn sản xuất butyrate như *Clostridium*, *Faecalibacterium* và *Roseburia*. Đây cũng là đặc điểm chung được ghi nhận ở hệ vi sinh vật của người mắc bệnh tiểu đường type 2.

Ngoài ra, nhóm người tiểu đường type 2 chứa nhiều vi khuẩn mầm bệnh cơ hội thuộc chi *Escherichia*, chứa ít chi vi khuẩn sản xuất butyrate (*Faecalibacterium*, *Roseburia*) và chi vi khuẩn phân giải chất nhầy (*Akkermansia*). Kết quả của chúng tôi trùng với một số kết quả nghiên cứu trước đây, đặc biệt là nghiên cứu của Murri và cộng sự

Trong tất cả các loài được phân tích, so sánh thì 04 loài có sự khác biệt và có ý nghĩa thống kê đó là *P. copri*, *P. distasonis*, *R. callidus*, *C. citroniae*. Các chủng *P. copri* có khả năng phân giải nhiều hydratcarbon phức tạp, tổng hợp nhiều SCFA giúp tăng cường sức khỏe. Phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy *P. copri* có khả năng tăng cường dự trữ glycogen ở gan và để sản xuất succinate, phân tử chịu trách nhiệm cân bằng nội môi glucose thông qua việc điều chỉnh quá trình tạo gluconeogenesis ở ruột, giúp cải thiện khả năng dung nạp glucose. *P. copri* còn kích thích tổng hợp các cytokine như IL-6, IL-17 giúp giảm viêm. Tuy nhiên, những kết quả nghiên cứu khác nhau về vai trò của chúng đối với sức khỏe con người còn đang gây tranh cãi. Chính vì vậy, cần được nghiên cứu sâu hơn để xác định vai trò của vi khuẩn này đối với sức khỏe con người, đặc biệt đối với bệnh tiểu đường type 2.

Trong nghiên cứu này, *P. distasonis* có sự gia tăng ở nhóm người tiểu đường. *P. distasonis* là một trong những thành viên chính có chức năng sinh lý quan trọng đối với con người. Không giống với phát hiện của chúng tôi, nghiên cứu đã công bố cho thấy, sự phong phú của *P. distasonis* giảm đi khi ăn chế độ ăn giàu chất béo. Do vậy, ở những bệnh nhân béo phì, gan nhiễm mỡ, số lượng *P. distasonis* lại tương đối thấp. Hơn nữa, khi bổ sung *P. distasonis* làm tăng tổng hợp succinate, giúp duy trì cân bằng nội môi và hỗ trợ cải thiện các rối loạn chuyển hóa.

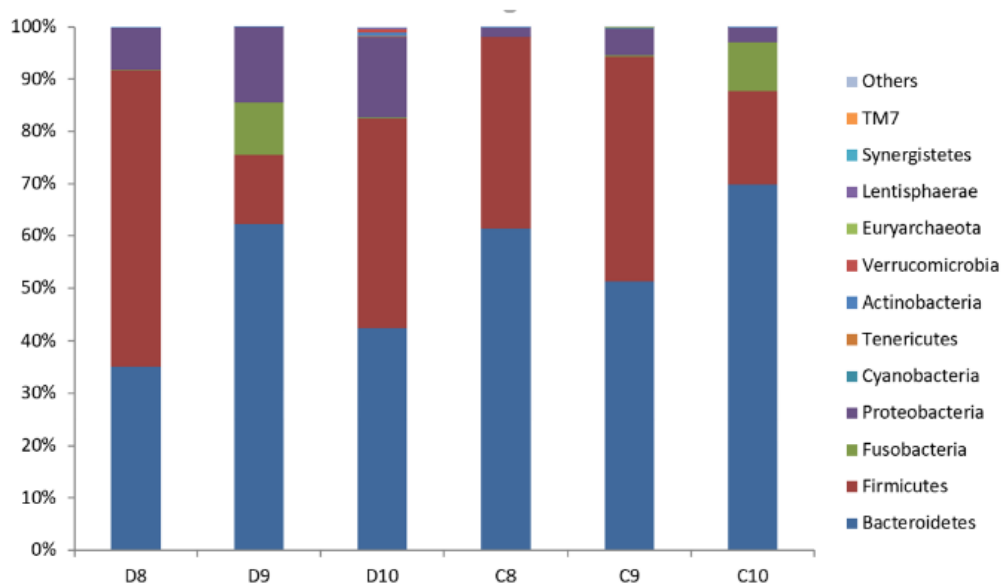
Ngược với *P. distasonis*, loài *Ruminococcus callidus* lại suy giảm ở nhóm bệnh tiểu đường type 2. Những nghiên cứu trước cho thấy, ở người gầy, vi khuẩn này biểu hiện phong phú trong đường ruột và giảm thiểu về số lượng ở người béo phì. Tương tự như vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi, ở nhóm tiểu đường type 2 số lượng vi khuẩn này giảm so với nhóm đối chứng.

C. citroniae gia tăng ở nhóm người tiểu đường type 2. Trong đường tiêu hóa, *C. citroniae* tổng hợp trimethylamine N-oxide (TMAO), một hợp chất có liên quan đến tình trạng viêm mô mỡ và cản trở quá trình truyền tín hiệu insulin ở gan, do vậy làm tăng tính kháng insulin, dẫn đến gia tăng lượng đường trong máu và ảnh hưởng đến người tiểu đường type 2.

3.1.3.2. Kết quả phân tích thành phần loài ở nhóm nam giới

Trong 13 ngành chính, Bacteroidetes chiếm ưu thế cao nhất ở tất cả các mẫu và tỷ lệ trung bình ở nhóm đối chứng là 61,25%, nhóm bị bệnh tiểu đường trung bình 46,60% ($p = 0,21$). Ngành chiếm ưu thế thứ 2 là ngành Firmicutes với tỷ lệ trung bình là 32,47% ở nhóm đối chứng và 36,52% ở nhóm bị bệnh tiểu đường ($p = 0,79$). Ngành chiếm ưu thế tiếp theo là Proteobacteria, cụ thể: ở các mẫu đối chứng là 3,22%, ở

nhóm bị bệnh tiêu đường là 12,58% ($p = 0,02$). Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự phù hợp so với kết quả của các nghiên cứu trước thể hiện qua thành phần 3 ngành chiếm ưu thế là Bacteroidetes, Firmicutes và Proteobacteria.



Hình 3.13. Độ phong phú tương đối ở mức độ ngành của hệ vi sinh vật trong phân 3 nam giới tiêu đường type 2 (D8-D10) và 3 nam giới không tiêu đường (C8-C10)

Khi nghiên cứu cụ thể về độ phong phú của các chi, chúng tôi thấy nhóm người bị bệnh tiêu đường type 2 chứa nhiều vi khuẩn mầm bệnh cơ hội thuộc các chi như *Desulfovibrio*, *Escherichia*; chứa ít chi vi khuẩn sản xuất butyrate (*Faecalibacterium*, *Roseburia*) và chi vi khuẩn phân giải chất nhầy (*Akkermansia*, *Prevotella*). Khi nghiên cứu cụ thể về độ phong phú của các chi, chúng tôi thấy lượng vi sinh vật thuộc chi *Veillonella* ở nhóm đối chứng chiếm 0,08%, ở nhóm bệnh tiêu đường type 2 là 0,39%, sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê ($p = 0,025$).

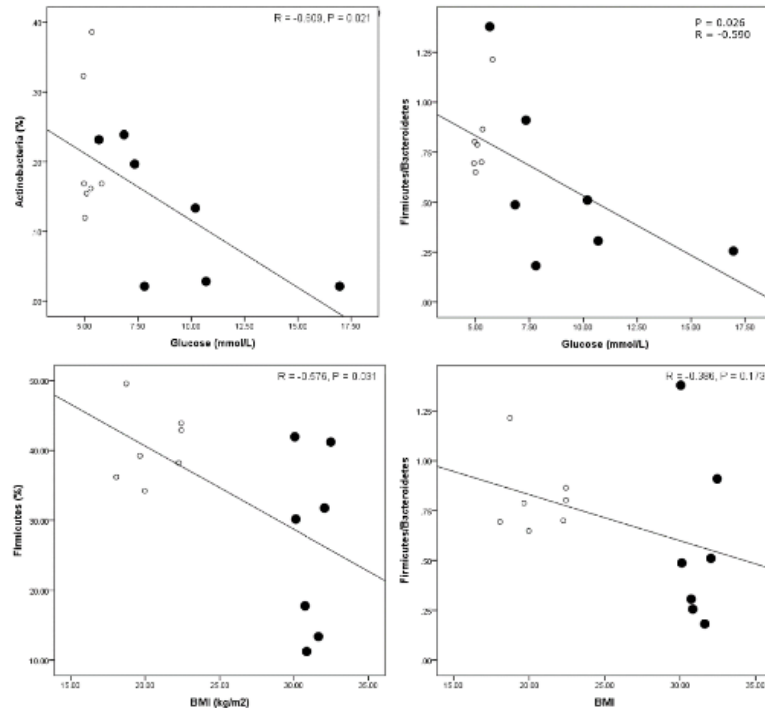
Trong tất cả các loài được phân tích, so sánh thì 02 loài có sự khác biệt và có ý nghĩa thống kê đó là *R. gnavus* và *V. dispar*. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có các nghiên cứu sâu về tác động của các loài này đối với người tiêu đường type 2.

3.2. Mối tương quan của vi khuẩn đường ruột với chỉ số glucose và BMI

3.2.1. Mối tương quan giữa tính đa dạng của vi khuẩn đường ruột với chỉ số glucose và BMI ở nhóm nữ giới

Trong số 13 ngành có 10/13 ngành tương quan nghịch với chỉ số BMI (4 ngành Firmicutes, Lentisphaerae, Synergistetes và Others tương quan có ý nghĩa thống kê), 11/13 ngành tương quan nghịch với chỉ số glucose (chỉ có ngành Actinobacteria tương quan có ý nghĩa thống kê). Đối với 10 ngành có mối tương quan nghịch với BMI thì cũng có tương quan nghịch với chỉ số glucose. Ngành Proteobacteria có tương quan thuận với BMI nhưng tương quan nghịch với glucose. Đối với các ngành

có tương quan thuận với glucose và BMI đều không có ý nghĩa thống kê.



Hình 3.16. Mối tương quan giữa Actinobacteria, Firmicutes/ Bacteroidetes với chỉ số glucose; Firmicutes, Firmicutes/ Bacteroidetes với chỉ số BMI

Ngoài ra, khi phân tích tỷ lệ Firmicutes/ Bacteroidetes với chỉ số glucose thì thấy đây là tương quan nghịch và có ý nghĩa thống kê ($R = -0.590$, $P = 0.026$), tỷ lệ Firmicutes/ Bacteroidetes với chỉ số BMI là tương quan nghịch không có ý nghĩa thống kê ($R = -0.386$, $P = 0.173$).

Nhiều tài liệu đã chỉ ra rằng béo phì có liên quan đến sự phong phú của Firmicutes và Bacteroidetes và tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes. Nghiên cứu của Schwartz và cộng sự cũng cho thấy ở những người bị béo phì có sự suy giảm Firmicutes đáng kể, trong khi Bacteroidetes tăng lên, dẫn đến tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes giảm.

Có 03 chi tương quan nghịch với glucose (*Ruminococcus*, *Butyricimonas*, *Clostridium*) và có ý nghĩa thống kê, 06 chi tương quan nghịch với chỉ số BMI (*Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Odoribacter*, *Desulfovibrio*, *Butyricimonas*, *Burkholderia*) và có ý nghĩa thống kê. Trong số các chi tương quan thuận với chỉ số BMI và glucose, chỉ có chi *Bacteroides* tương quan thuận với chỉ số BMI có ý nghĩa thống kê ($R = 0.577$, $P = 0.031$).

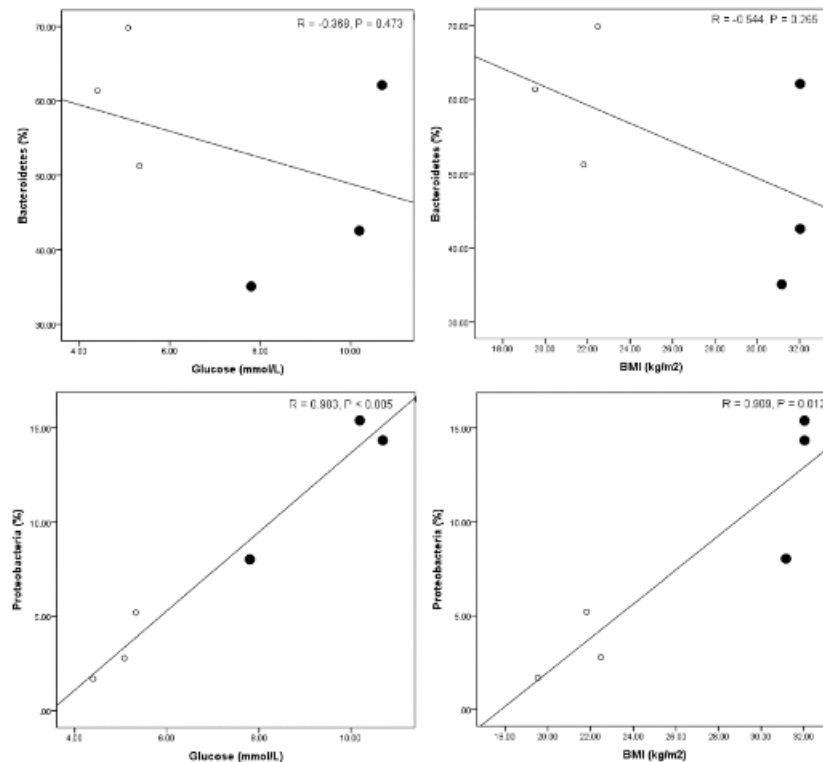
Có 13/19 loài có mối tương quan nghịch với chỉ số glucose, 10/19 loài tương quan nghịch với chỉ số BMI. Trong số các loài có tương quan nghịch này thì 09/19 loài (*P. copri*, *R. callidus*, *F. prausnitzii*, *L. agilis*, *L. zaeae*, *A. muciniphila*, *C. butyricum*, *Ruminococcus biforme*, *Blautia obeum*) có tương quan nghịch với cả 02 chỉ số

glucose và BMI. Tất cả các loài có tương quan nghịch với chỉ số glucose đều không có ý nghĩa thống kê nhưng có 02 loài (*Ruminococcus callidus*, *R. biforme*) tương quan nghịch với chỉ số BMI và có ý nghĩa thống kê. Trong số các loài có tương quan thuận với chỉ số glucose và BMI được phân tích, chỉ có loài *P. distasonis* tương quan thuận và có ý nghĩa thống kê với cả chỉ số glucose và chỉ số BMI.

3.2.2. Mối tương quan giữa tính đa dạng của vi khuẩn đường ruột với chỉ số glucose và BMI ở nhóm nam giới

Có 2/13 ngành có tương quan nghịch với glucose (Firmicutes, Bacteroidetes) và 3/13 ngành (Bacteroidetes, Tenericutes, Euryarchaeota) tương quan nghịch với chỉ số BMI. Các ngành có tương quan nghịch với chỉ số glucose và BMI đều không có ý nghĩa thống kê. Trong các ngành có tương quan thuận với glucose và BMI, tương quan của ngành Proteobacteria với chỉ số glucose và BMI có ý nghĩa thống kê.

Có 6/21 chi (*Prevotella*, *Ruminococcus*, *Odoribacter*, *Burkholderia*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*) có mối tương quan nghịch với 2 chỉ số glucose và BMI nhưng tất cả đều không có ý nghĩa thống kê. Trong 15 chi có mối tương quan thuận với glucose và BMI, chỉ duy nhất chi *Veillonella* tương quan thuận với chỉ số BMI có ý nghĩa thống kê. Đây là chi vi khuẩn kỵ khí gram âm, có thể trở thành mầm bệnh cơ hội khi cơ thể suy giảm hệ miễn dịch.



Hình 3.19. Mối tương quan giữa ngành Bacteroidetes, Proteobacteria với chỉ số glucose và BMI

Có 8/20 loài tương quan nghịch với glucose, 6/20 loài tương quan nghịch với BMI. Tất cả các loài có tương quan nghịch với chỉ số glucose và BMI đều không có ý nghĩa thống kê. Trong số các loài có tương quan thuận với chỉ số glucose và BMI được phân tích thì có 02 loài *Ruminococcus gnavus*, *V. dispar* tương quan thuận và có ý nghĩa thống kê với chỉ số BMI nhưng không có ý nghĩa thống kê với glucose.

Các nghiên cứu thực nghiệm trên chuột cho thấy hầu hết các loài thuộc chi *Lactobacillus* có lợi trên các mô hình của chuột tiểu đường type 2 như *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*. Ngoài ra, một số nghiên cứu trên người cho thấy loài *L. sporogenes*, *L. casei* Shirota, *L. reuteri* được sử dụng như monoprobiotics để cải thiện các triệu chứng liên quan đến tiểu đường type 2. Loài *L. plantarum* cũng được sử dụng nghiên cứu chuyên sâu và cho thấy, *L. plantarum* làm giảm chỉ số glucose trong máu của chuột bị bệnh tiểu đường type 2.

3.3. Đánh giá tiềm năng ứng dụng *Lactobacillus* trong hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường type 2

3.3.1. Phân lập *Lactobacillus* và đánh giá hiệu quả kháng khuẩn

3.3.1.1. Phân lập *Lactobacillus*

Bằng phương pháp phân lập và đếm khuẩn lạc, chúng tôi thu được số lượng chủng *Lactobacillus* ở nhóm người khỏe mạnh là $(3,9 \pm 1.2) \times 10^3$ CFU/g và ở nhóm bệnh tiểu đường type 2 là $(2.7 \pm 0.8) \times 10^3$ CFU/g. Từ những kết quả phân lập vi sinh vật từ mẫu phân của nhóm đối tượng nghiên cứu, đã tuyển chọn được 68 chủng *Lactobacillus* có khuẩn lạc dạng lồi lên, mịn (không nhăn), trắng đục, không màu, rìa trơn hoặc xê thùỳ.

3.3.1.2. Đánh giá hiệu quả kháng khuẩn

Trong 68 chủng *Lactobacillus* được phân lập, đã tuyển chọn được 17 chủng có khả năng kháng cả 2 chủng kiểm định với đường kính vòng kháng khuẩn dao động trong khoảng từ 5,2 đến 20,3 mm. Trong đó, 5/17 chủng *Lactobacillus* có khả năng kháng mạnh cả hai chủng *S. aureus* ATCC13709 và *E. coli* ATCC 11105 với đường kính vòng kháng lớn từ 16,3 mm đến 20,3 mm, đó là các chủng *Lactobacillus* 02, 13, 15, 16, 17.

3.3.2. Xác định các đặc điểm probiotics của *Lactobacillus*

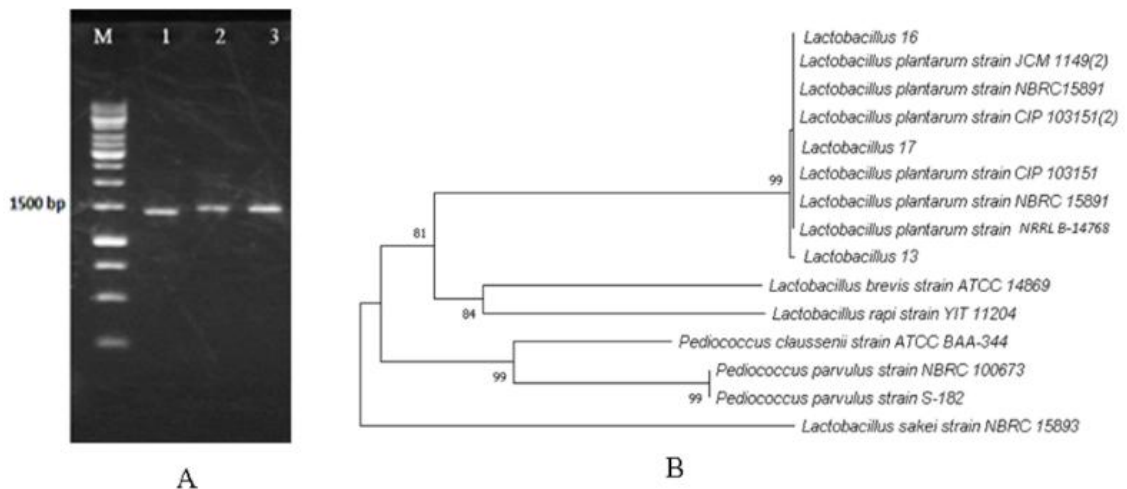
Chủng *Lactobacillus* ức chế tác nhân gây bệnh chỉ có giá trị như một probiotic nếu

chúng có khả năng chịu được pH và muối mật. Trong môi trường pH 2,0 khả năng sống sót của 17 chủng dao động trong khoảng 21 đến 96%. có 8 chủng bao gồm *Lactobacillus* 01, 02, 03, 04, 13, 15, 16, 17 có số tế bào sống sót tương đối cao dao động từ 82 đến 96%. Trong môi trường MRS có bổ sung 0,3% (w/v) muối mật, 16/17 chủng có khả năng sống sót dao động trong khoảng từ 90 đến 97,3% (chủng có số tế bào sống sót cao trên 95% là *Lactobacillus* 04, *Lactobacillus* 09, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 17).

3.3.3. Định danh vi khuẩn *Lactobacillus*

Trong số 17 chủng được nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn, chịu được pH 2 và nồng độ muối mật 0,3%, chúng tôi đã xác định được 3 chủng *Lactobacillus* 17, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 13 hội tụ được cả 3 đặc tính probiotic quý. Kết quả đã chỉ ra cả 3 chủng *Lactobacillus* 13, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 17 đều thuộc về loài *L. plantarum*.

Trong 03 chủng *L. plantarum* 13, *L. plantarum* 16 và *L. plantarum* 17, chúng tôi thấy chủng *L. plantarum* 16 ưu thế hơn 02 chủng còn lại. Vì vậy, trong thí nghiệm tiếp theo chúng tôi sử dụng chủng *L. plantarum* 16.



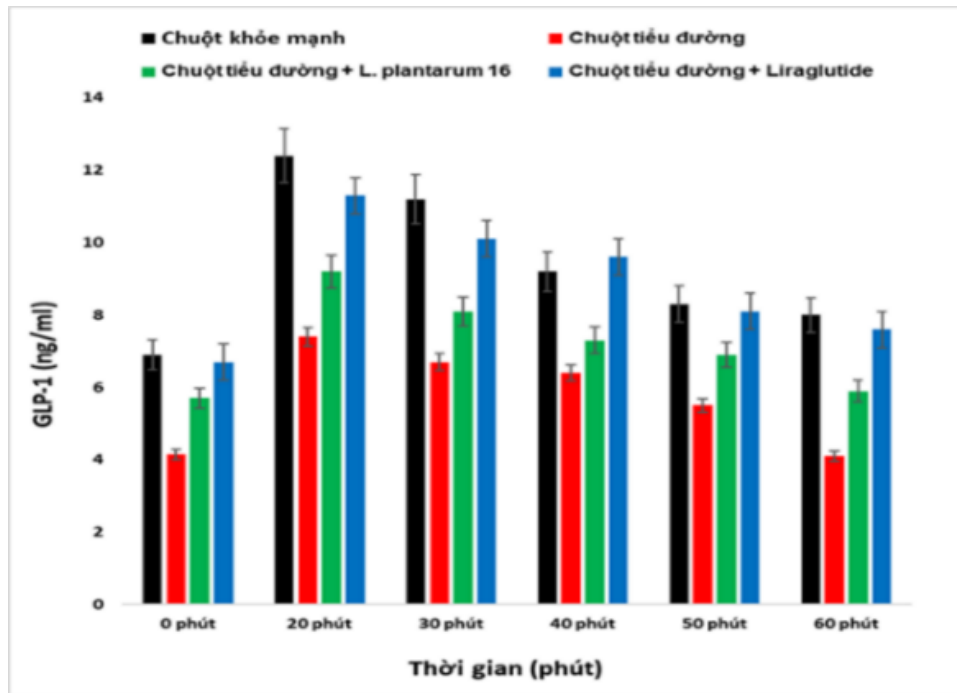
Hình 3.26. A. Sản phẩm PCR của 3 chủng: M: Maker, 1: *Lactobacillus* 13; 2: *Lactobacillus* 16; 3: *Lactobacillus* 17. B. Cây phát sinh chủng loại

3.3.4. Đánh giá hiệu quả tăng tiết GLP-1 và dung nạp sucrose trên chuột của *L. plantarum* 16

3.3.4.1. Hiệu quả tăng tiết GLP-1 trong huyết thanh

Mức GLP-1 giảm đáng kể và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) đã được quan sát thấy ở nhóm chuột bị tiểu đường không được điều trị so với nhóm chuột khỏe mạnh. Bổ sung Liraglutide cho chuột bị tiểu đường, sau 4 tuần điều trị, mức GLP-1 tăng đáng

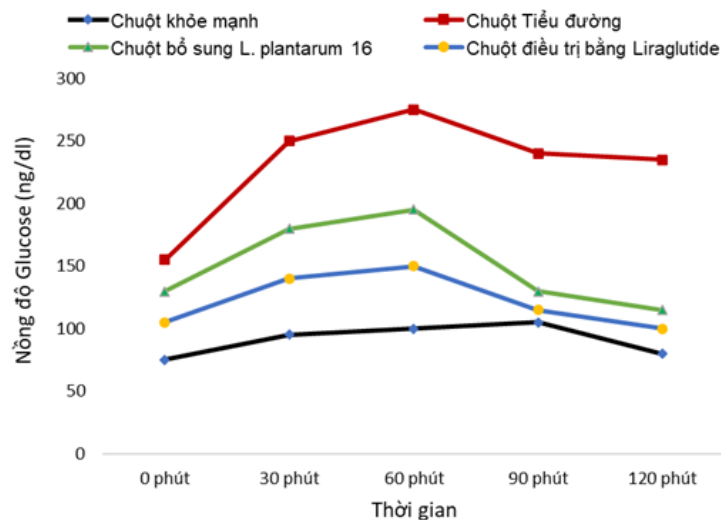
kê ($p < 0,01$). Đặc biệt, khi cho chuột tiểu đường sử dụng *L. plantarum* 16, sau 4 tuần, mức GLP-1 tăng tương đương so với nhóm dùng Liraglutide (Hình 3.37).



Hình 3.27. Nồng độ GLP-1 trong huyết thanh chuột khi kết thúc thử nghiệm

3.3.4.2. Hiệu quả dung nạp sucrose

Sau 4 tuần, thử nghiệm dung nạp đường sucrose được thực hiện và chúng tôi thấy mức đường huyết tối đa đạt được sau 60 phút. Mức đường huyết của nhóm được điều trị với *L. plantarum* 16 cao hơn một chút so với nhóm được điều trị bằng Liraglutide. Mức độ glucose cao hơn đáng kể ($p < 0,01$) ở chuột bị tiểu đường không được điều trị so với chuột được điều trị bằng *L. plantarum* 16 (Hình 3.28).



Hình 3.28. Ảnh hưởng của điều trị đến nồng độ glucose trong máu của chuột sau khi uống sucrose

Chúng tôi đưa ra giả thuyết rằng việc uống *L. plantarum* 16 có thể dẫn đến sự thay đổi mức độ hormon GLP-1. Chúng tôi đã đo mức độ của GLP-1 trong huyết thanh. Sau 4 tuần thử nghiệm, hormone GLP-1 đã giảm đáng kể ở nhóm chuột tiểu đường do streptozotocin gây ra so với nhóm đối chứng. Những kết quả này chứng minh rằng mức độ GLP-1 tăng lên tương quan với tác dụng chuyển hóa có lợi của *L. plantarum* 16. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện ra, sử dụng *L. plantarum* 16, làm tăng mức GLP-1 và làm hạ đường huyết ở chuột bị tiểu đường.

Các nghiên cứu trước đây đã xác định hệ vi sinh vật đường ruột là thành phần quan trọng trong việc điều hòa bài tiết GLP-1, mặc dù cơ chế hoạt động và các vi khuẩn chịu trách nhiệm cho hoạt động này vẫn chưa được xác định rõ ràng. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi kiểm tra khả năng thúc đẩy bài tiết GLP-1 của chủng vi sinh vật có nguồn gốc từ người Việt Nam.

Lợi khuẩn probiotic được định nghĩa là vi sinh vật sống mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ của chúng khi được sử dụng với lượng vừa đủ. Nhiều nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra những lợi ích của lợi khuẩn *Lactobacillus* như hoạt động chống khối u, hoạt động kháng khuẩn, cải thiện hệ thống miễn dịch và khôi phục hệ vi sinh vật đường tiêu hóa sau khi sử dụng kháng sinh. Manaer và cộng sự đã báo cáo tác dụng hạ đường huyết đáng kể ở chuột tiểu đường thông qua việc tăng cường giải phóng GLP-1 và cải thiện chức năng tế bào β tuyến tụy khi sử dụng những chủng *Lactobacillus* khác nhau. Nghiên cứu trước đây cho thấy điều trị với *L. plantarum* đơn lẻ hoặc kết hợp với các lợi khuẩn khác giúp cải thiện tình trạng căng thẳng, chống oxy hóa và chống lại tình trạng tăng đường huyết. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát hiện ra, sử dụng *L. plantarum* 16 làm tăng mức GLP-1 và làm hạ đường huyết ở chuột tiểu đường. Chúng tôi đưa ra giả thuyết rằng việc uống *L. plantarum* 16 có thể dẫn đến thay đổi hormon GLP-1 theo chiều hướng tăng. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng điều trị bằng probiotic làm tăng tiết hormon incretine có liên quan đến việc tăng mức hormon insulin bằng cách phục hồi các tiểu đảo tuyến tụy do hoạt động chống oxy hóa, tái tạo GLP-1 và sự bài tiết GLP-1 liên quan đến sự điều hòa của hệ vi sinh vật đường ruột. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, trọng lượng cơ thể đã giảm đáng kể ở nhóm chuột tiểu đường, sự giảm trọng lượng đột ngột này có thể do sự phân giải lipid trong mô cơ vì lipid tham gia vào quá trình tạo đường mới. tuy nhiên, trọng lượng cơ thể chuột đã tăng lên đáng kể sau 04 tuần điều trị bằng chủng

L. plantarum 16. Cơ chế hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường có thể liên quan đến tăng mức insulin, từ đó cải thiện việc kiểm soát đường huyết và ngăn ngừa giảm cân.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đánh giá sự thay đổi hệ vi sinh vật đường ruột giữa 2 nhóm nghiên cứu, nhóm nữ đối chứng có số lượng OTUs phong phú hơn nhóm nữ tiểu đường type 2 (trung bình là 288 và 214 tương ứng). Trong khi phân tích nhóm nam giới thì những người mắc bệnh tiểu đường type 2 có OTUs phong phú hơn nhóm không mắc bệnh tiểu đường type 2 (trung bình là 252 và 217 tương ứng).

Ở nhóm nam giới, số lượng trình tự đọc tập trung ở ba ngành (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria), trong đó ngành Proteobacteria là có sự khác biệt giữa 2 nhóm ($p = 0,021$). Phân tích sự khác biệt của chi và loài, chỉ có 1 chi và 2 loài khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê.

Phân tích thành phần loài ở nhóm nữ giới, số lượng trình tự đọc tập trung ở bốn ngành (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria và Fusobacteria) và chiếm >98,56%. Trong số 4 ngành chiếm ưu thế, chỉ duy nhất sự khác biệt của ngành Firmicutes là có ý nghĩa thống kê. Phân tích sự khác biệt của chi và loài thì thấy có 9 chi và 4 loài khác biệt nhau giữa 2 nhóm và có ý nghĩa thống kê.

2. Phân tích mối liên quan của vi khuẩn đường ruột với một số chỉ số dùng chẩn đoán và tiên lượng bệnh tiểu đường type 2 chúng tôi thấy:

Ở nữ giới, ngành Actinobacteria tương quan nghịch với chỉ số glucose, 4 ngành (Firmicutes, Lentisphaerae, Synergistetes và Others) tương quan nghịch với BMI và đều có ý nghĩa thống kê. Đối với các chi, có 3 chi tương quan nghịch glucose và 6 chi tương quan nghịch BMI có ý nghĩa thống kê, trong đó 2 chi (*Ruminococcus*, *Butyricimonas*) tương quan nghịch với cả 2 chỉ số và đều có ý nghĩa thống kê.

Ở nam giới chỉ có ngành Proteobacteria tương quan thuận với cả hai chỉ số glucose và BMI là có ý nghĩa thống kê. Đối với các chi, chỉ có chi *Veillonella* tương quan thuận với BMI có ý nghĩa thống kê. Phân tích tương quan ở mức độ loài, nhóm nữ có 2 loài tương quan nghịch với BMI có ý nghĩa (*Ruminococcus callidus*, *Ruminococcus biforme*) và 01 loài tương quan thuận và có ý nghĩa với cả 02 chỉ số (*P. distasonis*); ở nam giới không có loài nào tương quan với glucose có ý nghĩa thống kê nhưng có 02 loài tương quan thuận với BMI và có ý nghĩa thống kê (*R. gnavus*, *V. dispar*).

3. Phân lập vi khuẩn có khả năng liên quan đến bệnh tiểu đường type 2 và đánh giá khả năng giảm đường huyết của chủng vi khuẩn phân lập trên chuột thí nghiệm cho thấy:

Có 03 chủng *Lactobacillus* 17, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 13 hội tụ được các đặc điểm quý của vi khuẩn probiotic, và 03 chủng này đều thuộc loài *L. plantarum*. Nghiên cứu về khả năng sống sót trong môi trường pH 2, muối mật 0,3% và kháng khuẩn của 03 chủng *Lactobacillus* 17, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 13, chúng tôi thấy chủng *L. plantarum* 16 ưu thế hơn 02 chủng còn lại. Thử nghiệm *L. plantarum* 16 trên chuột trong thời gian 4 tuần, đã làm tăng mức GLP-1 và hạ glucose máu ở chuột bị tiểu đường.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu tiếp trên lượng mẫu bệnh nhân lớn hơn để các kết quả thu được có độ tin cậy cao hơn.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Hoàng Thế Hưng**, Phạm Thị Thu Uyên, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Trung Nam và Nguyễn Thị Tuyết Nhung, *Lactobacillus plantarum* 16 làm tăng tiết Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) ở chuột đái tháo đường (ĐTĐ) type 2, Tạp chí Y dược Thái Bình, 2023, 4-9.

2. Xuan Thach Tran, Thi Hien Vu, Thi Thu Ha, Thi Hoa Nguyen, **The Hung Hoang**, Duc Hoang Le, Quyen Van Dong, Nam Trung Nguyen and Thi Tuyet Nhung Nguyen, *Screening bile salt hydrolase activity of Lactobacillus isolated from Vietnamese human origins*, Vietnam Journal of Biotechnology, 2022, 20(3): 527-536.

3. **Hoang The Hung**, Hoa Thi Minh Tu, Pham Thi Thu Uyen, Le Thi Thanh Huyen, Vu Thi Hien, Ha Thi Thu, Le Hoang Duc, Nguyen Trung Nam, Nguyen Thi Tuyet Nhung, *Characteristics of Lactobacillus strains isolated from Vietnamese patients with type 2 diabetes*, Vietnam Journal of Biotechnology, 2022, 20(1): 99-108.

4. **Hung The Hoang**, Duc Hoang Le, Thi Thanh Huyen Le, Thi Tuyet Nhung Nguyen, Ha Hoang Chu, Nam Trung Nguyen, *Metagenomic 16S rDNA amplicon data of microbial diversity of guts in Vietnamese humans with type 2 diabetes and nondiabetic adults*, Data in Brief 34 (2021) 106690.

5. **Hoàng Thế Hưng**, Lê Hoàng Đức, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Trung

Nam, *Bước đầu so sánh hệ vi sinh vật đường ruột ở người bệnh tiểu đường type 2 và người khỏe mạnh ở Việt Nam*, Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc 2021, 119-123.

6. Trần Xuân Thạch, Hà Thị Thu, Vũ Thị Hiền, **Hoàng Thế Hưng**, Nguyễn Thị Hoa, Lê Thị Thu Hồng, Lưu Đàm Ngọc Anh, Bùi Văn Hường, Lã Thị Lan Anh, Đồng Văn Quyền, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, *Khả năng đồng phân hóa linoleic acid của các chủng Lactobacillus phân lập từ hệ vi khuẩn đường ruột ở người*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2020, 18(3): 445-453.

7. Hà Thị Thu, **Hoàng Thế Hưng**, Trần Xuân Thạch, Nguyễn Thị Hoa, Lã Thị Lan Anh, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Đình Duy, Đồng Văn Quyền, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, *Khả năng sinh H_2O_2 của các chủng vi khuẩn Lactobacillus phân lập từ hệ vi khuẩn đường ruột của người khỏe mạnh*, Tạp chí Sinh học, 2020, 42(1): 83-92.