

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS Nguyễn Trung Nam

TS Nguyễn Thị Tuyết Nhung

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Luận án này là công trình nghiên cứu được thực hiện chủ yếu bởi cá nhân tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của TS Nguyễn Trung Nam và TS Nguyễn Thị Tuyết Nhung. Phần lớn kết quả nghiên cứu đã được đăng tải trên các bài báo khoa học. Các số liệu và kết quả nghiên cứu hoàn toàn trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về lời cam đoan này.

Tác giả luận án



Hoàng Thế Hưng

LỜI CẢM ƠN

Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến TS Nguyễn Trung Nam và TS Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình chỉ bảo, hướng dẫn và tạo điều kiện cho tôi trong quá trình thực hiện luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo và Phòng Đào tạo của Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và làm thủ tục bảo vệ luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng tế bào gốc và liệu pháp gen, phòng Vi sinh vật phân tử, các cán bộ tham gia nhiệm vụ mã số NV03-PTNTĐ2017, các cán bộ tại cơ sở đào tạo thuộc Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất, máy móc, trang thiết bị cũng như các thủ tục cần thiết để tôi có thể hoàn thành luận án. Cảm ơn ThS Bùi Thị Hải Hà, chuyên viên phụ trách đào tạo, Viện Công nghệ sinh học đã giúp tôi hoàn thành thủ tục cần thiết chuẩn bị cho bảo vệ luận án.

Tôi xin cảm ơn Lãnh đạo Học viện Hậu cần, cán bộ, nhân viên Viện Nghiên cứu khoa học Hậu cần quân sự đã giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè, những người thân đã luôn bên cạnh chia sẻ, động viên, giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi về mọi mặt để tôi có thể tập trung, yên tâm học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án của mình.

Hà Nội, ngày 31 tháng 7 năm 2023

Tác giả



Hoàng Thế Hưng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH, ĐỒ THỊ.....	x
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Bệnh lý tiêu đường.....	3
1.1.1. Định nghĩa, phân loại.....	3
1.1.2. Nguyên nhân.....	3
1.1.3. Các chỉ số dùng chẩn đoán, tiên lượng trong bệnh tiêu đường.....	5
1.1.4. Phương pháp điều trị.....	8
1.2. Vi khuẩn đường ruột với sức khỏe con người.....	11
1.2.1. Chức năng của hệ vi sinh vật đường ruột.....	11
1.2.2. Vai trò của vi khuẩn đường ruột trong trao đổi chất.....	12
1.2.3. Mối liên quan giữa vi khuẩn đường ruột và sức khỏe con người.....	17
1.2.4. Vi khuẩn đường ruột trong bệnh tiêu đường type 2.....	18
1.2.5. Sản phẩm trao đổi chất của vi khuẩn đường ruột với người tiêu đường type 2.....	20
1.3. Kỹ thuật metagenomics và ứng dụng trong nghiên cứu hệ vi sinh vật.....	24
1.3.1. Khái quát về metagenomics.....	24
1.3.2. Nền tảng của kỹ thuật metagenomics.....	26
1.3.3. Ứng dụng của metagenomics.....	32
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	37
2.1. Vật liệu.....	37
2.1.1. Hóa chất, bộ kit sinh phẩm.....	37
2.1.2. Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm.....	37
2.1.3. Các chủng vi sinh vật kiểm định.....	38
2.1.4. Môi trường phân lập, nuôi cấy vi sinh vật.....	38
2.1.5. Trình tự cấp môi.....	38

2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	39
2.2.1. Phương pháp lựa chọn người tham gia nghiên cứu.....	39
2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu phân.....	39
2.2.3. Phương pháp tách chiết DNA vi sinh vật từ mẫu phân.....	40
2.2.4. Phương pháp giải và phân tích trình tự DNA vùng V3-V4 gen 16S rRNA	40
2.2.5. Phân lập chủng Lactobacillus, xác định đặc tính sinh học và đặc tính kháng khuẩn	43
2.2.6. Thử nghiệm khả năng cải thiện glucagon like peptide-1 trên chuột của chủng Lactobacillus	45
2.2.7. Thống kê phân tích số liệu	47
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	48
3.1. Đánh giá sự sai khác khu hệ vi khuẩn đường ruột của các đối tượng nghiên cứu	48
3.1.1. Kết quả tách DNA metagenome vi khuẩn đường ruột.....	48
3.1.2. Chỉ số đa dạng khu hệ vi khuẩn đường ruột.....	49
3.1.3. Thành phần loài vi khuẩn.....	58
3.2. Mối tương quan của vi khuẩn đường ruột với chỉ số glucose và BMI	79
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.....	79
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.....	84
3.3. Đánh giá tiềm năng ứng dụng Lactobacillus trong hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường type 2.....	89
3.3.1. Phân lập Lactobacillus và đánh giá hiệu quả kháng khuẩn	89
3.3.2. Xác định các đặc điểm probiotics của Lactobacillus	91
3.3.3. Định danh vi khuẩn Lactobacillus	93
3.3.4. Đánh giá hiệu quả tăng tiết GLP-1 và dung nạp sucrose trên chuột của L. plantarum 16	95
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	99
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	101
TÀI LIỆU THAM KHẢO	102
PHỤ LỤC	122

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên tiếng anh	Tên tiếng việt
ACE	Abundance-based coverage estimator	Chỉ số ước đoán dựa trên sự đa dạng
ADA	American Diabetes Association	Hiệp hội tiểu đường Mỹ
ALT	Alanine transaminase	Alanine transaminase
AST	Aspartate transaminase	Aspartate transaminase
BCAA	Branch-Chain Amino Acids	axit amin chuỗi nhánh
BB-DP	Bio-Breeding Diabetes Prone	Bệnh tiểu đường sinh sản
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ tìm kiếm đối chiếu nội bộ cơ bản
bp	Base pair	Cặp base
BMI	Body Mass Index	Chỉ số khối cơ thể
CADs	Coronary Artery Diseases	Bệnh động mạch vành
CKD	Chronic Kidney Disease	Bệnh thận mãn tính
CSDL		Cơ sở dữ liệu
CVD	Cardiovascular Disease	Bệnh tim mạch
DED	Diabetic Eye Disease	Bệnh mắt do tiểu đường
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis	Điện di gel dải nồng độ biến tính
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	Deoxynucleoside triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Axit Ethylenediaminetetraacetic
DPP-4	Enzyme dipeptidyl peptidase - 4	
DR	Diabetic Retinopathy	Bệnh võng mạc tiểu đường
ESRD	Endstage Renal Disease	Bệnh thận giai đoạn cuối
FDA	Food and Drug Administration	
FFA	Free Fatty Acid	Acid béo tự do
FMT	Fecal Microbiota Transplantation	Cấy ghép vi sinh vật trong phân
FPG	The Fasting Plasma Glucose test	Xét nghiệm glucose huyết tương

		lúc đối
GI	Glycemic Index	Chỉ số đường huyết
GIP	Gastric inhibitory polypeptide	Peptid hướng insulin phụ thuộc glucose
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1	Peptid giống glucagon – 1
HbA1C	Hemoglobin A1C	
HDL-C	High Density Lipoprotein – Cholesterol	Lipoprotein – Cholesterol tỷ trọng cao
HOMA-insulin	Homeostasis Model of Assessment	Chỉ số kháng insulin
IDF	International Diabetes Federation	Hiệp hội Tiểu đường Quốc tế
ITS	Internal transcribed spacer	Vùng đệm trong đực sao mã
Kb	Kilo base	Kilo base
LB	Luria-Betani	Môi trường nuôi cấy LB
LDL	Low Density Lipoprotein	Lipoprotein mật độ thấp
LDL-C	Low Density Lipoprotein – Cholesterol	Lipoprotein - Cholesterol tỷ trọng thấp
NA	Nutrient agar	Môi trường thạch dinh dưỡng
NB	Nutrien broth	Môi trường dinh dưỡng
NCBI	National center for biotechnology information	Trung tâm thông tin về Công nghệ sinh học Mỹ
NCEF	National Cholesterol Education Program	Chương trình giáo dục quốc gia về cholesterol
NGS	Next-generation sequencing	Giải trình tự thế hệ mới
NOD	Non-Obese Diabetic	Bệnh tiểu đường không béo phì
OD	Optical density	Mật độ quang học
ORF	Open reading frame	Khung đọc mở
PAD	Peripheral Artery Disease	Bệnh động mạch ngoại vi
PBG	Peak Blood Glucose	Đỉnh glucose máu
PE	Pair-end	Đọc có cả hai đầu tương đồng
pH	Hydrogen power	Chỉ số đo nồng độ ion H ⁺ , ion

		OH- trong dung dịch
PKA	Protein kinase A	Protein kinase A
RDP	Ribosomal database project	Dự án cơ sở dữ liệu ribosome
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Axit ribonucleic của ribosome
SCFA	Short-Chain Fatty Acid	Axit béo chuỗi ngắn
STZ	Streptozotocin	Streptozotocin
SUR1	Sulfonylurea receptor 1	Sulfonylurea receptor 1
T2D	Type 2 Diabetes	Bệnh tiểu đường type 2
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

<i>Bảng 1.1.</i> Chỉ số sinh hóa một số chất trong máu	6
<i>Bảng 1.2.</i> Tương quan giữa HbA1c và nồng độ glucose huyết trung bình.....	6
<i>Bảng 1.3.</i> Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh tiểu đường	7
<i>Bảng 1.4.</i> Mục tiêu điều trị bệnh tiểu đường.....	8
<i>Bảng 1.5.</i> Một số vi khuẩn chiếm ưu thế trong ruột người	12
<i>Bảng 1.6.</i> So sánh thành phần khu hệ vi khuẩn đường ruột của nhóm nam giới	34
<i>Bảng 2.1.</i> Trình tự một số đoạn môi sử dụng trong luận án.....	38
<i>Bảng 2.2.</i> Ký hiệu mẫu, tuổi, BMI và glucose của các nhóm nghiên cứu	39
<i>Bảng 2.3.</i> Các nhóm chuột tham gia thử nghiệm	46
<i>Bảng 3.1.</i> Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA	49
<i>Bảng 3.2.</i> Kết quả các thông số giải trình tự và các chỉ số đa dạng từ các mẫu của nhóm nữ giới	51
<i>Bảng 3.3.</i> Kết quả các thông số giải trình tự và các chỉ số đa dạng từ các mẫu phân nam giới	55
<i>Bảng 3.4.</i> Tỷ lệ trung bình một số ngành vi sinh vật trong phân của nhóm nữ giới tiểu đường type 2 và nhóm nữ giới không tiểu đường	59
<i>Bảng 3.5.</i> Tỷ lệ trung bình một số chi vi sinh vật trong phân của nhóm nữ giới tiểu đường type 2 và nhóm nữ giới không tiểu đường	63
<i>Bảng 3.6.</i> Tỷ lệ trung bình một số loài vi sinh vật trong phân của nhóm nữ giới.....	67
<i>Bảng 3.7.</i> Tỷ lệ trung bình một số ngành vi sinh vật trong phân của nhóm nam giới tiểu đường type 2 và nhóm nam giới không tiểu đường	71
<i>Bảng 3.8.</i> Tỷ lệ trung bình một số chi vi sinh vật trong phân của nhóm nam giới.....	73
<i>Bảng 3.9.</i> Tỷ lệ trung bình một số loài vi sinh vật trong phân của nhóm nam giới.....	75

DANH MỤC CÁC HÌNH, ĐỒ THỊ

<i>Hình 1.1.</i> Số lượng một số loài vi khuẩn cư ngụ trong ống tiêu hóa người	11
<i>Hình 1.2.</i> Hệ vi sinh vật đường ruột ở người khi chế độ ăn khác nhau.....	21
<i>Hình 1.3.</i> Tổng quan về giải trình tự gen 16S rRNA và giải trình tự shotgun trong nghiên cứu metagenome	28
<i>Hình 1.4.</i> Sơ đồ cấu trúc các vùng trên gen 16S rRNA và các cặp môi dùng để khuếch đại các vùng gen siêu biến	29
<i>Hình 2.1.</i> Sơ đồ quy trình giải trình tự DNA metagenome	40
<i>Hình 2.2.</i> Sơ đồ các bước phân tích dữ liệu giải trình tự gen 16S rRNA.....	41
<i>Hình 3.1.</i> Hình ảnh điện di metagenomic DNA tách từ mẫu phân của nhóm người bệnh tiểu đường type 2 (A), nhóm đối chứng (B).....	48
<i>Hình 3.2.</i> Biểu đồ Venn mô tả sự chia sẻ các OTU chung giữa mẫu phân của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường và nhóm nữ giới mắc bệnh tiểu đường	52
<i>Hình 3.3.</i> A. Tương quan giữa Chao 1 và OTUs ở nhóm nữ giới. B. Tương quan giữa ACE và OTUs ở nhóm nữ giới.	53
<i>Hình 3.4.</i> A. Rarefaction của các OTU vi sinh vật quan sát được của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường. B. Rarefaction của các OTU vi sinh vật quan sát được của nhóm nữ giới mắc bệnh tiểu đường type 2.	54
<i>Hình 3.5.</i> 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	54
<i>Hình 3.6.</i> Biểu đồ Venn mô tả sự chia sẻ các OTU chung giữa mẫu phân của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường và nhóm nữ giới mắc bệnh tiểu đường	56
<i>Hình 3.7.</i> A. Tương quan giữa Chao1 và OTUs ở nhóm nam giới. B. Tương quan giữa ACE và OTUs ở nhóm nam giới	56
<i>Hình 3.8.</i> Rarefaction của các OTU vi sinh vật quan sát được của nhóm nam giới.....	57
<i>Hình 3.9.</i> Kết quả phân tích tọa độ chính (PCoA) ở các mẫu phân của nam giới.....	58

<i>Hình 3.10.</i> 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).....	60
<i>Hình 3.11.</i> Độ phong phú tương đối ở mức độ chi 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).....	64
<i>Hình 3.12.</i> Độ phong phú tương đối ở mức độ loài 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).....	68
<i>Hình 3.13.</i> Độ phong phú tương đối ở mức độ ngành của hệ vi sinh vật trong phân 3 nam giới tiểu đường type 2 (D8-D10) và 3 nam giới không tiểu đường (C8-C10).....	72
<i>Hình 3.14.</i> Độ phong phú tương đối ở mức độ chi của hệ vi sinh vật trong phân 3 nam giới tiểu đường type 2 (D8-D10) và 3 nam giới không tiểu đường (C8-C10).....	74
<i>Hình 3.15.</i> Độ phong phú tương đối ở mức độ loài hệ vi sinh vật trong phân 3 nam giới bệnh tiểu đường type 2 (D8-D10) và 3 nam giới không tiểu đường (C8-C10).....	76
<i>Hình 3.16.</i> Mối tương quan giữa Actinobacteria, Firmicutes/ Bacteroidetes với chỉ số glucose; Firmicutes, Firmicutes/ Bacteroidetes với chỉ số BMI	81
<i>Hình 3.17.</i> Mối tương quan giữa <i>Ruminococcus</i> , <i>Butyricimonas</i> với chỉ số glucose và chỉ số BMI	82
<i>Hình 3.18.</i> Mối tương quan giữa <i>R. callidus</i> , <i>R. biforme</i> và <i>P. distasonis</i> với chỉ số glucose, BMI ở nhóm nữ giới	83
<i>Hình 3.19.</i> Mối tương quan giữa ngành Bacteroidetes, Proteobacteria với chỉ số glucose và BMI	85
<i>Hình 3.20.</i> Mối tương quan giữa <i>Roseburia</i> , <i>Veillonella</i> với chỉ số glucose và BMI.....	86
<i>Hình 3.21.</i> Mối tương quan giữa <i>R. gnavus</i> , <i>V. dispar</i> với chỉ số glucose và BMI.....	87
<i>Hình 3.22.</i> Khuẩn lạc vi khuẩn <i>Lactobacillus</i> phân lập từ mẫu phân người.....	89

<i>Hình 3.23.</i> Khả năng kháng khuẩn của chủng <i>Lactobacillus</i> tuyển chọn	90
<i>Hình 3.24.</i> Khả năng chịu acid của các chủng <i>Lactobacillus</i> tuyển chọn ở pH 2	91
<i>Hình 3.25.</i> Khả năng chịu muối mật của các chủng <i>Lactobacillus</i> tuyển chọn ở nồng độ 0.3%	92
<i>Hình 3.26.</i> A. Sản phẩm PCR của 3 chủng: M: Maker, 1: <i>Lactobacillus</i> 13; 2: <i>Lactobacillus</i> 16; 3: <i>Lactobacillus</i> 17. B. Cây phát sinh chủng loại	94
<i>Hình 3.27.</i> Nồng độ GLP-1 trong huyết thanh chuột khi kết thúc thử nghiệm	95
<i>Hình 3.28.</i> Ảnh hưởng của điều trị đến nồng độ glucose trong máu của chuột sau khi uống sucrose	96

MỞ ĐẦU

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”**.

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.

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.

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.

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

1.1. Bệnh lý tiểu đường

1.1.1. Định nghĩa, phân loại

1.1.1.1. Định nghĩa

Năm 1550 trước Công nguyên bệnh tiểu đường được đặt tên là bệnh “đái tháo” (diabetes) [1]. Từ thế kỷ thứ 3 sau Công nguyên, bệnh tiểu đường được gọi là bệnh tiểu ngọt. Tuy có liên quan đến bệnh tiểu đường và đã được mô tả, thực nghiệm trên chó [2]. Năm 2006, Hiệp hội tiểu đường Mỹ định nghĩa tiểu đường type 2 như sau: “Tiểu đường type 2 là bệnh chuyển hóa đặc trưng bởi tăng đường huyết do sự phối hợp giữa kháng insulin và thiếu đáp ứng insulin”. Năm 2017, Liên đoàn tiểu đường quốc tế đã định nghĩa tiểu đường: 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.

1.1.1.2. Phân loại

Theo Hiệp hội tiểu đường Mỹ và Hiệp hội tiểu đường Châu Âu, bệnh tiểu đường được phân loại như sau:

- Tiểu đường type 1: do tế bào β của tụy bị phá hủy dẫn đến thiếu hụt insulin tuyệt đối [3].

- Tiểu đường type 2: do tình trạng kháng insulin hoặc giảm bài tiết insulin của tuyến tụy. Ở các nước phát triển, 87-91% số người mắc bệnh tiểu đường thuộc nhóm tiểu đường type 2 [3].

- Tiểu đường thai kỳ: tiểu đường được phát hiện khi mang thai và chiếm 1-3% tổng số bệnh nhân tiểu đường.

- Tiểu đường do đột biến gen, do khiếm khuyết gen của tế bào β ...

1.1.2. Nguyên nhân

Rối loạn bài tiết insulin: Sự bài tiết và độ nhạy cảm của insulin giúp cơ thể duy trì lượng glucose trong máu. Chức năng tế bào β giảm trên 80% và khối lượng giảm 30-40% ở những bệnh nhân tiểu đường type 2. Khối lượng tế bào β ở người tiểu đường type 2 thường giảm từ từ, và tốc độ giảm tăng dần theo thời gian mắc bệnh. Khối lượng tế bào β ở người tiểu đường type 2 giảm là do tế bào β bị chết, sự tân tạo tế bào β giảm [4], [5]; giảm tác dụng của GIP hoặc giảm tiết GLP-1 [5], [6].

Kháng insulin: Hội chứng trao đổi chất hay hội chứng X đã được dùng để chỉ

các đặc tính kháng lại insulin. Định nghĩa của NCEP về hội chứng trao đổi chất như sau: là hội chứng được đặc trưng bởi một chu vi vòng eo lớn (do mỡ vùng bụng nhiều quá mức), tăng huyết áp, đường huyết lúc đói không bình thường hoặc đề kháng insulin, và rối loạn lipid máu.

Hiện nay, kháng insulin chủ yếu đánh giá ở bệnh nhân tiểu đường, béo phì, tăng huyết áp, rối loạn chuyển hóa lipid. Kháng insulin được coi là giai đoạn tiền lâm sàng và thường có trước nhiều năm khi tiểu đường type 2 xuất hiện. Tuy cơ thể vẫn tiết ra insulin nhưng người mắc bệnh “Tiểu đường kháng insulin” lại không đáp ứng được với chính insulin tiết ra [7].

Di truyền: Nhiều nghiên cứu cho thấy nếu bố hoặc mẹ bị tiểu đường thì nguy cơ con bị tiểu đường là 40%. Nếu cả bố và mẹ bị bệnh tiểu đường thì con cái của họ có nguy cơ mắc bệnh là 70%. Các nghiên cứu gần đây công bố gen SUR1, gen PPAR gamma và SNPs có liên quan chặt chẽ tới sự xuất hiện tiểu đường type 2 ở người mang gen này. Trong đó SUR1 có liên quan đến tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường nhiều gấp 2 lần so với người không mang gen này. Một số gen như IRS1, PI3K cũng liên quan đến bệnh tiểu đường.

Những đột biến khác nhau có thể dẫn tới những thay đổi chức năng quan trọng của gen điều hòa tổng hợp insulin. Có nhiều yếu tố liên quan giữa môi trường sống và bệnh tiểu đường type 2 như: người cao tuổi, béo phì; do thói quen ăn nhiều; ít vận động thể lực; tăng lượng thức ăn đưa vào cũng kích thích tụy tăng tiết insulin. Mặt khác, quá trình sản sinh tế bào mỡ cũng đóng góp một phần vào kháng insulin và tăng insulin máu [8].

Giảm tiết incretine: Incretine là một loại nội tiết tố tiêu hóa, kích thích tiết insulin sau bữa ăn. Ở người, 2 incretine chính là GLP-1 và GIP. Vai trò chính của hai incretine này là điều hòa ổn định năng lượng, kích thích tụy tiết insulin, ức chế sự ngon miệng. Một số nghiên cứu cho thấy, GLP-1 chỉ làm tăng tiết insulin khi glucose máu tăng. Do đó, để tăng hiệu quả điều trị bệnh tiểu đường cần nâng cao tác dụng của incretin ở người bệnh. Liraglutide là chất tương đồng tới 97% GLP-1. Trong huyết tương, liraglutide có thời gian bán hủy khoảng 12 giờ. Chỉ khi đường huyết tăng cao thì liraglutide mới kích thích tăng tiết insulin và giảm tiết glucagon nên không gây hạ glucose máu. Ngoài ra, liraglutide còn kháng lại sự phân hủy của DPP4 [9].

Lối sống: Nhiều nghiên cứu cho thấy không hoặc ít hoạt động thể lực sẽ dễ bị mắc bệnh tiểu đường type 2. Mỗi ngày tập thể dục ít nhất 1 giờ sẽ giảm nguy cơ tiểu đường type 2 đến 39%. Luyện tập thể lực và sống lành mạnh sẽ phòng ngừa được sự khởi phát của tiểu đường. Sự hấp thu glucose sẽ giảm khi cơ thể tiêu thụ lượng lớn alcohol. Nguyên nhân là do rượu ảnh hưởng lên tế bào tuyến tụy và ức chế sự tiết insulin, tăng BMI [10]. Hút thuốc lá làm tăng 70% nguy cơ mắc tiểu đường type 2 so với người không hút thuốc.

1.1.3. Các chỉ số dùng chẩn đoán, tiên lượng trong bệnh tiểu đường

Chỉ số glucose máu: Chỉ số đường máu của một loại thực phẩm có thể được xem là thấp, trung bình hoặc cao. Ở những thực phẩm chứa loại đường glucose hấp thu nhanh được xem là thực phẩm có chỉ số đường máu cao. Các thực phẩm có chỉ số đường máu thấp sẽ tốt hơn vì khi ăn sẽ giúp cơ thể giữ được nguồn năng lượng ổn định. Chỉ số glucose máu là căn cứ đầu tiên để chuẩn đoán bệnh tiểu đường. Người không mắc bệnh tiểu đường, chỉ số glucose sau khi nhin ăn 8 đến 10 tiếng từ 4,0 đến 5,9 mmol/L, ở người bệnh tiểu đường là trên 7 mmol/L (≥ 126 mg/dl).

Mỡ máu: Rối loạn về trao đổi mỡ là nguyên nhân gây ra hiện tượng kháng insulin. Về lâu dài, các tế bào beta bị suy giảm chức năng và hậu quả là người bệnh tiểu đường type 2 sẽ phải dùng đến insulin. Nguy hiểm hơn đó là việc xuất hiện những biến chứng tim mạch, thận, mắt. Một số chỉ số mỡ máu như cholesterol toàn phần, triglyceride, cholesterol xấu (bad cholesterol), cholesterol tốt (good cholesterol) cũng được sử dụng để chẩn đoán bệnh tiểu đường ở người [11].

Men gan: Hai loại enzyme ALT và AST được tìm thấy nhiều hơn ở các tế bào gan và thận, ở cơ tim và cơ bắp cũng có hai enzyme này nhưng lượng nhỏ hơn. Ở người khỏe mạnh, nồng độ ALT và AST trong máu là thấp. Khi gan bị tổn thương, ALT và AST được giải phóng vào trong máu, do đó xét nghiệm chỉ số ALT và AST sẽ giúp phát hiện các tổn thương gan [12]. Ở người thừa cân hoặc mắc bệnh tiểu đường, xét nghiệm ALT và AST để chẩn đoán bệnh liên quan đến gan. Chỉ số AST ở người bình thường có giá trị nhỏ hơn 37 đơn vị/L trong khi giá trị này đối với ALT là nhỏ hơn 41 đơn vị /L [12]. Ở người bị viêm gan cấp do virus và bệnh gan mạn tính thì chỉ số ALT và AST có thể tăng đến 100. Đối với người bị vàng da do tắc mật, ALT thường tăng gần đến 500 UI/L [12]. Ở các trường hợp viêm gan do rượu, giá trị này tăng lên đến gần 300 đơn vị/L.

Bảng 1.1. Chỉ số sinh hóa một số chất trong máu

TT	Chỉ số trong máu	Đơn vị	Trị số bình thường
1	Glucose	mmol/L	3,6 - 6,4
2	Cholesterol	mmol/L	< 5,2
3	LDL-C	mmol/L	≤ 3,4
4	HDL-C	mmol/L	> 0,9
5	Triglyceride	mmol/L	< 1,7
6	AST	unit/L	< 37
7	ALT	unit/L	< 41

Chỉ số BMI: Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, béo phì là nguyên nhân chính của tiểu đường type 2. Chỉ số BMI được dùng để đánh giá mức độ gầy hay béo của một người và được tính bằng cân nặng của người đó (kg) chia cho bình phương chiều cao (tính theo mét). BMI không đo trực tiếp lượng mỡ của cơ thể nhưng các nghiên cứu đã chứng minh rằng BMI tương quan với lượng mỡ đo trực tiếp [13].

Chỉ số HbA1c: Theo Hiệp hội tiểu đường Mỹ (ADA) thì mức HbA1c ở người từ 5,7-6,4% được xem là mắc bệnh tiền tiểu đường, HbA1c ≥ 6,5 là mắc bệnh tiểu đường. Để theo dõi tình trạng kiểm soát glucose huyết, theo khuyến cáo của ADA thì nên kiểm tra chỉ số HbA1c 3 tháng 1 lần.

Bảng 1.2. Tương quan giữa HbA1c và nồng độ glucose huyết trung bình [14]

HbA1c (%)	HbA1c (mmol/mol)	Glucose huyết trung bình (mmol/L)
5	31	5
6	42	7
7	53	8
8	64	10
9	75	12
10	86	13
11	97	15
12	108	17
13	119	18

Chỉ số insulin: Ở người không mắc bệnh tiểu đường, nồng độ insulin trong

máu trung bình là 17,8-173 pmol/L. Suy giảm khả năng bài tiết insulin và có đề kháng insulin ngay từ giai đoạn sớm ở người mắc bệnh tiểu đường type 2, việc tiết insulin bị chậm trễ và không đủ để kiểm soát glucose máu sau ăn.

Xét nghiệm glucose máu sau ăn trên bệnh nhân tiểu đường type 2: Người bệnh tiểu đường type 2 được thực hiện nghiệm pháp tăng glucose máu đường tĩnh mạch, và kết quả cho thấy pha bài tiết sớm insulin trong 8 phút đầu bị mất. Kết quả dung nạp glucose máu lúc đói khi uống 75 g đường glucose cho thấy: Ở người không mắc bệnh tiểu đường, nửa giờ đầu glucose máu tăng khoảng 7,5 mmol/L và trở lại mức bình thường là 5 mmol/L sau 2 giờ; Ở người mắc bệnh tiểu đường, nửa giờ đầu glucose máu vượt 8,0 mmol/L và có thể cao hơn 11,1 mmol/L sau 2 giờ, đồng thời xuất hiện đường trong nước tiểu. Glucose máu chỉ trở lại bình thường sau 3-4 giờ hoặc có thể lâu hơn [14].

Để chẩn đoán bệnh tiểu đường, dựa vào 1 trong 4 tiêu chí Bảng 1.3. Khi trong cùng 1 mẫu máu xét nghiệm hoặc ở 2 thời điểm khác nhau đối với tiêu chí 1, 2 hoặc 3 có 2/4 kết quả vượt ngưỡng chẩn đoán thì kết luận là mắc bệnh tiểu đường; riêng tiêu chí 4 chỉ cần 1 lần xét nghiệm duy nhất.

Bảng 1.3. Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh tiểu đường [14]

Tiêu chí	Tiêu chuẩn chẩn đoán
1	Glucose huyết tương lúc đói ≥ 126 mg/dL (hay 7 mmol/L)
2	Glucose huyết tương ở thời điểm sau 2 giờ làm nghiệm pháp dung nạp với 75g glucose bằng đường uống ≥ 200 mg/dL (hay 11,1 mmol/L)
3	HbA1c $\geq 6,5\%$ (48 mmol/mol)
4	Có triệu chứng kinh điển của tăng glucose huyết hoặc của cơn tăng glucose huyết cấp kèm mức glucose huyết tương bất kỳ ≥ 200 mg/dL (hay 11,1 mmol/L)

Ngoài các tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh tiểu đường, Tổ chức tiểu đường quốc tế và WHO đã đưa ra các khuyến cáo về chỉ tiêu phân đấu trong điều trị người mắc bệnh tiểu đường. Dựa trên khuyến cáo của WHO, Bộ Y tế ban hành Quyết định 5481/QĐ-BYT ngày 30/12/2020 về mục tiêu điều trị bệnh tiểu đường, cụ thể được thể hiện ở Bảng 1.4.

Bảng 1.4. Mục tiêu điều trị bệnh tiểu đường

Mục tiêu	Chỉ số
HbA1c	< 7% (53 mmol/mol)
Glucose huyết tương lúc đói	80-130 mg/dL (4,4-7,2 mmol/L)
Đỉnh glucose huyết tương sau ăn 1-2 giờ	< 180 mg/dL (10,0 mmol/L)
Huyết áp	Tâm thu <140 mmHg, Tâm trương <90 mmHg Nếu đã có biến chứng thận, hoặc có yếu tố nguy cơ tim mạch do xơ vữa cao: Huyết áp <130/80 mmHg
Lipid máu	LDL cholesterol <100 mg/dL (2,6 mmol/L), nếu chưa có biến chứng tim mạch LDL cholesterol <70 mg/dL (1,8 mmol/L) nếu đã có bệnh tim mạch xơ vữa, hoặc có thể thấp hơn <50 mg/dL nếu có yếu tố nguy cơ xơ vữa cao Triglycerides <150 mg/dL (1,7 mmol/L) HDL cholesterol >40 mg/dL (1,0 mmol/L) ở nam và >50 mg/dL (1,3 mmol/L) ở nữ

1.1.4. Phương pháp điều trị

1.1.4.1. Sử dụng dược phẩm

- Nhóm thuốc tăng tiết insulin tại tụy

Rối loạn bài tiết insulin là một trong 2 biểu hiện chính của tiểu đường type 2 do đó các nhóm thuốc kích thích bài tiết insulin rất quan trọng trong điều trị tiểu đường type 2.

+ Nhóm thuốc ức chế kênh K_{ATP} gồm: sulfonylurea và meglitinide, hai loại này có cơ chế tác dụng giống nhau và đều kích thích tế bào β bài tiết insulin bằng cách gắn vào các vị trí khác nhau trên một thụ thể đặc biệt, liên kết với kênh K_{ATP} trên màng tế bào β [15].

Sulfonylurea được Marcel Janbon tình cờ phát hiện vào năm 1942. Gần đây, nhiều thuốc thuộc nhóm sulfonylurea đã lần lượt được tổng hợp (gồm hơn 20 thuốc chia thành 2 thế hệ) và các thuốc này hiện đang được sử dụng rộng rãi trên lâm sàng để điều trị cho bệnh nhân tiểu đường type 2 [16].

Megletinide gồm 2 thuốc được phép lưu hành là: Repaglinid và Netaglinid. Đặc điểm của nhóm thuốc này là: gắn nhanh và tách nhanh ra khỏi thụ thể đặc hiệu

nên kích thích bài tiết insulin nhanh [16].

+ Nhóm thuốc điều biến incretine: Khoảng 50-70% lượng insulin được bài tiết sau bữa ăn là do các hormone incretine kích thích [17]. Hai hormone incretine có tác dụng hạ glucose máu mạnh nhất là GLP-1 và GIP. Cả hai hormone này thể hiện tác dụng bằng cách gắn vào thụ thể đặc hiệu, kích thích dòng thác các tín hiệu mà cuối cùng là kích thích các tế bào β tụy bài tiết insulin. Sau đó GIP và GLP-1 nhanh chóng bị chuyển hóa bởi các enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) và tạo thành các chất chuyển hóa không hoạt tính, rồi đào thải qua nước tiểu [18]. Do đó, chiến lược sử dụng GLP-1 trong điều trị, dựa trên 2 nhóm thuốc là:

Các chất tương tự GLP-1: chất chủ vận của receptor GLP-1 (GLP-1-RA) như exenatide làm tăng tác dụng của GLP-1 hoặc chất tương tự GLP-1 kháng lại tác động của DPP-4 như liraglutide, được gọi chung là các chất tương tự GLP-1. Hiện nay các chất tương tự GLP-1 đã được FDA phê duyệt để điều trị bệnh tiểu đường là Exenatid, Exenatid giải phóng chậm, Liraglutide, Lixisenatide. Một số chất khác đang được nghiên cứu là Taspoglutide, Albiglutide [17]. Các chất tương tự GLP-1 có khả năng kiểm soát đường huyết tốt như giảm nồng độ glucose qua đêm và glucose máu lúc đói, giảm đáng kể HbA1c. Nguy cơ hạ đường huyết thấp, ngoài ra còn làm chậm thời gian làm rỗng dạ dày và tăng cảm giác no. Vì thế GLP-1-RA có thể kết hợp với các thuốc khác có khả năng gây hạ đường huyết và tăng cân như sulfonylurea, meglitinide hoặc insulin [18].

Các chất ức chế dipeptidylpeptidase-IV: có tác dụng làm chậm sự thoái hóa, bất hoạt của GLP-1 nội sinh do đó tăng cường và kéo dài tác dụng sinh lý của hormon này. Các thuốc ức chế DPP-4 (iDPP-4) còn được gọi là các “*gliptins*” gồm 5 chất đã được FDA và EU cấp phép và đang được sử dụng rộng rãi trên lâm sàng hiện nay là: sitagliptin (năm 2006), vildagliptin (năm 2007), saxagliptin (năm 2009), linagliptin (năm 2011), alogliptin (năm 2013) [19]. Có 3 chất khác là teneligliptin, anagliptin, và trelagliptin mới được chấp nhận ở Nhật Bản và Hàn Quốc [18]. Các chất ức chế DPP-4 đã được chứng minh là có nhiều lợi thế: kích thích sự tổng hợp của insulin, ức chế tiết glucagon, làm giảm mức glucose sau ăn và glucose máu lúc đói, cải thiện chức năng tế bào β , làm giảm HbA1c ở bệnh nhân tiểu đường type 2 [20]. Lợi ích rõ ràng nhất của các chất ức chế DPP-4 trên lâm sàng là không gây giảm khối lượng cơ thể và

nguy cơ hạ đường huyết thấp, do đó có thể thích hợp với nhiều bệnh nhân khác nhau.

- Nhóm thuốc làm giảm kháng insulin

+ Metformin: Được đưa vào điều trị tiểu đường từ năm 1957, hiện nay metformin là thuốc duy nhất thuộc nhóm biguanid còn được sử dụng trong lâm sàng [15]. Tác dụng chính của metformin là làm giảm sản xuất 25-40% glucose do ức chế quá trình tân tạo glucose ở gan. Tăng nhập glucose vào tất cả các mô trong cơ thể và tăng sử dụng glucose 20-50%. Giảm tổng hợp và tăng oxy hoá acid béo ở tế bào gan, dẫn đến dự trữ triglycerid trong gan giảm (15-20%), giảm cholesterol toàn phần (5-10%) và giảm LDL cholesterol [15].

+ Thiazolidinedion (TZDs): Nhóm thuốc này giúp cải thiện tình trạng kháng insulin ở mô ngoại vi, tăng tổng hợp glycogen và giảm sản xuất glucose ở gan. TZDs làm tăng vận chuyển glucose vào cơ và mô mỡ do tăng tổng hợp các loại protein đặc biệt vận chuyển glucose. TZDs cũng hoạt hoá gen điều hoà chuyển hoá các acid béo tự do ở mô ngoại vi [16].

- Nhóm thuốc làm giảm hấp thu glucid

Để làm giảm hấp thu các glucid tại đường tiêu hóa, ức chế tăng đường huyết sau ăn, hiện nay thường sử dụng acarbose (Precose, Glucobay) và miglitol (Glyset). Thuốc này có tác dụng là làm giảm quá trình hấp thu tinh bột, dextran và các disaccharid bằng cách ức chế enzym α -glucosidase ở niêm mạc ruột non, tránh được tình trạng tăng glucose máu sau ăn. Các chất ức chế α -glucosidase không kích thích sự bài tiết insulin do đó không làm hạ đường huyết [16].

1.1.4.2. Liệu pháp thay thế

- Sử dụng hoạt chất từ thảo mộc: Polyphenol trong một số loại thảo mộc có khả năng ức chế α -amylase với giá trị IC 50 (khả năng ức chế 50%) là 540,90 $\mu\text{g/ml}$ và α -glucosidase với giá trị IC là 425,20 $\mu\text{g/ml}$, trong khi đó khả năng ức chế α -glucosidase với giá trị IC 50 của acarbose là 295 $\mu\text{g/ml}$ [21].

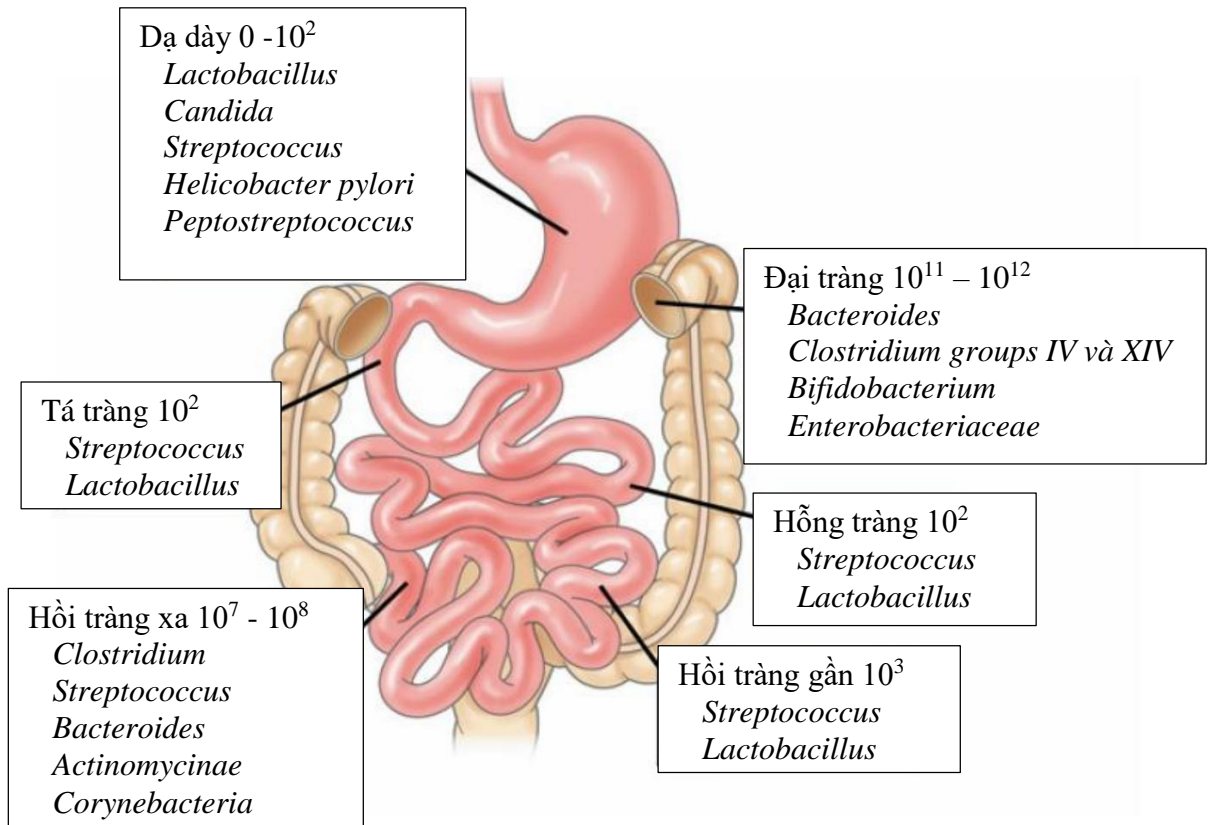
- Chế độ ăn: Hạn chế ăn glucid, giảm axit béo bão hoà (năng lượng do lipid cung cấp $\leq 30\%$ tổng số calo, trong đó axit béo no từ 5-10%). Nên ăn thực phẩm chứa nhiều chất xơ. Thực phẩm chứa nhiều protein chỉ ăn lượng vừa phải, nếu ăn nhiều sẽ ảnh hưởng đến thận nhất là những bệnh nhân có suy thận. Lượng protein cần thiết là 0,7-0,8 g/kg thể trọng/ngày [22].

- Hoạt động thể thao: Để giảm nguy cơ bệnh tim, giảm cholesterol, tiểu đường người trưởng thành cần hoạt động thể thao 30 phút/ngày bằng các hoạt động như đi bộ, chạy bộ, đạp xe, bơi... [23].

1.2. Vi khuẩn đường ruột với sức khỏe con người

1.2.1. Chức năng của hệ vi sinh vật đường ruột

Trong 1 gram phân chứa có khoảng 10^{11} vi sinh vật và hầu hết chúng đều là vi khuẩn kỵ khí bắt buộc [24].



Hình 1.1. Số lượng một số loài vi khuẩn cư ngụ trong ống tiêu hóa người

(<http://www.wright.edu/~oleg.paliy/research.html>)

Tùy cơ quan khác nhau trong đường tiêu hóa mà thành phần vi sinh vật cũng khác nhau. Một người trưởng thành khỏe mạnh chứa 500-1000 loài vi khuẩn và có thể có 10^{12} - 10^{14} vi khuẩn trong đường ruột với khối lượng khoảng 1-2 kg [25]. Chỉ riêng đại tràng chứa khoảng 10^9 - 10^{12} CFU/ml, ở hồng tràng là 10^1 - 10^3 CFU/ml và ở hồi tràng là 10^4 - 10^8 CFU/ml.

Hệ vi khuẩn đường ruột gồm bảy ngành chính, cụ thể là: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria và Actinobacteria. Trong đó ngành Bacteroidetes và Firmicutes chiếm trên 90% tổng số vi khuẩn trong ruột người. Chức năng cơ bản của hệ vi sinh vật đường ruột là: (1)

chức năng bảo vệ niêm mạc ruột; (2) chức năng trao đổi chất; (3) chức năng điều hòa miễn dịch [26].

Bảng 1.5. Một số vi khuẩn chiếm ưu thế trong ruột người [26]

TT	Tỷ lệ (%)	Ngành	Chi
1	60-80	Firmicutes	<i>Ruminiococcus</i>
			<i>Clostridium</i>
			<i>Lactobacillus</i>
2	20-30	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>
			<i>Prevotella</i>
			<i>Xylanibacter</i>
3	< 10	Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>
4	< 1	Proteobacteria	<i>Escherichia</i>
			<i>Enterobacteriaceae</i>

Vi khuẩn probiotic là các vi khuẩn sống và có lợi, được bổ sung vào đường tiêu hóa của vật chủ nhằm cải thiện cân bằng của hệ vi sinh đường ruột, ức chế các vi sinh vật có hại, từ đó cải thiện sức khỏe của vật chủ. Sự có mặt của vi khuẩn probiotic trong đường tiêu hóa có tác dụng cạnh tranh, ức chế và loại trừ các vi sinh vật gây hại trong đường ruột, duy trì hệ vi sinh đường ruột ở trạng thái cân bằng. Cơ chế cạnh tranh và loại trừ vi sinh vật gây bệnh của vi khuẩn probiotic bao gồm: cạnh tranh vị trí bám dính, cạnh tranh nguồn dinh dưỡng, sản sinh các chất ức chế, kích thích hệ miễn dịch,...

Các vi sinh vật được lựa chọn làm probiotic phải đáp ứng được các tiêu chuẩn về an toàn, chức năng và đặc tính kỹ thuật. Các vi sinh vật probiotic phải có khả năng sống sót khi đi qua đường tiêu hóa (dạ dày - ruột non); có khả năng thực hiện chức năng trong môi trường nơi chúng được định hướng.

1.2.2. Vai trò của vi khuẩn đường ruột trong trao đổi chất

1.2.2.1. Vai trò của ăn uống trong hình thành hệ vi khuẩn đường ruột

Ngay sau khi sinh cơ thể đã bắt đầu hình thành hệ vi khuẩn đường ruột, hệ vi khuẩn này trở nên bền vững hơn và giống người trưởng thành khi đưa các thực phẩm rắn vào chế độ ăn. Kết quả so sánh việc nuôi trẻ bằng sữa mẹ với nuôi bằng sữa công thức cho thấy: trẻ được nuôi bằng sữa mẹ có tỷ lệ *Bifidobacteria* cao hơn so với trẻ được nuôi bằng sữa công thức [27].

Sử dụng trình tự gen 16S rRNA để xác định thành phần hệ vi khuẩn đường ruột trên 98 đối tượng khỏe mạnh cho thấy tương quan có ý nghĩa thống kê giữa chế độ ăn và thành phần hệ vi khuẩn đường ruột. Phân tích 3 nhóm vi khuẩn đường ruột gồm chi *Bacteroides*, *Prevotella* và *Ruminococcus* cho thấy có sự hiện diện của 2 nhóm vi khuẩn là *Bacteroides* và *Prevotella*. Thường xuyên ăn thực phẩm chứa nhiều protein và chất béo động vật, ít carbohydrate thì vi sinh vật thuộc chi *Bacteroides* sẽ cao, chi *Prevotella* sẽ thấp. Ngược lại, khi ăn các loại thực phẩm giàu carbohydrate nhưng ít protein và chất béo động vật thì chi *Prevotella* sẽ có tỷ lệ cao, chi *Bacteroides* có tỷ lệ thấp [28].

Nghiên cứu so sánh hệ vi khuẩn đường ruột ở các nước nông nghiệp Malawi và Amerindian với những người sống ở Hoa Kỳ cho thấy mối tương quan nghịch giữa chi *Bacteroides* và *Prevotella*. Mặc dù *Prevotella* của những người sống ở các nước nông nghiệp có tỷ lệ cao hơn, nhưng những người sống ở Hoa Kỳ cũng có tỷ lệ *Prevotella* tương tự [29], điều này chứng tỏ tương quan tỷ lệ nghịch giữa *Bacteroides* và *Prevotella* có thể bị ảnh hưởng bởi chế độ ăn. Như vậy, loại vi khuẩn có tỷ lệ cao và liên quan với chế độ ăn phương Tây là *Bacteroides*, loại vi khuẩn chiếm ưu thế có liên quan với chế độ ăn ở các nước nông nghiệp là *Prevotella*.

Thực tế cho thấy hệ vi sinh vật đường ruột có vai trò quan trọng trong việc tiêu hóa và hấp thu thức ăn. Ngoài ra, chúng cũng điều chỉnh sự biểu hiện của một số gen nhất định trong vật chủ. Chứng tỏ thành phần và sự đa dạng của vi sinh vật đường ruột bị ảnh hưởng bởi chế độ ăn uống [30].

Ngoài ra, vi khuẩn đường ruột tạo ra một số chất chuyển hóa như axit béo chuỗi ngắn (SCFA) giúp bảo vệ vật chủ khỏi vi khuẩn gây bệnh và đóng vai trò quan trọng có lợi khác. Đối với những người sử dụng thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật là chủ yếu, vi sinh vật đường ruột tạo ra nhiều SCFA và các enzyme liên quan đến quá trình đồng hóa hơn, đồng thời tăng tổng hợp amylase, glutamate và riboflavin [31].

Mặt khác, tiêu thụ nhiều thực phẩm động vật dẫn đến sự thích nghi về chức năng của vi sinh đường ruột đối với các quá trình dị hóa tăng lên như sự thoái hóa của glycans và axit amin. Vai trò của vi sinh vật đường ruột trong việc chuyển đổi các thành phần dinh dưỡng khó tiêu như polysacarit phức tạp thành đường đơn có thể được coi là một trong những cơ chế có lợi trong vật chủ để lấy thêm năng lượng từ chế độ ăn uống. Ở đại tràng, sự phân hủy các polysacarit sẽ gia tăng việc sản xuất SCFA như

butyrate, propionate và acetate cùng với khí hydro, cũng như tạo nguồn năng lượng cho cơ thể [32]. Năng lượng được tạo ra từ quá trình tiêu hóa các polysacarit khó tiêu như vậy đóng góp không đáng kể vào tổng năng lượng cần thiết của cơ thể so với carbohydrate đơn giản và dễ tiêu hóa. Lượng năng lượng nhỏ được phân giải từ polysacarit phức tạp này có thể không có lợi trực tiếp cho cơ thể nhưng lại có vai trò gián tiếp trong sự sống sót của vi khuẩn hội sinh. Người ta đưa ra giả thuyết rằng butyrate có khả năng giảm lượng calo bằng cách gây ra cảm giác no, hoạt động thông qua các thay đổi trong GLP-1 [33]. Butyrate cũng tham gia vào việc tăng cường tính toàn vẹn của ruột bằng cách cung cấp năng lượng cho các tế bào ruột để điều chỉnh sự sống và tăng sinh của chúng.

Viêm nhiễm nhẹ là một trong những yếu tố sinh lý bệnh quan trọng nhất dẫn đến sự tiến triển của tiểu đường type 2 với tăng đường huyết và kháng insulin. Giảm đa dạng vi khuẩn đường ruột dẫn đến tăng vi khuẩn gây bệnh, viêm ruột và tiến triển của tình trạng bệnh tiểu đường. Những phản ứng miễn dịch bẩm sinh hoặc giải phóng các hợp chất độc hại như H_2S trong môi trường ruột có thể dẫn tới hội chứng ruột rò và tăng khả năng tiếp cận các thành phần vi sinh vật trong lòng ruột vào các mô ruột dẫn đến viêm ruột [34].

1.2.2.2. Vi khuẩn đường ruột trong trao đổi glucid

Đối với người khỏe mạnh, chế độ ăn uống hằng ngày thường chứa một lượng khá lớn glucid bao gồm monosacarit, disacarit, cũng như các polysacarit phức tạp. Các loại đường thông thường như đường glucose và đường fructose dễ dàng được hấp thu trong ruột, trong khi các disacaride như sacarose, lactose, maltose và các polysacaride phức tạp như tinh bột, pectin và hemicellulose cần được phân giải thành các monosacaride đơn giản trước khi hấp thu vào ruột. Polysacaride không được tiêu hóa ở phần trên của đường tiêu hóa, nhưng chúng được phân giải thành monosacaride trong hồi tràng nhờ enzyme glycosidase của vi khuẩn. Chế độ ăn giàu glucid sẽ làm nồng độ glucose trong máu tăng lên, nhưng nó được điều chỉnh mạnh mẽ và giữ ở mức cân bằng nội môi nhờ hormone insulin và glucagon. Đường tiêu hóa trên có liên quan đến tiêu hóa carbohydrate và sự hấp thu của nó trong dòng máu thông qua các protein chuyên biệt khác nhau được gọi là chất vận chuyển glucose (GLUT) nằm trên các tế bào biểu mô [28]. Nhiều nghiên cứu cho thấy vai trò quan trọng của môi trường ruột trong cơ chế bệnh sinh các rối loạn miễn dịch với nhiều cơ chế. Vai trò của môi

trường ruột và mô bạch huyết liên quan đến ruột cũng được thiết lập cho vai trò của chúng trong tiêu đường type 2. Ngoài tiêu đường type 2, vai trò của vi sinh vật đường ruột cũng có liên quan đến bệnh tiêu đường type 1. Giảm đa dạng vi sinh vật đường ruột sẽ ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của tế bào. Khiếm khuyết này gây ra hiện tượng rò rỉ ruột với tính thấm tăng dẫn đến viêm ruột, giảm hoặc rối loạn đáp ứng miễn dịch ở niêm mạc ruột. Tất cả các yếu tố này có ảnh hưởng đến khả năng tự miễn dịch tế bào T và các rối loạn tự miễn liên quan bao gồm cả tiêu đường type 1 [35]. Niêm mạc ruột có diện tích bề mặt lớn nhất so với bề mặt của bất kỳ cơ quan nào trong cơ thể người và các mô bạch huyết của ruột là các cơ quan miễn dịch rộng nhất. Ruột là khu vực tiếp xúc nhiều nhất với các thành phần vi sinh vật khác nhau và các kháng nguyên từ bên ngoài đưa vào, ruột có vai trò rất quan trọng đối với cơ thể trong quá trình miễn dịch [36].

Bệnh tiêu đường type 1 là do hệ quả của nhiều yếu tố, bao gồm cấu trúc di truyền của cơ thể, các yếu tố môi trường và tác động ngoại sinh. Do đó, hệ vi sinh vật đường ruột và sự tham gia của chúng vào hệ thống miễn dịch niêm mạc ruột đóng một vai trò quan trọng trong sự tiến triển của các bệnh lâm sàng nghiêm trọng như tiêu đường type 1. Vai trò của chức năng hàng rào ruột kém và giảm khả năng miễn dịch được cho là có liên quan đến bệnh tiêu đường. Người mắc bệnh tiêu đường type 1, có sự thiếu hụt insulin tuyệt đối do sự phá hủy các tế bào β tuyến tụy [37]. Ngược lại, bệnh tiêu 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 tiêu đường type 2 là do thiếu hụt hoặc không đáp ứng hormone incretine, tăng dị hóa lipid, tăng glucagon trong máu, giữ nước và muối cao hơn và các bất thường chuyển hóa khác. Các nghiên cứu được thực hiện với chuột không có mầm bệnh ăn nhiều chất béo, chuột ăn chế độ bình thường và chuột được nuôi bằng chế độ ăn tiêu chuẩn đã chứng minh rằng quá trình trao đổi chất và miễn dịch chủ yếu phụ thuộc vào sự đa dạng và thành phần vi sinh vật, không phân biệt chế độ ăn uống. Những con chuột có cùng kiểu gen và chế độ ăn tương tự có thể có các kiểu chuyển hóa glucose khác nhau (tăng đường huyết hoặc hạ đường huyết) tùy thuộc vào hệ vi sinh vật đường ruột của chúng. Những phát hiện này xác nhận mối tương quan giữa hệ vi sinh vật đường ruột

và chức năng trao đổi chất [38].

1.2.2.3. Vi khuẩn đường ruột trong trao đổi lipid

Việc duy trì một hệ vi sinh vật đường ruột bình thường và khỏe mạnh đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì sức khỏe tốt. Trong đường ruột của người khỏe mạnh, các loài thuộc chi *Ruminococcus*, *Lactobacillus* và *Clostridium* chiếm hơn 90% tổng lượng vi sinh vật. Những thay đổi về cả thành phần và chức năng của hệ vi sinh vật được gọi là rối loạn sinh học, là những đặc điểm chung của một số bệnh lý bao gồm các bệnh chuyển hóa như béo phì và tiểu đường type 2. Một số nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng cho kết quả là ở người béo phì sự đa dạng vi sinh vật thấp hơn so với người gầy.

Các nghiên cứu về mối liên quan giữa bệnh béo phì và vi sinh vật thấy rằng sự gia tăng trọng lượng cơ thể có liên quan đến sự thay đổi tỷ lệ Bacteroidetes/Firmicutes, trong đó lượng Firmicutes lớn hơn so với Bacteroidetes. Ngoài ra, trong các nghiên cứu khác, các tác giả không tìm thấy bằng chứng về mối liên quan giữa tỷ lệ Bacteroidetes/Firmicutes và bệnh béo phì ở người. Một số sự thay đổi của kết quả được báo cáo giữa các nghiên cứu có thể là do sự khác biệt về quy trình nghiên cứu hoặc do phương pháp luận khác nhau [39].

Sự thay đổi thành phần hệ vi sinh vật đường ruột có thể gây béo phì ở người theo cơ chế: điều chỉnh năng lượng hấp thu, tương tác với các phân tử truyền tín hiệu, thay đổi tính thấm của ruột, giải phóng các hormone ruột, và viêm mãn tính. Một số nghiên cứu trên người cho thấy béo phì có liên quan đến sự khác nhau của hệ vi sinh vật đường ruột, sự đa dạng vi khuẩn giảm, thay đổi biểu hiện các gen vi khuẩn và các con đường chuyển hóa [40].

Béo phì cũng liên quan đến sự gia tăng quá trình lên men do vi khuẩn và giải phóng năng lượng từ các thành phần không tiêu hóa được của thực phẩm. Quá trình các vi sinh vật đường ruột lên men carbohydrate không tiêu hóa được thành axit béo chuỗi ngắn (SCFA), đây là những chất đóng vai trò khá quan trọng vì chúng tham gia vào quá trình truyền tín hiệu trong tiêu hóa, hấp thu thức ăn. Axit béo chuỗi ngắn do vi khuẩn sinh ra làm tăng: (1) hấp thu và vận chuyển monosaccharide vào hệ tĩnh mạch cửa của gan, (2) hình thành chất béo trong các tế bào mỡ, và (3) tăng lưu lượng carbon vào gan và mô mỡ. Vi khuẩn cũng có thể trực tiếp điều chỉnh cân bằng năng lượng nội môi của vật chủ và điều chỉnh chuyển hóa bằng cách tăng vận chuyển

triglyceride vào các tế bào mỡ và thay đổi sự tiết hormone ruột gây cảm giác no [34].

Tóm lại, hệ vi khuẩn đường ruột có thể góp phần làm thay đổi năng lượng dự trữ và gây béo phì thông qua một số cơ chế. Tương tác của vi khuẩn đường ruột với hệ miễn dịch bẩm sinh có thể ảnh hưởng đến quá trình viêm và trao đổi chất, gây béo phì và rất quan trọng đối với sức khỏe con người.

1.2.3. Mối liên quan giữa vi khuẩn đường ruột và sức khỏe con người

Thành phần và chức năng của vi khuẩn khác nhau tùy thuộc vào vị trí đường tiêu hóa, độ tuổi, giới tính, chủng tộc và khẩu phần ăn của con người [41].

Vi khuẩn xâm nhập vào con người ngay sau khi sinh. Theo thời gian, các mối liên hệ giữa vi khuẩn và vật chủ đã phát triển thành các mối quan hệ có lợi. Các vi khuẩn cộng sinh chuyển hóa hợp chất khó tiêu, cung cấp các chất dinh dưỡng thiết yếu, chống lại sự xâm chiếm của các mầm bệnh cơ hội và góp phần hình thành cấu trúc ruột [42]. Vi khuẩn đường ruột tham gia vào quá trình tiêu hóa một số loại thức ăn mà enzyme ở dạ dày và ruột non không phân giải được. Những thức ăn này thường chứa nhiều chất xơ và chúng được một số vi khuẩn như *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* phân giải.

Các nghiên cứu đã làm rõ vai trò của hệ vi khuẩn đường ruột trong việc cân bằng nội môi lipid và protein, tham gia tổng hợp các vitamin cho cơ thể như vitamin B9, B2, B12, K, H và các vitamin B khác. Sản xuất các axit béo chuỗi ngắn (SCFA) như axit axetic, propionic và butyric, và đóng vai trò như một nguồn năng lượng cho biểu mô ruột của con người. Các SCFA này có thể được hấp thu nhanh chóng trong đại tràng và có nhiều vai trò khác nhau trong việc điều chỉnh nhu động ruột, chống viêm, cân bằng nội môi và thu năng lượng [43].

Ngoài ra, vi khuẩn sống trong ruột kích thích sự phát triển bình thường của hệ thống miễn dịch trong cơ thể. Các tín hiệu và sản phẩm chuyển hóa có thể được cảm nhận bởi các tế bào tạo máu và không tạo máu của hệ thống miễn dịch bẩm sinh và được chuyển thành các phản ứng sinh lý [44].

Năm 2014, các nhà nghiên cứu đã phân tích bộ dữ liệu trình tự gen 16S rRNA từ Hiệp hội Dự án Vi sinh vật ở người (HMP) và thấy rằng giới tính có liên quan đến các kiểu quần xã được xác định trong phân, nam giới có khả năng có ít *Bacteroides* hơn và *Prevotella* cao hơn. Nhìn chung, thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột dường như khác nhau giữa các giới, trong đó sự đa dạng α (chỉ số Chao và Shannon)

ở nữ cao hơn so với nam. Hệ vi sinh vật liên quan đến niêm mạc ở nữ cho thấy sự phong phú cao hơn của *Actinobacteria*, *Lactobacillales*, *Streptococcaceae*, *Bifidobacterium* và ít *Veillonellaceae* và *Clostridia* chưa được phân loại.

Các nghiên cứu so sánh chuột nuôi bình thường với chuột không mang mầm bệnh đã phát hiện ra rằng chuột không mang mầm bệnh có nhiều khiếm khuyết trong quá trình phát triển mô bạch huyết liên quan đến đường ruột và sản xuất kháng thể. Một báo cáo khác cũng đã chứng minh rằng hệ vi sinh vật đường ruột tạo ra phản ứng dung nạp hoạt động trên các tế bào đuôi gai ở ruột và ức chế quá trình viêm thông qua tế bào lympho T helper [45].

1.2.4. Vi khuẩn đường ruột trong bệnh tiểu đường type 2

1.2.4.1. Vi khuẩn đường ruột và bệnh béo phì

Vi khuẩn đường ruột tham gia vào nhiều loại chức năng chuyển hóa khác nhau như lên men và hấp thu carbohydrate chưa tiêu hóa, hấp thu chất điện giải và khoáng chất, điều hòa nhu động ruột và tổng hợp một số vi chất dinh dưỡng. Do vai trò của vi sinh vật trong việc thực hiện các chức năng này nên những thay đổi của chúng trong ruột người cũng là nguyên nhân của bệnh béo phì [46].

Vi khuẩn đường ruột có liên quan đến sự phát triển của các bệnh chuyển hóa như tiểu đường và béo phì, góp phần vào điều chỉnh cân bằng năng lượng của cơ thể. Thành phần vi khuẩn đường ruột thay đổi có thể gây ra sự mất cân bằng năng lượng dẫn đến những thay đổi về chuyển hóa, hoạt động thần kinh từ đó thúc đẩy sự phát triển của bệnh béo phì [47].

Nghiên cứu trên chuột cho thấy có mối liên quan của vi khuẩn đường ruột đối với sự tích tụ chất béo. Chuột không mang mầm bệnh thì lượng mỡ trong cơ thể ít hơn so với chuột bình thường mặc dù chúng ăn nhiều hơn. Để chứng minh, người ta đã cấy ghép hệ vi sinh vật của chuột béo phì sang chuột không mang mầm bệnh, kết quả đã gây ra sự gia tăng trọng lượng rất đáng kể so với những con chuột không mang mầm bệnh được cấy ghép hệ vi sinh vật từ những con chuột gầy [48].

Sự gia tăng Firmicutes được thấy ở cả động vật và người béo phì có thể liên quan đến việc phân giải polysaccharide khó tiêu thành monosaccharide và axit béo, do đó giúp cơ thể dễ hấp thu và tạo ra nhiều năng lượng hơn. Trong khi đó ở những động vật gầy, các polysaccharide khó tiêu được bài tiết qua phân [49].

Bacteroidetes có ít gen mã hóa cho các enzym tham gia chuyển hóa lipid và

glucid hơn so với Firmicutes. Tuy nhiên trong ngành Bacteroidetes, loài *Bacteroides thetaiotaomicron* đã được chứng minh là làm tăng khả năng hấp thu và xử lý chất dinh dưỡng của vật chủ [50].

Một số nghiên cứu trên người cho thấy tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes cao ở người béo phì, nhưng cũng có nghiên cứu không tìm thấy mối tương quan giữa chỉ số khối cơ thể và tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes. Ngoài ra, vẫn có nghiên cứu tìm thấy một tỷ lệ ngược lại. Những người béo phì thực hiện ăn kiêng ít calo hoặc dùng biện pháp cắt bỏ dạ dày, kết quả đã giảm tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes [51].

Một phát hiện quan trọng khác ở người là việc chuyển từ chế độ ăn nhiều chất béo, ít chất xơ sang chế độ ăn nhiều chất xơ, ít chất béo đã tạo ra những thay đổi đáng kể đối với hệ vi sinh vật chỉ trong 24 giờ. Hơn nữa, 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 [52]. 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 [53].

Ngoài ra, một số nghiên cứu đã xác định mối liên hệ của một số loài vi sinh vật với bệnh béo phì ở người. Nghiên cứu ở phụ nữ mang thai thừa cân cho thấy lượng Bacteroides thấp hơn nhưng lượng *Staphylococcus*, Enterobacteriaceae và *Escherichia coli* (*E. coli*) cao hơn so với phụ nữ mang thai có cân nặng bình thường. Ở trẻ béo phì, lượng vi khuẩn *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii* thuộc ngành Firmicutes) cao hơn đáng kể so với trẻ không béo phì. Tỷ lệ của nhóm vi khuẩn *Bacteroides*, *Prevotella* được chứng minh là tăng sau khi giảm cân ở thanh thiếu niên béo phì [54].

1.2.4.2. Vi khuẩn đường ruột và đề kháng insulin

Nghiên cứu *Bifidobacterium* spp cho thấy, khi nhóm vi khuẩn này gia tăng thì tình trạng viêm ở chuột béo phì giảm. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do *Bifidobacterium* spp đã làm tăng sản xuất GLP-1 và peptide YY, do đó quá trình đề kháng insulin giảm, chức năng của tế bào β tăng.

Một nghiên cứu gần đây đối với 277 người Đan Mạch không mắc bệnh tiểu đường để điều tra xem liệu hệ vi sinh vật đường ruột có ảnh hưởng đến các dấu hiệu chuyển hóa liên quan đến kháng insulin hay không. Kết quả cho thấy ở những người kháng insulin thì khả năng vận chuyển acid amin chuỗi nhánh (BCAA) của máu vào

tế bào giảm. BCAA giúp duy trì glucose máu ở mức độ bình thường, ngoài ra còn giúp cơ thể tăng tiết insulin. Nguồn BCAA cung cấp cho cơ thể được lấy từ thức ăn hoặc được tổng hợp từ vi sinh vật. Một số vi khuẩn được coi là “nhà sản xuất” BCAA đó là *Prevotella copri* và *Bacteroides vulgatus*. Đây là nguồn BCAA rất quan trọng giúp giảm khả năng kháng insulin của cơ thể [55].

Loài vi khuẩn trọng tâm trong nghiên cứu về bệnh béo phì và bệnh tiểu đường type 2 là *Akkermansia muciniphila* khu trú trong lớp chất nhầy. Zhang và cộng sự nhận thấy vi khuẩn *A. muciniphila* giảm ở những người tiền tiểu đường và người tiểu đường type 2. Lượng vi khuẩn này ít có thể là dấu hiệu sinh học cho tình trạng không dung nạp glucose [56]. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây ở các cặp song sinh cho thấy *A. muciniphila* giảm trước khi bắt đầu mắc bệnh tiểu đường type 2 [57].

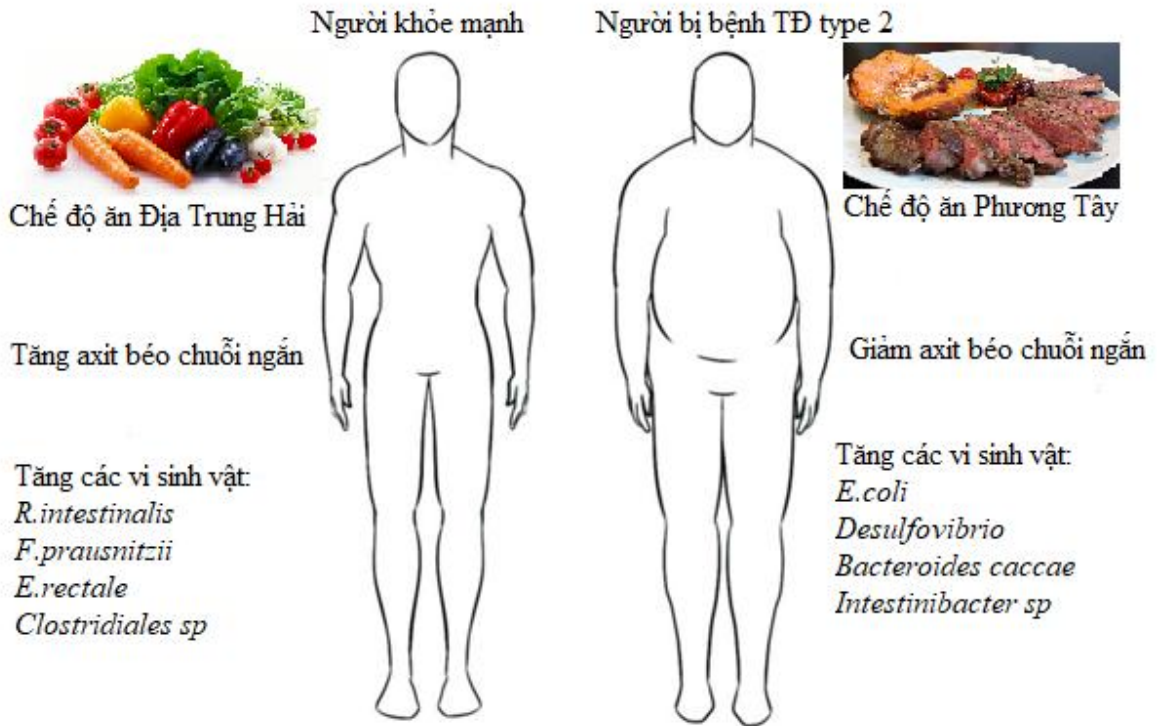
Prevotella copri cũng được công nhận là có liên quan tích cực đến việc sản xuất các hợp chất tăng cường sức khỏe như axit béo chuỗi ngắn, cải thiện khả năng dung nạp glucose [58]. *Prevotella copri* có khả năng dung nạp glucose là do vi khuẩn này làm tăng dự trữ glycogen ở gan, tăng sản xuất succinate. Sự phong phú của *Prevotella copri* cũng liên quan đến sự gia tăng hormone đường ruột GLP-1 và giảm cảm giác đói [59].

1.2.5. Sản phẩm trao đổi chất của vi khuẩn đường ruột với người tiểu đường type 2

Di truyền, lối sống và tăng trọng lượng cơ thể đều góp phần vào sự phát triển của bệnh tiểu đường type 2. Khoảng 80% người thừa cân bị bệnh tiểu đường type 2. Mối liên quan giữa vi sinh vật đường ruột và bệnh tiểu đường type 2 đã được thể hiện thông qua các nghiên cứu trên chuột không mắc bệnh tiểu đường. Việc đưa hệ vi sinh vật từ chuột mắc bệnh tiểu đường vào đường ruột chuột không mắc bệnh tiểu đường sẽ làm tăng đáng kể chất béo trong cơ thể và kháng insulin [58].

Sau đó, một số nghiên cứu đã ghi nhận sự thay đổi hệ vi sinh vật đường ruột liên quan đến bệnh tiểu đường type 2. Sau khi phân tích một nhóm bệnh nhân Trung Quốc mắc bệnh tiểu đường type 2, Qin và cộng sự thấy hệ vi sinh vật ở người tiểu đường có ít vi khuẩn sản xuất butyrate như *Clostridiales* sp., *F. prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* và *E. rectal* [59]. Hơn nữa, môi trường sống trong ruột người tiểu đường type 2 chứa mầm bệnh cơ hội bao gồm *Desulfovibrio* khử sulfate, *Bacteroides caccae* và *E. coli*. Để sáng tỏ hơn phát hiện này, một nghiên cứu ở phụ nữ sau mãn kinh ở Scandinavi cho thấy mức độ giảm của *F. prausnitzii* và *R. intestinalis* ở người tiểu

đường type 2 so với những người bị suy yếu dung nạp glucose. Ngoài ra, các nghiên cứu trên người tiểu đường type 2 ở Trung Quốc và Scandinavi đều cho thấy mức độ *Lactobacillus* tăng cao. Bệnh béo phì và rối loạn chuyển hóa glucose là do sự thay đổi tỷ lệ giữa Bacteroidetes và Firmicutes [60].



Hình 1.2. Hệ vi sinh vật đường ruột ở người khi chế độ ăn khác nhau [59]

Những người thừa cân và béo phì, chế độ ăn theo các nước phương Tây sẽ có xu hướng phát triển bệnh tiểu đường type 2. Trong khi những người khỏe mạnh có chế độ ăn uống cân bằng với hàm lượng cao các chất như axit béo không bão hòa, protein thực vật và chất xơ thì hệ vi sinh vật đường ruột sẽ giàu nhóm vi khuẩn *R. intestinalis*, *F. prausnitzii*, *E. rectale*, *Lactobacillus sp.* và *Clostridiales*, những người mắc bệnh tiểu đường type 2 sẽ có vi sinh vật thuộc chủng *Desulfovibrio sp.*, *Bacteroides sp.* và *Intestinibacter sp.* cao hơn.

Nghiên cứu của Trung Quốc cho thấy sự gia tăng *E. coli* ở bệnh nhân tiểu đường type 2 và một nghiên cứu khác của Đan Mạch cho thấy mức độ *Proteobacteria* đã tăng lên trong người tiểu đường type 2 [61]. Những vi khuẩn Gram âm này có khả năng liên quan đến sinh lý bệnh tiểu đường type 2. Cụ thể, lipopolysaccharit (LPS) do các vi khuẩn này tiết ra có thể thúc đẩy quá trình viêm nhiễm cận lâm sàng, điển hình cho cả bệnh tiểu đường và béo phì. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, đặc trưng của bệnh tiểu đường type 2 là do tăng nội độc tố. Thật vậy, những con chuột được ăn chế

độ ăn nhiều chất béo (HF) cho đến khi mắc bệnh tiểu đường sẽ bị nhiễm độc nội độc tố, tăng tính thấm ruột và hệ vi sinh vật khá khác biệt [40]. Ngoài ra, thuật ngữ nhiễm trùng chuyển hóa được dùng để mô tả vai trò của hệ vi sinh vật trong viêm nhiễm nội độc tố cùng với tình trạng kháng insulin ở tiểu đường type 2. Endotoxin có nguồn gốc vi sinh vật có thể đóng một vai trò trong tình trạng kháng insulin liên quan đến tiểu đường type 2 do nồng độ DNA của vi khuẩn trong máu (chủ yếu là Proteobacteria) đã được chứng minh là tăng trong tiền tiểu đường.

Cảnh báo hiện nay trong các nghiên cứu ở người là thiếu thông tin liên quan đến vai trò của thuốc trị đái tháo đường trong việc thay đổi hệ vi sinh vật. Đại diện cho loại thuốc đầu tiên được lựa chọn để điều trị bệnh tiểu đường type 2 là metformin. Các nghiên cứu của Thụy Điển, bệnh nhân tiểu đường được điều trị bằng metformin và hệ vi sinh vật của mình khi đã được làm giàu chi *Enterobacteriaceae* và có mức độ thấp hàm lượng chi *Eubacterium* và *Clostridium*. Ở những con chuột được cho ăn chế độ ăn nhiều chất béo, metformin đã được chứng minh ảnh hưởng đến cả quá trình chuyển hóa glucose của vật chủ cũng như hệ vi sinh vật bằng cách tăng lượng vi khuẩn *Akkermansia* [62]. Gần đây, điều trị metformin cũng đã được chứng minh là làm thay đổi thành phần vi sinh vật ở bệnh nhân tiểu đường type 2, kết quả là tăng *Escherichia* sp. và giảm sự phong phú của *Intestinibacter* sp [63].

SCFAs, BCAAs, succinate, indole và imidazole là các chất chuyển hóa của vi sinh vật kỵ khí ở ruột, các chất này hoạt động như các thành phần trung tâm trong các con đường truyền tín hiệu từ vi sinh vật đến vật chủ [64]. Các chất chuyển hóa này chủ yếu được tạo ra từ các chi vi khuẩn như *Prevotella*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium* và *Fusobacterium* [65]. Ở bệnh nhân tiểu đường type 2 phần lớn hệ vi sinh vật đặc biệt này bị cạn kiệt và ít hơn so với người không tiểu đường.

Butyrate, axetat và propionat là những SCFA phong phú nhất được tạo ra từ quá trình lên men chất xơ trong đường ruột [66]. Axetat và propionat hầu hết được tạo ra bởi ngành vi khuẩn Bacteroidetes, trong khi butyrat được tạo ra bởi ngành Firmicutes [67]. SCFAs được các tế bào niêm mạc ruột trực tiếp sử dụng làm nguồn năng lượng hoặc chuyển đến hệ tuần hoàn để tạo ra nguồn năng lượng quan trọng cho vật chủ và có khả năng hoạt động như các phân tử tín hiệu [66].

SCFA ảnh hưởng mạnh mẽ đến quá trình chuyển hóa glucose thông qua hoạt động kết hợp với các thụ thể được ghép nối với protein G (GPR) được chọn. Chúng được biểu hiện chủ yếu trong mô mỡ, ruột và các tế bào miễn dịch. Sự kích thích GPR43 và GPR119 thúc đẩy sự bài tiết của incretin GLP-1 từ các tế bào L đường ruột [68]. GLP-1 tăng cường giải phóng insulin từ tế bào β , ức chế bài tiết glucagon, bảo vệ tế bào β khỏi quá trình chết tế bào, thúc đẩy tăng sinh tế bào β và kéo dài thời gian vận chuyển đường ruột [69]. Kích thích thụ thể GPR41 bởi butyrate và propionate có khả năng tạo ra gluconeogene ở ruột thông qua hai cơ chế hoạt động khác nhau. Thứ nhất, bằng cách hoạt động như một chất chủ vận GPR41 giúp tăng cường biểu hiện gen tạo gluconeogenes ở ruột và thứ hai thông qua một mạch thần kinh não - ruột liên quan đến GPR41 [70].

SCFA cũng có thể tác động trực tiếp đến chuyển hóa glucose ở gan, làm giảm quá trình đường phân và tạo gluconeogene, tăng tổng hợp glycogen và giảm nồng độ axit béo trong huyết tương. SCFAs có khả năng kích hoạt hoạt động dây thần kinh phó giao cảm, làm tăng cảm giác thèm ăn và thúc đẩy bài tiết insulin do glucose kích thích [71].

SCFAs đã được chứng minh là tăng cường sự hấp thu glucose ở ngoại vi, bằng cách tăng sự biểu hiện của chất vận chuyển glucose loại 4 (GLUT4), thông qua hoạt động của protein kinase (AMPK). Thứ hai, trong cơ xương, SCFAs có khả năng giảm đường phân từ đó dẫn đến tăng tổng hợp glycogen [72].

Acetate, SCFA được biểu mô ruột hấp thu, vận chuyển đến gan qua tĩnh mạch cửa, và cuối cùng được phân phối đến các mô ngoại vi nơi nó được chuyển hóa. Acetate toàn thân có khả năng vượt qua hàng rào máu não, nơi nó có thể kích hoạt acetyl-CoA carboxylase dẫn đến tăng cường sự biểu hiện của các neuropeptide gây kích hoạt tế bào thần kinh vùng dưới đồi và ngăn chặn sự thèm ăn [73].

Butyrate là cơ chất và nguồn năng lượng chính cho tế bào đại tràng, cung cấp ít nhất 60-70% năng lượng cho tế bào niêm mạc ruột kết. Butyrate rất quan trọng trong việc duy trì cân bằng nội môi biểu mô ruột kết chủ yếu bằng cách sử dụng các đặc tính chống viêm của nó, do đó ngăn chặn việc sản xuất oxy phản ứng và các loại nitơ được tạo ra trong stress oxy hóa. Sự phong phú của vi sinh vật sản xuất butyrate có liên quan đến phản ứng insulin trong quá trình thử nghiệm dung nạp glucose qua đường miệng (một dấu hiệu cho thấy chức năng tế bào β được cải thiện) [74].

Propionate được sản xuất qua đường ruột là một tiền chất ưu tiên đã biết để tạo gluconeogenesis, trong đó khoảng 50% được sử dụng theo cách này. Propionate đi vào chu trình axit tricarboxylic (TCA) và được chuyển thành succinyl-CoA thông qua ba phản ứng liên tiếp. Kết quả succinyl-CoA quay lại chu trình TCA và được chuyển thành oxaloacetate, tiền chất tạo gluconeogenesis [75].

Sự phân phối propionate tăng lên ở ruột có liên quan đến chức năng tế bào β tăng cường và sự bài tiết insulin được điều tiết bằng glucose mà không phụ thuộc vào sự thay đổi mức GLP-1. Propionate bảo vệ tế bào β tuyến tụy của người thông qua việc ức chế trực tiếp quá trình chết tế bào gây ra bởi các cytokine gây viêm. Bổ sung propionate cho người thừa cân thông qua ăn uống sẽ giảm năng lượng tiêu thụ, đồng thời tăng nồng độ peptide YY (PYY) và GLP-1 trong huyết tương [76].

Khuyến khích bệnh nhân ăn một chế độ ăn nhiều chất xơ đã được chứng minh là cải thiện lượng vi sinh vật sản xuất SCFA, dẫn đến giảm mức HbA1c do tăng sản xuất GLP-1. Nghiên cứu ở các nhóm người thuần tập cho thấy nhóm ăn nhiều chất xơ có mức HbA1c giảm (HbA1c <7%) so với nhóm đối chứng [77]. Nồng độ butyrate trong huyết tương sau ăn cao hơn được tìm thấy ở những người sự phong phú của các loài *Intestinimonas butyriciproductio*ns và *Akkermansia muciniphila* lớn hơn. Nồng độ butyrate tương quan trực tiếp với độ nhạy insulin sau ăn, được đánh giá bằng độ nhạy insulin đường uống (OGIS) [78].

Vi khuẩn lên men chất xơ thực phẩm tạo ra một lượng lớn succinate giúp cải thiện gia tăng glucose máu thông qua việc kích hoạt quá trình tạo gluconeogenesis ở ruột, điều này cũng đúng với các acid béo chuỗi ngắn là butyrate và propionate [79].

1.3. Kỹ thuật metagenomics và ứng dụng trong nghiên cứu hệ vi sinh vật

1.3.1. Khái quát về metagenomics

Năm 1998, Handelsman, Goodman và một số tác giả là những người đầu tiên sử dụng thuật ngữ “metagenomics”. Metagenomics là ngành công nghệ nghiên cứu về metagenome với nguồn vật liệu là DNA/RNA. Metagenomics là sự phân tích đa hệ gen của tất cả các vi sinh vật thu nhận trực tiếp từ mẫu môi trường tự nhiên mà không thông qua nuôi cấy. Do đó, metagenomics cho phép phân tích toàn thể vi sinh vật sống trong bất kỳ môi trường tự nhiên nào [80].

Theo ước tính Trái Đất có trên 10^{30} loài prokaryote đang sống, trong đó khoảng

95-99% vi sinh vật chưa thể nuôi cấy được trong phòng thí nghiệm [59]. Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển nhanh của công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới, kỹ thuật metagenomics cho phép giải mã khối lượng gen đồ sộ từ vi sinh vật thu được trong một mẫu môi trường mà không cần nuôi cấy. Nguồn dữ liệu phong phú này cho phép khai thác tối đa nguồn gen quý cũng như tìm hiểu cơ chế tác động giữa các vi sinh vật với hệ sinh thái.

Cộng đồng vi khuẩn đóng một vai trò quan trọng trong việc bảo vệ sức khỏe con người. Tuy nhiên, thành phần và cơ chế hoạt động của chúng vẫn còn rất nhiều bí ẩn. Dự án của “Human Microbiom” bước đầu đã sử dụng trình tự metagenome của các cộng đồng vi khuẩn ở 15-18 vị trí khác nhau trên cơ thể của ít nhất 250 người để đánh giá sự thay đổi và mối quan hệ của chúng với sức khỏe của con người. Một nghiên cứu y tế khác của dự án MetaHit (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) tiến hành ở 124 cá nhân từ Đan Mạch và Tây Ban Nha mắc bệnh đường ruột, thừa cân và béo phì đã công bố thông tin về sự đa dạng phát sinh loài vi khuẩn tiêu hóa. Nghiên cứu đã chứng minh rằng hai ngành vi khuẩn Bacteroidetes và Firmicutes chiếm hơn 90% của các loài được biết đến đang thống trị vi khuẩn đường ruột. Sử dụng tần số gene liên quan được tìm thấy trong ruột đã xác định 1244 cụm gene của metagenome là cực kỳ quan trọng cho sức khỏe của đường ruột. Bệnh nhân bị hội chứng ruột kích thích chỉ có 75% các gene trên và tính đa dạng vi khuẩn thấp hơn so với cá nhân không bị hội chứng ruột kích thích. Nghiên cứu cũng đã chỉ ra sự thay đổi đa dạng của quần xã vi sinh vật của bệnh nhân có thể liên quan với bệnh đường ruột hoặc béo phì. Trên cơ sở các nghiên cứu về metagenome của hệ vi sinh vật hoạt động ở cơ thể người để phát triển các công cụ và công nghệ sinh học mới hỗ trợ các mục tiêu của y học. Một số nghiên cứu khác về metagenomics cho phép phát hiện ra virus - nguyên nhân gây ra một số bệnh ung thư ở người.

Tại nước ta, các nghiên cứu đa hệ gen của vi sinh vật không thông qua nuôi cấy đã được triển khai trong những năm gần đây. Từ năm 2012-2015, nhóm nghiên cứu của GS. TS Trương Nam Hải tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã áp dụng kỹ thuật metagenomics để phân lập hệ gen mã hóa enzyme thủy phân lignocellulose từ khu hệ vi sinh vật ruột mối Việt Nam. Công trình đã xác định được 316 ORF mã hóa cellulase, 259 ORF mã hóa

hemicellulase và 12 ORF mã hóa pectatelyase và pectinesterase [81]. Đặc biệt từ năm 2014, Bộ Khoa học và Công nghệ đã phê duyệt danh mục dự án khoa học và công nghệ cấp quốc gia nhằm mục đích khai thác hiệu quả nguồn gen phong phú và đa dạng của vi sinh vật với tên gọi: “*Nghiên cứu metagenome của vi sinh vật từ một số môi trường đặc thù nhằm tìm kiếm các gen, enzyme, chất xúc tác sinh học mới để sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ đời sống, bảo vệ sức khỏe con người và môi trường*”. Dự án được triển khai theo các hướng như khai thác được các gen mới có khả năng phân hủy dioxin; nghiên cứu đa hệ gen của vi sinh vật đất vùng rẫy để tăng năng suất chất lượng của một số loại cây trồng; sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học mới từ vi sinh vật liên kết với hải miên và nghiên cứu đa hệ gen của vi sinh vật trong các đầm nuôi tôm hướng tới phát triển nghề nuôi tôm. Đây là những nghiên cứu đầu tiên ứng dụng kỹ thuật metagenomics để giải các bài toán có tính chất tổng thể, đánh giá đa dạng và tiềm năng di truyền của vi sinh vật từ hệ sinh thái, môi trường Việt Nam [82].

1.3.2. Nền tảng của kỹ thuật metagenomics

1.3.2.1. Các thiết bị giải trình tự gen thế hệ mới

Trước đây, nghiên cứu vi sinh vật dựa trên cách phân lập và nuôi cấy truyền thống trong các môi trường, đây là một việc tốn kém về thời gian và công sức. Thêm vào đó, có tới 99% vi sinh vật không thể được nuôi cấy bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn. Do đó, metagenomics đã trở thành kỹ thuật được lựa chọn phổ biến và là cơ sở của phát sinh loài với độ chính xác cao hơn, và cho kết quả nhanh hơn [83].

1.3.2.2. Máy giải trình tự Illumina

Một số loại máy giải trình tự đã được Illumina phát triển và đưa ra thị trường là NovaSeq, NextSeq, HiSeq, HiSeq X, HiScanSQ, MiSeq,... Trong đó, NovaSeq 6000 là thiết bị mới nhất được hãng Illumina giới thiệu. Tuy nhiên, các thiết bị MiSeq và HiSeq được sử dụng phổ biến nhất trong các nghiên cứu. Các thiết bị đọc trình tự của Illumina đều cho kích thước đoạn đọc khoảng 200-300 bp [84].

Các máy giải trình tự Illumina có thể được ứng dụng trong các lĩnh vực sau:

- Đọc các trình tự DNA hệ gen hoặc các gen đích;
- Phân tích điều hòa hoạt động của gen;
- Phân tích mức độ phiên mã trên cơ sở số lượng và chất lượng trình tự, phân

tích toàn bộ transcriptome liên quan đến mức độ biểu hiện và các dạng RNA;

- Phân tích tương tác DNA-protein (ChIP-SEQ) tạo ra các bản đồ chính xác của các vị trí liên kết cho bất kỳ loại protein quan tâm;

- Phân tích và phát hiện tiểu RNA: Các tiểu RNA thường có chức năng điều hòa ví dụ như microRNA (miRNA). Các Illumina GA với dung lượng đọc ngắn là thể hệ máy lựa chọn cho đọc trình tự tiểu RNA.

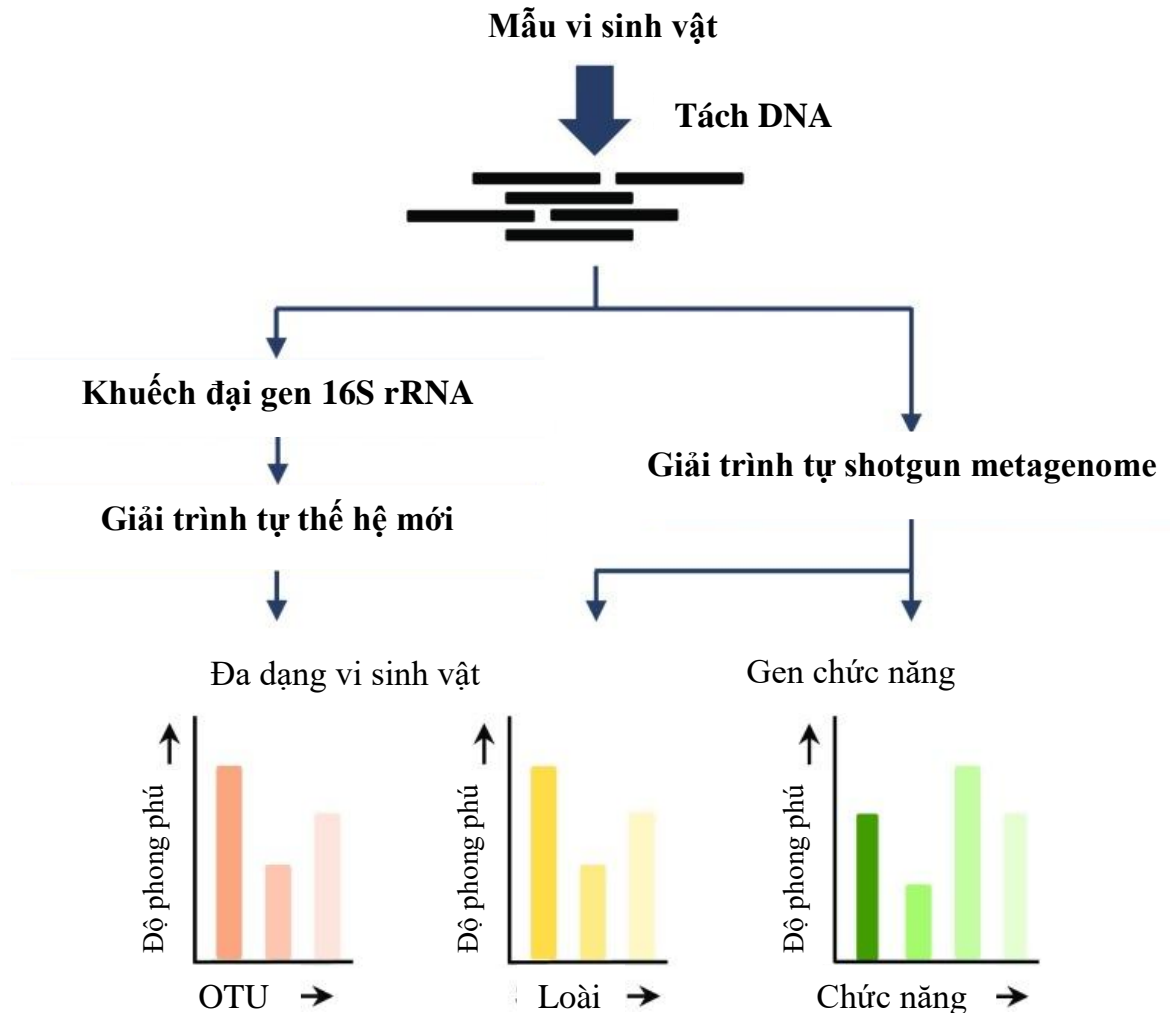
- Nghiên cứu metagenomics và metatranscriptomics

1.3.2.3. Giải trình tự gen thế hệ mới ứng dụng trong nghiên cứu metagenome

Các nghiên cứu metagenome được tiến hành nhằm phân tích thành phần và chức năng các loài trong các hệ sinh thái vi sinh vật. Có hai cách tiếp cận khi sử dụng các thiết bị giải trình tự gen thế hệ mới trong các cứu metagenome đó là: (1) Giải trình tự các đoạn khuếch đại ngắn (amplicon) hoặc (2) Giải trình tự shotgun (Hình 1.3).

Trong cách tiếp cận đầu tiên, các vùng cụ thể trong DNA từ các quần xã vi sinh vật được khuếch đại bằng cách sử dụng các cặp mồi dùng trong phân loại phân tử trên các vùng gen 16S rRNA cho sinh vật nhân sơ và vùng gen ITS của sinh vật nhân chuẩn. Giải trình tự shotgun có thể giúp tái tạo lại các đoạn gen lớn hoặc bộ gen hoàn chỉnh của các sinh vật trong cộng đồng mà trước đó không phân lập được, cách tiếp cận này cho phép xác định đặc điểm của một số lượng lớn các trình tự mã hóa và không mã hóa để làm dấu hiệu phát sinh loài.

Cả hai cách tiếp cận đều bắt đầu bằng việc tách DNA từ các quần xã vi sinh vật. Tiếp đó, DNA sẽ được khuếch đại bằng PCR với các cặp mồi của gen 16S rRNA (với giải trình tự NGS gen 16S rRNA) hoặc bị cắt thành các đoạn DNA ngắn (shotgun metagenomics). Các đoạn khuếch đại của gen 16S rRNA, hoặc các đoạn DNA cắt ngắn được giải trình tự bằng kỹ thuật NGS. Cuối cùng, tất cả dữ liệu trình tự được xử lý bằng cách sử dụng các công cụ tin sinh học cho phép nhà nghiên cứu làm sáng tỏ thành phần phân loại hoặc vai trò của gen chức năng trong mẫu phân tích [85].

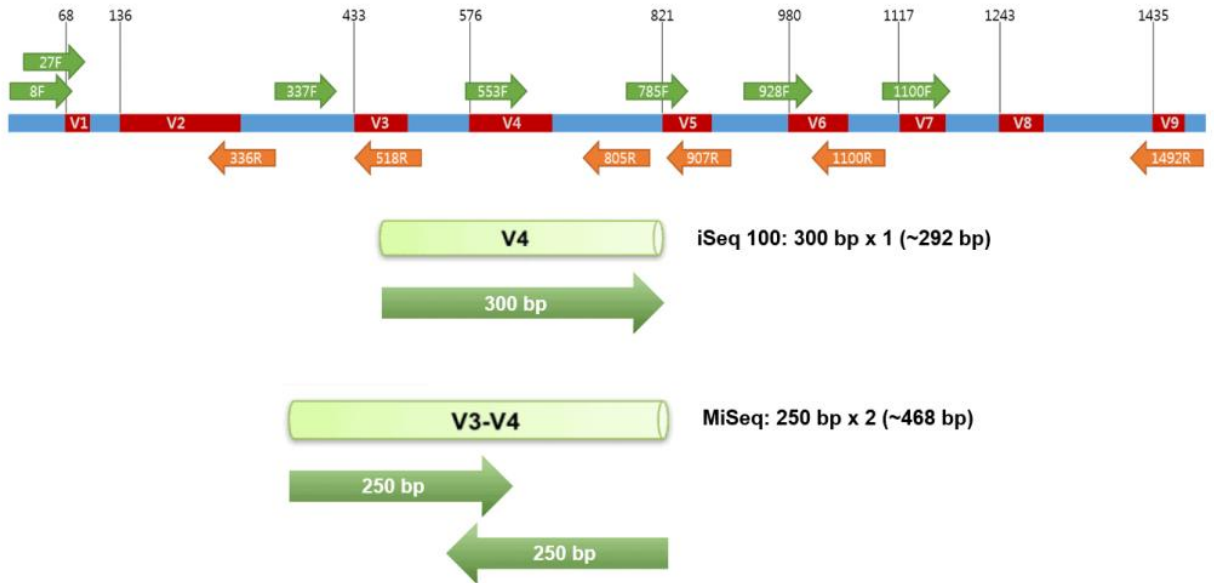


Hình 1.3. Tổng quan về giải trình tự gen 16S rRNA và giải trình tự shotgun trong nghiên cứu metagenome

1.3.2.4. Nghiên cứu metagenome dựa trên giải trình tự gen 16S rRNA

16S rRNA là viết tắt của 16S ribonucleic axit (rRNA) của ribosome, trong đó S là đơn vị Svedberg - đơn vị đo tốc độ lắng. 16S rRNA này là một thành phần quan trọng của tiểu đơn vị nhỏ (Small Subunit - SSU) của ribosome nhân sơ cũng như ti thể và lục lạp. Đoạn DNA mã hóa rRNA được gọi là gen rRNA hoặc rDNA. Gen 16S rRNA được sử dụng làm mã vạch phân tử cho các nghiên cứu định danh và phân loại vi khuẩn bởi chúng có mặt ở tất cả các loài vi khuẩn và vi khuẩn cổ. Gen 16S rRNA không quá dài cũng không quá ngắn, có kích thước khoảng 1500 bp, đủ chứa các thông tin về phát sinh loài và sự biến đổi di truyền trong gen 16S rRNA được tìm thấy giữa các sinh vật nhân sơ là đủ để sử dụng được trong phân tích thành phần loài. Gen 16S rRNA có 9 vùng siêu biến ký hiệu từ V1-V9. Các vùng này có kích thước trung bình khoảng 30-100 bp, xen kẽ các vùng siêu biến là các vùng bảo thủ, hầu như không thay đổi giữa các loài vi sinh vật. Do đó, trình tự gen của các vùng

bảo thủ được sử dụng để thiết kế các môi giúp nhân các vùng gen siêu biến [86].



Hình 1.4. Sơ đồ cấu trúc các vùng trên gen 16S rRNA và các cặp môi dùng để khuếch đại các vùng gen siêu biến [87]

Gen 16S rRNA đã được sử dụng để suy ra mối quan hệ phát sinh loài giữa các ngành cũng như so sánh giữa các loài trong cùng một chi [88]. Một trong những ưu điểm của gen 16S rRNA chúng dễ dàng được khuếch đại trong PCR. Trên gen có các vùng bảo thủ dùng để thiết kế môi điều này trở thành một lợi thế đáng kể cho trình tự đọc ngắn dựa trên máy giải trình tự thế hệ mới [89].

Có ba phương pháp phổ biến để giải trình tự gen 16S rRNA của các nền tảng máy thế hệ mới bao gồm:

- Đọc trình tự single-end: Các đoạn DNA được đọc trình tự 1 chiều từ các sản phẩm PCR. Thường sử dụng phương pháp này trên nền tảng máy NGS đời đầu như Roche 454 và Ion Torrents.

- Đọc trình tự đoạn Paired-end: Các đoạn DNA được đọc trình tự từ 2 đầu của sản phẩm PCR. Hai trình tự này sau đó sẽ được ghép lại để trở thành 1 đoạn đơn hoàn chỉnh. Hiện nay, phương pháp đọc trình tự này được áp dụng phổ biến trên các hệ máy Illumina.

- Đọc trình tự đoạn dài đơn phân tử theo giờ gian thực: phương pháp này được áp dụng trên thiết bị giải trình tự thế hệ mới PacBio Sequel. Các thiết bị này có khả năng đọc đoạn đơn dài trên 10 kb. Với các đoạn gen 16S có kích thước khoảng 1,5 kb sẽ được đọc lặp lại nhiều lần, do đó sẽ tăng độ chính xác của các trình tự được giải.

Việc lựa chọn các vùng gen để khuếch đại là bước tiếp theo trong quá trình phân tích metagenomics. Gen 16S rRNA có 9 vùng siêu biến có thể sử dụng để giải trình tự trong các phân tích metagenome. Khi phân tích thành phần loài, có thể lựa chọn các vùng V3-V5 hoặc vùng V1-V2 [90]. Xác định thành phần các loài vi khuẩn cổ, vùng V1-V4 cho kết quả phân tích tốt nhất ở mức độ chi (genus), và vùng V3-V5 cho kết quả tốt nhất ở mức độ họ (family). Với phân tích ở vi khuẩn, vùng V1-V4 cho kết quả tốt nhất ở mức độ loài, và có tỉ lệ lỗi đọc trình tự ít nhất. Vùng V3-V4 cho kết quả tốt nhất với tỉ lệ lỗi đọc trình tự thấp hơn so với vùng V8-V9, cũng như phù hợp hơn trong các phân tích nhóm loài [89].

Lượng dữ liệu giải trình tự gen thể hệ mới như 16S rRNA metagenome được tạo ra ngày càng lớn dẫn đến sự ra đời của các công cụ phân tích tin sinh học cho phép xử lý loại dữ liệu này. Một số công cụ phân tích phổ biến có thể kể đến như QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), Mothur, MG-RAST (Metagenomics-Rapid Annotation using Subsystems Technology). Trong đó QIIME và Mothur là phần mềm mã nguồn mở viết trên nền ngôn ngữ Python và C++ còn MG-RAST là cụ online [91]. Phân tích bằng MG-RAST không yêu cầu người sử dụng lệnh, do đó phù hợp với các nhà nghiên cứu không có nhiều kinh nghiệm về tin sinh học. Tuy nhiên, phân tích với MG-RAST tiêu tốn rất nhiều thời gian do mức độ ưu tiên của dữ liệu được công bố sau khi phân tích (<http://metagenomics.anl.gov/>). Do đó, đến nay nhiều nhà nghiên cứu vẫn thường lựa chọn Mothur và QIIME là 2 phần mềm chính để xử lý các số liệu giải trình tự 16S rRNA.

QIIME sử dụng để thực hiện phân tích vi sinh vật từ dữ liệu trình tự DNA thô, được viết dựa trên ngôn ngữ lập trình Python. QIIME được thiết kế để đưa người dùng từ dữ liệu trình tự thô được tạo ra trên hệ thống giải trình tự Illumina hoặc các nền tảng khác. Các bước giải trình tự bao gồm demultiplexing và lọc trình tự, lựa chọn OUT; chọn, phân loại, phân tích đa dạng và mô hình hóa. QIIME đã được áp dụng cho các nghiên cứu dựa trên hàng tỷ chuỗi từ hàng chục ngàn mẫu.

Mothur là phần mềm được viết trên nền ngôn ngữ lập trình C++. Đây là sản phẩm do tiến sĩ Patrick Schloss và nhóm phát triển phần mềm của ông tại Bộ môn Vi sinh học và Miễn dịch học tại Đại học Michigan cho ra đời vào năm 2009. Dự án này nhằm mục đích phát triển một phần mềm mã nguồn mở, có khả năng mở rộng nhu cầu tin sinh học của sinh thái vi sinh vật. Mothur là sự đã kết hợp các chức năng của

dotur, sons, treeclimber, slibshuff, unifrac.

Điểm chung của 2 phần mềm Mothur và QIIME là đều đưa ra số liệu OUT cho các phân tích tiếp theo, đây là đơn vị phân loại cơ bản mà các trình tự được so sánh với một cơ sở dữ liệu và phân loại dựa trên mức độ tương đồng (thông thường, các trình tự tương đồng nhau 97% được xếp vào cùng một chi). Mặc dù được sử dụng phổ biến nhưng chưa có nhiều công bố so sánh giữa chức năng và sự tiện dụng của các công cụ phân tích tin sinh học này. Năm 2014, Nilakanta và cộng sự đã so sánh 7 phần mềm phân tích dữ liệu 16S đáp ứng các tiêu chí gồm miễn phí, đầy đủ các chức năng phân tích cũng như tính bảo mật số liệu cao. Nhóm tác giả đã lựa chọn được 2 phần mềm QIIME và Mothur là phù hợp hơn cả do tính tiện dụng và có có đầy đủ các hướng dẫn khi có phát sinh lỗi trong quá trình sử dụng [92].

1.3.2.4. Nghiên cứu metagenome dựa trên giải trình tự shotgun

Shotgun metagenomics là một cách tiếp cận nhằm xác định đặc điểm của các cộng đồng vi sinh vật, tạo ra một lượng thông tin phong phú và đầy đủ cho tất cả các gen chức năng (gồm cả các gen 16S rRNA). Thông thường, giải trình tự shotgun metagenomics bằng các máy giải trình tự gen thế hệ mới sẽ thu được một lượng lớn các đoạn trình tự ngắn (các read), các đoạn này được sử dụng để lắp ráp thành trình tự dài hơn gọi là contig và scaffold. Sau đó, sử dụng các đoạn scaffold để chú giải các khung đọc mở (ORF – Open Reading Frame), từ đó dự đoán các protein giả định tham gia vào các quá trình trao đổi chất của từng tế bào vi sinh vật cũng như xây dựng mô hình tương tác giữa các loài trong quần xã vi sinh vật [93].

Có 2 chiến lược được sử dụng để lắp ráp các contig và scaffold là lắp ráp dựa trên trình tự tham chiếu (reference-based assembly) và lắp ráp de novo. Phương pháp lắp ráp dựa trên trình tự tham chiếu dựa trên trình tự đã biết được thực hiện bằng phần mềm chuyên dụng với ưu điểm nhanh và hiệu quả. Hạn chế của phương pháp này phụ thuộc rất lớn vào dữ liệu tham chiếu, nếu dữ liệu metagenomic chứa các trình tự gần gũi với dữ liệu genome tham chiếu sẽ thu được kết quả tốt. Trên thực tế, phương pháp này thường cho kết quả lắp ráp ngắn và không bao phủ được toàn bộ genome [94]. Với phương pháp lắp ráp de novo, nhiều công cụ tin sinh học dựa trên thuật toán xây dựng đồ thị de Bruijn [95] đã được phát triển để có thể lắp ráp được một số lượng khổng lồ các read từ dữ liệu metagenomic, như SOAPdenovo2 vr240 [96], ABySS 2.0 [97], IDBA-UD [98] và ALLPATHS-LG [99]. Hạn chế của phương pháp lắp ráp

denovo là cần hệ thống máy tính có cấu hình mạnh và tốn nhiều thời gian nhưng kết quả thu được có mức độ bao phủ toàn bộ genome rất cao.

Các đoạn contig và scaffold được lắp ráp sẽ được sử dụng để chú giải metagenome. Có 2 cách chú giải metagenome gồm:

- Các hệ gen riêng rẽ được lắp ráp lại từ dữ liệu metagenome, sau đó so sánh, chú giải với các cơ sở dữ liệu online như RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) [100] hay IMG (Integrated Microbial Genome) [101].

- Chú giải toàn bộ metagenome dựa vào các trình tự contig hoặc các trình tự scaffold. Cách này cung cấp bức tranh đầy đủ hơn cả về đa dạng vi sinh vật và gene chức năng trong mẫu nghiên cứu, các bước thực hiện gồm:

- + Dự đoán các vùng mã hóa (CDS – coding sequences) hay các khung đọc mở (ORF).

- + Chú giải chức năng giả định của các CDS và nghiên cứu sự phát sinh chủng loại của các trình tự này. Nhiều công cụ tin sinh đã được phát triển để dự đoán các CDS với độ chính xác cao như FragGeneScan [102], MetaGeneAnnotator [103]... Trong đó, FragGene Scan là phần mềm có tỷ lệ dự đoán chính xác cao nhất với tỉ lệ dự đoán lỗi chỉ 1-2%. Tiếp theo, để chú giải chức năng và nghiên cứu nguồn gốc phân loại của các CDS được dự đoán, các CDS này được so sánh với các trình tự đã biết chức năng trên các CSDL như KEGG [104], eggNOG [105], COG/KOG [106], PFAM [107]... Các cơ sở dữ liệu tham chiếu không bao hàm tất cả các chức năng sinh học, tuy nhiên các CSDL này cũng có thể được chú giải nhờ các hệ thống máy chủ chứa tất cả các CSDL nói trên như hệ thống MG-RAST [108], IMG/M và CAMERA [109].

Kết quả của bước chú giải phụ thuộc vào các phần mềm miễn phí hoặc có tính phí cũng như các cơ sở dữ liệu có thể tiếp cận được. Mặt khác, ngoài kết quả là các biểu đồ, con số phản ánh bức tranh vi sinh vật, việc xác định các gen chức năng cũng như phân lập và thực hiện tái tổ hợp là hoàn toàn có thể thực hiện được một cách hướng đích.

1.3.3. Ứng dụng của metagenomics

1.3.3.1. Ứng dụng của metagenomics trong đánh giá sự đa dạng vi sinh vật

Năm 2010, bằng phương pháp giải trình tự thông lượng cao, DNA của toàn bộ

vi sinh vật có trong 124 mẫu phân người Châu Âu đã được đọc trình tự có kích thước lên đến 576,7 Gb. Số gen vi sinh vật được dự đoán từ trình tự là 3,3 triệu gen (lớn hơn 150 lần so với số gen của một hệ gen hoàn chỉnh của người). Trong đó, hơn 90% gen là của vi khuẩn, phần còn lại chủ yếu là gen của vi khuẩn cổ, chỉ 1% là gen của sinh vật nhân thực và virus. Kết quả phân tích cũng cho thấy, hơn 99% gen vi khuẩn thuộc trong nhóm 1000 loài vi khuẩn phổ biến [110].

Năm 2012, Lelie và cộng sự nghiên cứu DNA đa hệ gen của quần xã vi sinh vật kỵ khí phân hủy vụn gỗ bạch dương được đọc bằng máy thế hệ mới 454. Với DNA đa hệ gen có kích thước 674.959.683 base, 893.380 gen được dự đoán cùng với sự đa dạng vi sinh vật và chức năng. Về đa dạng, 2 ngành Fimicutes (45,9%) và Proteobacteria (32,3%) chiếm ưu thế nhất. Trong ngành Fimicutes, lớp Clostridia chiếm ưu thế nhất, đặc biệt là bộ Clostridiales (37,5%). Các loài của chi *Clostridium* như *C. cellulolyticum* và *C. thermocellum* chiếm gần 64% bộ Clostridiales và chiếm đến 6,3% vi sinh vật trong quần xã [110], [108].

Nhằm nghiên cứu sự đa dạng vi sinh và nguồn gen mã hóa protein chịu nhiệt có hoạt tính carbohydrate, Xia và cộng sự đã tách chiết DNA đa hệ gen vi sinh vật ưa nhiệt sống trong bùn cellulose. DNA đa hệ gen có kích thước 1,2 Gb được đọc trình tự bằng máy giải trình tự hiệu năng cao của Illumina. Kết quả phân tích trình tự cho thấy, trong môi trường nghiên cứu, chi vi khuẩn phân hủy cellulose là *Clostridium* và chi vi khuẩn sinh methan *Methanothermobacteri* chiếm ưu thế. Tổng số 31.499 ORF với kích thước trung bình mỗi ORF là 852 bp được dự đoán chức năng và 253 gen chịu nhiệt đã được dự đoán có hoạt tính carbohydrate. Các gen được dự đoán liên quan đến quá trình chuyển hóa carbohydrate có mức độ tương đồng từ 20% đến 100% so với các trình tự axit amin tương ứng với CSDL của NCBI [111].

Kết quả phân tích DNA đa hệ gen vi sinh vật của hai mẫu đất rừng ngập mặn thu ở Rio de Janeiro (RJ) và Bahia (BA) cho thấy số lượng loài có mặt ở cả hai mẫu môi trường khá tương đương nhau, RJ là 974.385 và BA là 847.721. Trong đó, các ngành vi khuẩn chiếm ưu thế giống nhau ở cả 2 mẫu môi trường là Proteobacteria (57,8% và 44,6%), Fimicutes (11% và 12,3%) và Actinobacteria (8,4% và 7,5%). Xu và cộng sự đánh giá DNA đa hệ gen của 33 mẫu đất lấy từ đất rừng, đất sa mạc, đất trồng cỏ, đất Arctic và đất rừng ngập mặn. Vi sinh vật có mặt trong đất gồm 11 ngành và 53 chi. Trong đó, Proteobacteria là ngành chiếm tỷ lệ cao nhất, trừ mẫu đất sa mạc.

Ở đất sa mạc, cả 2 ngành Proteobacteria (30%) và Actinobacteria (29%) chiếm ưu thế [112].

1.3.3.2. Ứng dụng Metagenomics trong nghiên cứu khu hệ vi khuẩn liên quan đến bệnh tiểu đường

Một số nghiên cứu cho thấy người mắc bệnh tiểu đường type 2 có biểu hiện rối loạn hệ vi sinh vật đường ruột. Nghiên cứu của Larsen cho thấy, ở cấp độ ngành sự phong phú của Firmicutes ở người mắc bệnh tiểu đường type 2 thấp hơn so với nhóm đối chứng nhưng Bacteroidetes và Proteobacteria lại phong phú hơn. Ngoài ra các nghiên cứu khác đã chứng minh chứng rối loạn vi khuẩn ở người mắc bệnh tiểu đường type 2. Chứng loạn khuẩn ở người mắc bệnh tiểu đường type 2 có thể do sự tương tác của hệ vi sinh vật đường ruột với hệ thống miễn dịch của vật chủ. So sánh thành phần của khu hệ vi khuẩn đường ruột trong một số nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 1.6

Bảng 1.6. So sánh thành phần khu hệ vi khuẩn đường ruột của nhóm nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2 và nhóm nam giới không mắc bệnh tiểu đường

Phân loại vi sinh vật	Người tiểu đường type 2	Người khỏe mạnh
Nghiên cứu của Larsen [62]		
Ngành vi sinh vật	<i>Bacteroidetes</i> ↑, <i>Proteobacteria</i> ↑	<i>Firmicutes</i> ↓
Lớp vi sinh vật	<i>Bacilli</i> , <i>Bacteroidetes</i> ↑, <i>Betaprobacteria</i> ↑	<i>Clostridia</i> ↓
Chi vi sinh vật	<i>Akkermansia</i> ↑, <i>Alistipes</i> ↑, <i>Bilophila</i> ↑, <i>Dialister</i> ↑, <i>Dorea</i> ↑, <i>Parabacteroides</i> ↑, <i>Prevotella</i> ↑, <i>Sporobacter</i> ↑, <i>Succinivibrio</i> ↑, <i>Sutterella</i> ↑	
Loài vi sinh vật		<i>Dorea longicatena</i> ↓
Nghiên cứu của Zhang [56]		

Phân loại vi sinh vật	Người tiểu đường type 2	Người khỏe mạnh
Lớp vi sinh vật	<i>Clostridia</i> ↑, <i>Clostridiales</i> ↑	
Họ vi sinh vật	<i>Lachnospiraceae</i> ↑	
Chi vi sinh vật	<i>Abiotrophia</i> ↑, <i>Collinsella</i> ↑, <i>Dorea</i> ↑, <i>Eubacterium</i> ↑, <i>Peptostreptococcus</i> ↑, <i>Prevotella</i> ↑, <i>Ruminococcus</i> ↑, <i>Sporobacter</i> ↑, <i>Subdoligranulum</i> ↑	<i>Bacteroides</i> ↓, <i>Haemophilus</i> ↓, <i>Megamonas</i> ↓, <i>Roseburia</i> ↓
Nghiên cứu của Ahmad [113]		
Ngành vi sinh vật		<i>Bacteroidetes</i> ↓, <i>Elusimicrobia</i> ↓, <i>Firmicutes</i> ↓, <i>Proteobacteria</i> ↓, <i>Verrucomicrobioa</i> ↓
Lớp vi sinh vật	<i>Clostridia</i> ↑, <i>Coriobacteria</i> ↑, <i>Negativicutes</i> ↑	<i>Bacilli</i> ↓, <i>Bacteroidia</i> ↓, <i>Deltaproteobacteria</i> ↓, <i>Elusimicrobia</i> ↓, <i>Gammaproteobacteria</i> ↓
Chi vi sinh vật	<i>Allisonella</i> ↑, <i>Christensenellaceae</i> ↑, <i>Dialister</i> ↑, <i>Lactobacillus</i> ↑	<i>Bacillus</i> ↓, <i>Prevotella</i> ↓, <i>Ruminococcus</i> ↓

1.3.3.3. Tiềm năng ứng dụng của Metagenomics

Tiềm năng ứng dụng của metagenomics rất lớn, nhất là đối với các lĩnh vực Khoa học Y sinh, Năng lượng sinh học, Xử lý môi trường, Công nghệ sinh học, Khoa học Trái đất, Khoa học Sự sống, Nông nghiệp và Giám định vi sinh vật. Việc khám

phá các quần xã vi sinh vật ở môi trường đất, nước và sinh vật giúp con người hiểu rõ hơn mối quan hệ giữa chúng với nhau, giữa chúng với môi trường sống từ đó ứng dụng trong các lĩnh vực cụ thể. Ví dụ, dự đoán những thay đổi toàn cầu có thể xảy ra (Khoa học trái đất); phát hiện thuốc mới cho con người giúp điều trị và ngăn ngừa bệnh (Y học); sử dụng vi sinh vật để xử lý ô nhiễm môi trường; phát triển ngành công nghiệp mới, công nghiệp thực phẩm (Công nghệ sinh học); cải thiện các phương pháp phát hiện tác nhân gây bệnh, tận dụng mối quan hệ có lợi giữa vi sinh vật và vật nuôi – cây trồng (Nông nghiệp) [114].

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 Soil 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 (gentians, lugol, fuchsin, 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 ỏn 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 nhận được từ Bộ sưu tập của phòng Công nghệ vật liệu sinh học - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

- Môi trường MRS nuôi cấy và phân lập vi khuẩn lactic: Peptone (10 g/L), cao thịt (10 g/L), cao nấm men (4 g/L), glucose (20 g/L), CH_3COONa (5 g/L), tween 80 (1 mL/L), K_2HPO_4 (2 g/L), triamonium citrate (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L), MnSO_4 (0,05 g/L). Điều chỉnh pH bằng dung dịch NaOH hoặc HCl tùy theo dung dịch sau khi pha có nồng độ pH tương ứng thấp hay cao hơn hơn 6.2. Với môi trường thạch bổ sung thêm agar nồng độ từ 1-2% (10-20 g trong 1 lít môi trường).

- Môi trường LB (g/l) nuôi vi khuẩn kiểm định (*E. coli* và *S. aureus*): Pepton 5 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 3 g/L, agar 2%, nước cất 1 L, pH 6,5 – 7.

2.1.5. Trình tự cặp mồi

Một số đoạn mồi quan trọng trong các nghiên cứu sinh học phân tử được đặt mua tại Công ty Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam) có trình tự cụ thể được liệt kê trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Trình tự một số đoạn mồi sử dụng trong luận án

Mồi	Trình tự	Kích thước sản phẩm PCR
341F	5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'	~ 460 bp, vùng V3-V4 [115]
806R	5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'	
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	~ 1500 bp, toàn bộ gen 16S [115]
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	

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 được chọn tham gia trong nghiên cứu này là những người mắc bệnh tiểu đường type 2 tính từ năm 2012 trở về trước (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, Low Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C), High Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C), Triglyceride, AST, ALT nằm ngoài khoảng giá trị thông thường và có chỉ số khối cơ thể lớn hơn 30.

Nhóm đối chứng (người không tiểu đường): Người không tiểu đường tham gia trong nghiên cứu này có chỉ số glucose máu, cholesterol, Low Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C), High Density Lipoprotein Cholesterol (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-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerid, AST, ALT và chỉ số khối cơ thể (BMI) được cung cấp bởi Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Giao thông vận tải Trung ương (Bảng 2.2). Mẫu phân từ những người không tiểu đường và những người mắc bệnh tiểu đường type 2 sống ở khu vực Hà Nội trên 5 năm, những người tình nguyện tham gia nghiên cứu tự thu thập mẫu phân 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.

Bảng 2.2. Ký hiệu mẫu, tuổi, BMI và glucose của các nhóm nghiên cứu

Tiểu đường type 2				Đối chứng			
ID	Tuổi	BMI (kg/m ²)	Glucose (mmol/L)	ID	Tuổi	BMI (kg/m ²)	Glucose (mmol/L)
D1	70	32,46	7,34	C1	58	22,43	5,33
D2	71	30,11	6,84	C2	51	19,65	5,08
D3	66	30,84	16,96	C3	54	22,43	4,96
D4	52	31,63	7,8	C4	63	18,73	5,79
D5	55	30,73	10,69	C5	60	19,97	5

D6	59	30,04	5,66	C6	59	22,26	5,28
D7	69	32,04	10,19	C7	44	18,06	4,93
D8	75	31,16	6,7	C8	39	19,53	4,54
D9	70	32,03	7,08	C9	52	21,82	5,27
D10	62	32,03	7,57	C10	47	22,49	4,55

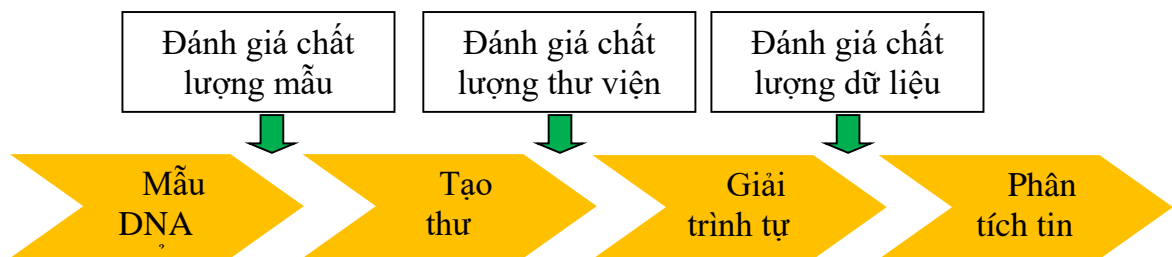
2.2.3. Phương pháp tách chiết DNA vi sinh vật từ mẫu phân

Quá trình tách chiết và tinh sạch DNA metagenome từ hệ vi sinh vật ở các mẫu phân nghiên cứu được tiến hành như sau: 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. DNA tổng số được tách bằng bộ kit QIAamp 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

Quá trình giải trình tự trên hệ thống máy giải trình tự thế hệ mới Illumina HiSeq bao gồm các bước được mô tả như hình 2.1.



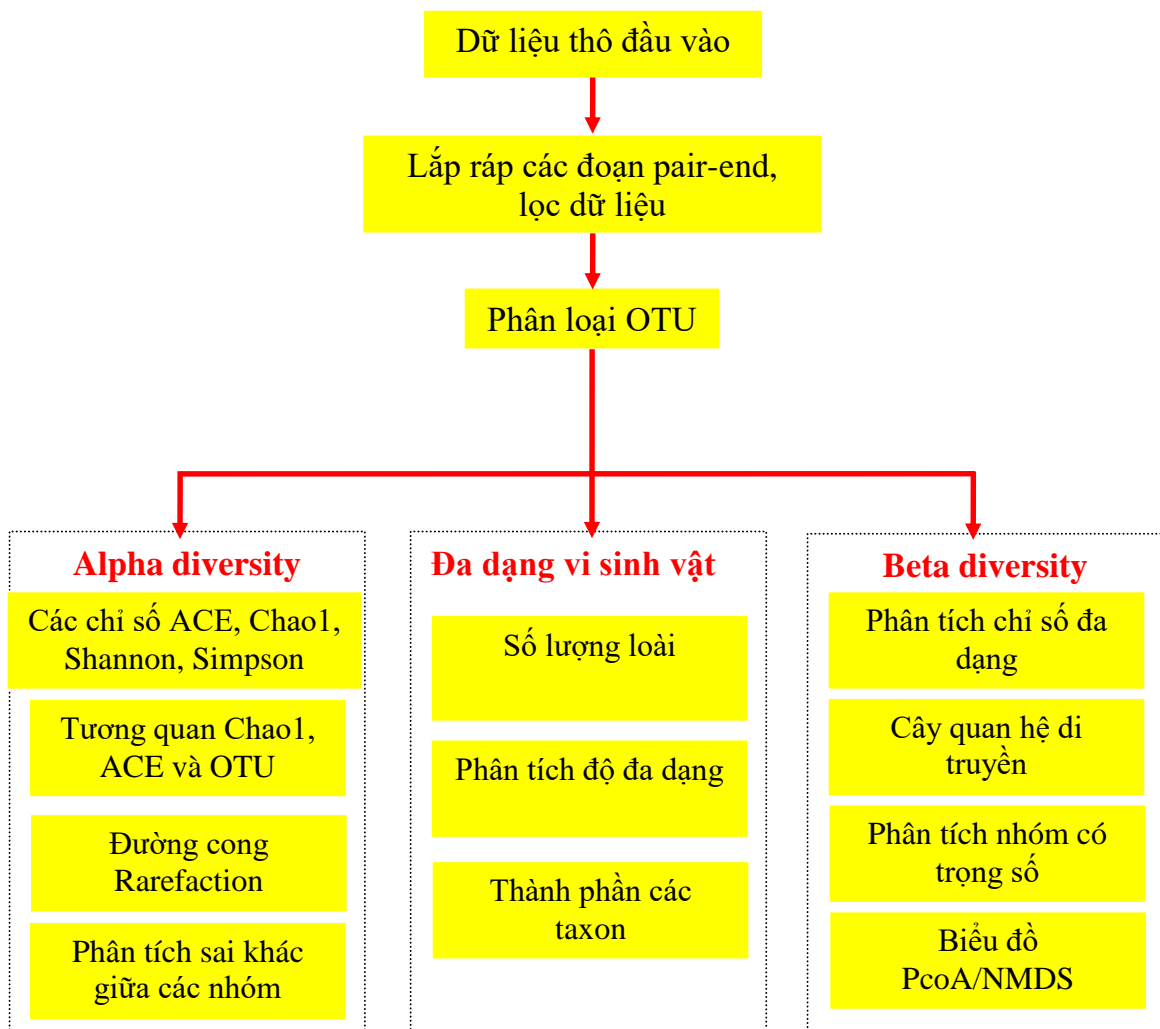
Hình 2.1. Sơ đồ quy trình giải trình tự DNA metagenome

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. Các đoạn này được sắp xếp tương ứng với các mẫu dựa trên trình tự barcode gắn với mỗi. Sau đó được ghép lại với nhau bằng phần mềm FLASH phiên bản 1.2.7 [116] dựa trên mức độ tương đồng trình tự của hai đoạn đọc. Các trình tự đơn sau đó được lọc để lựa chọn các trình tự có chất lượng tốt dựa trên các thông số mặc định bằng phần mềm QIIME phiên bản 1.7.0 [117]. Đây là công cụ mã nguồn mở được lập trình chuyên dụng cho nghiên cứu sự đa dạng của hệ vi sinh vật thông qua phân tích trình tự bên trong hoặc giữa các vùng gen 16S rRNA (Hình 2.2).



Hình 2.2. Sơ đồ các bước phân tích dữ liệu giải trình tự gen 16S rRNA

- Xác định vị trí phân loại

Các đoạn trình tự tốt sau đó được so sánh với cơ sở dữ liệu GOLD bằng thuật toán UCHIME để phát hiện và loại bỏ các trình tự chimeric. Để xác định vị trí phân

loại, các read tinh sạch sau khi xử lý được phân tích bằng phần mềm Uparse (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) [118], sau đó những read có độ tương đồng trên 97% sẽ được nhóm vào một đơn vị phân loại chức năng (operational taxonomic unit, OTU). Mỗi OTU sẽ tiếp tục được tham chiếu với cơ sở dữ liệu Unite (<https://unite.ut.ee/>) [118] đối với nấm và Silva (<https://www.arbsilva.de/>) [119] đối với vi khuẩn để gắn tên (annotate) và xác định vị trí.

- 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. Các chỉ số đa dạng alpha phản ánh sự phong phú và nhất quán trong một quần xã vi sinh vật; các chỉ số Shannon và Simpson phản ánh sự đa dạng (diversity) của OTU trong các mẫu; chỉ số ACE và chỉ số Chao1 phản ánh sự phong phú (abundance) của OTU trong các mẫu. Ý nghĩa cụ thể của các chỉ số này như sau: Khi chỉ số Shannon càng lớn hoặc chỉ số Simpson càng nhỏ thì độ đa dạng của hệ vi sinh vật càng cao; Chỉ số Chao1 hoặc ACE càng lớn thì mức độ phong phú loài dự kiến của hệ vi sinh vật càng cao [120]. Shannon và Simpson là các chỉ số dùng để xem xét số loài và mức độ đồng đều của các loài cũng như khả năng xuất hiện những loài độc đáo, trong khi các chỉ số ACE và Chao1 được sử dụng để ước tính sự phong phú hay độ giàu ước tính, xác định dựa trên phép tính OTU dự kiến trong các mẫu cho tất cả các loài vi sinh vật đã biết trong mẫu.

Phương pháp tọa độ (ordination) là một thuật ngữ chung cho các kỹ thuật đa biến, tóm tắt một tập dữ liệu đa chiều theo cách chiếu lên một không gian chiều thấp, để trở nên rõ ràng khi kiểm tra trực quan. Phương pháp tọa độ được sử dụng trong sinh thái học 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). Có 3 phương pháp tọa độ cơ bản là: (i) Phân tích thành phần chính (Principal Component Analysis, PCA); (ii) Phân tích tọa độ chính (Principal Coordinate Analysis, PCoA) và (iii) Chia tỉ lệ đa chiều không theo hệ mét (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS) [121].

Phương pháp phân tích thành phần chính (PCA) giúp giảm số lượng lớn các biến có tương quan với nhau thành tập ít biến sao cho các biến mới tạo ra là tổ hợp tuyến tính của những biến cũ không có tương quan lẫn nhau [122]. Để đánh giá sự

khác biệt trong thành phần các OTU vi khuẩn trong hệ vi sinh vật đường ruột ở người có nồng độ glucose trong máu khác nhau, các OTU vi khuẩn ở mức độ chi được gắn vào ma trận PCA bằng phần mềm R phiên bản 2.15.3.

Phân tích tọa độ chính (PCoA) còn được gọi là tỉ lệ đa chiều theo hệ mét, giúp tối đa hóa mối tương quan tuyến tính giữa các khoảng cách trong ma trận khoảng cách và trong một không gian có kích thước thấp (2 hoặc 3 trục được chọn). Đối với các số liệu khoảng cách thực, PCoA tương đương với PCA, tuy nhiên khi ma trận dữ liệu loài tồn tại quá nhiều số 0 (zero) thì nên áp dụng phân tích PCoA thay vì PCA [121]. Vì vậy, 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. Kết quả sau khi phân tích được đưa vào phần mềm MEGAN 5 [123] để so sánh mức độ tương đồng và sai khác giữa các hệ VSV. Về nguyên lý, rarefaction so sánh độ giàu của các quần xã VSV ở các mẫu khác nhau, và đường cong rarefaction được xây dựng dựa trên trung bình các ngẫu nhiên (randomization) của đường cong tích lũy quan sát được [124].

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*

Phân lập vi khuẩn lactic được thực hiện theo phương pháp của Abbasiliasi và cộng sự năm 2012 có cải tiến theo Hoa Thị Minh Tú và cộng sự [125]. Môi trường MRS agar phân lập vi khuẩn lactic 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. Mẫu được chuẩn bị trong dung dịch nước muối sinh lý vô trùng và được pha loãng đến 10⁻⁷. Mỗi một nồng độ pha loãng (từ 10⁻⁴-10⁻⁷) được cấy gọt trên môi trường thạch MRS. Mỗi mẫu phân lập được lặp lại 3 lần và được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C trong vòng 48-72 giờ. Vi khuẩn lactic được xác định bởi vòng tan CaCO₃ xung quanh khuẩn lạc nhờ sự xuất hiện của acid lactic. Xác định các chủng *Lactobacillus* đã phân lập dựa vào hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc, kiểu bắt màu thuốc nhuộm Gram, catalase âm tính... Những khuẩn lạc vi khuẩn lactic tuyển chọn được làm sạch và giữ giống chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo.

Làm thuần vi khuẩn bằng cách cấy ria trên môi trường thạch MRS cho tới khi quan sát thấy chỉ có một dạng khuẩn lạc duy nhất trên môi trường. Các chủng phân lập được bảo quản trong glycerol 50% ở - 80°C

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

- Xác định khả năng kháng khuẩn: Hoạt tính kháng khuẩn được phát hiện bằng phương pháp khuếch tán trong môi trường thạch: i) Chủng nghiên cứu được nuôi ở 37°C trong 14 đến 16 giờ, tiến hành ly tâm loại tế bào và thu dịch nuôi cấy; ii) Chủng kiểm định được nuôi qua đêm ở môi trường lỏng thích hợp. Chuẩn bị môi trường thạch đĩa có chứa chủng kiểm định bằng cách trang cấy 100 µL giống chủng kiểm định lên trên bề mặt đĩa môi trường sau đó đục lỗ thạch. Lấy 75 µL dịch ly tâm ở bước (i) nhỏ vào các lỗ thạch, giữ ở 4°C trong 4 giờ, ủ ở 37°C khoảng 24 giờ. Căn cứ vào việc xuất hiện vòng vô khuẩn để xác định chủng có hoạt tính.

- Xác định khả năng chịu axit: Sau 24 giờ nuôi cấy các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong môi trường MRS, lấy 2 ống, mỗi ống 2 mL dịch được nuôi cấy ly tâm (10 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút) thu sinh khối. Cặn tế bào sau ly tâm được hòa lại trong 2 mL môi trường MRS. Mỗi ống hòa với 2 mL môi trường MRS pH 2 bằng HCl (1 ống đối chứng, 1 ống thí nghiệm). Ống đối chứng dùng để đếm số lượng tại thời điểm 0 giờ. Mẫu thí nghiệm nuôi 3 giờ ở pH 2. Cấy gạt đĩa và ủ ở 37°C trong 24 giờ để xác định số lượng tế bào còn sống sót ở pH 2 so với đối chứng.

- Xác định khả năng chịu muối mật: *Lactobacillus* được nuôi trong môi trường MRS ở 37°C qua đêm. Dung dịch muối mật được hòa tan sau đó được vô trùng bằng màng lọc vi khuẩn. Bổ sung 0,3% muối mật vào môi trường MRS và MRS đối chứng sẽ không chứa muối mật. Xác định khả năng chịu muối mật bằng cách: lấy 4 mL dịch nuôi cấy qua đêm của chủng *Lactobacillus*, chia làm 2 ống, mỗi ống 2 mL ly tâm (10 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút) thu sinh khối. Cặn ly tâm trong mỗi ống được hoàn nguyên 1 ống với 2 mL MRS thí nghiệm và ống còn lại với 2 mL MRS đối chứng. Sau đó nuôi cấy ở 37°C trong 3 giờ. Số lượng tế bào chủng *Lactobacillus* sống sót ở nồng độ muối mật 0.3% sau 3 giờ ủ được xác định bằng cách gạt đĩa và nuôi ở 37°C trong 24 giờ đếm số lượng tế bào sống sót CFU/mL.

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*: Lấy 1 mL vi khuẩn *S. aureus* ATCC13709 trải đều trên bề mặt đĩa petri chứa 15 mL môi trường thạch BHI (Brain Heart Infusion), sau đó hút bỏ dịch thừa. Đặt đĩa thạch vào tủ ấm 37°C trong 15 phút.

Dịch nuôi vi khuẩn *Lactobacillus* 24 giờ được ly tâm loại bỏ tế bào. Nhỏ 20 μ L dịch ly tâm các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* hoặc dung dịch muối sinh lý (làm đối chứng) thành từng điểm riêng trên đĩa petri đã trải vi khuẩn *S. aureus*. Ủ các đĩa petri đã được cấy vi khuẩn trong điều kiện hiếu khí với nhiệt độ 37°C. Sau 48 giờ nuôi cấy, quan sát hiện tượng và đo kích thước vòng kháng khuẩn quanh điểm nhỏ dịch ly tâm các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* để xác định khả năng ức chế sinh trưởng của dịch nuôi đối với vi khuẩn *S. aureus*.

- Xác định khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli*: 50 μ L dịch khuẩn *E. coli* ATCC 11105 (được nuôi trong 24 giờ) trải đều trên đĩa petri chứa môi trường MRS agar và để khô. Nhỏ 20 μ L dịch nuôi của vi khuẩn *Lactobacillus* hoặc nước muối sinh lý thành từng điểm trên đĩa petri đã trải đều *E. coli*. Ủ mẫu ở 37°C trong điều kiện hiếu khí. Sau 48 giờ, quan sát hiện tượng và đo kích thước vòng kháng khuẩn quanh điểm nhỏ dịch ly tâm các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* để xác định khả năng ức chế sinh trưởng của dịch nuôi đối với vi khuẩn *E. coli*.

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

Phương pháp định danh vi khuẩn bằng giải trình tự gen rRNA 16S.

Cho 1,5 mL dung dịch MRS nuôi vi khuẩn ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 5 phút. DNA được tách chiết từ sinh khối tế bào bằng bộ kit của ThermoFisher. Sau đó, DNA được dùng làm khuôn cho PCR khuếch đại gen 16S rRNA với cặp mồi 27F và 1492R (Bảng 2.1). Thành phần PCR có thể tích 20 μ L bao gồm: 10 μ L Master mix, 2 μ L mồi xuôi, 2 μ L mồi ngược, 2 μ L DNA khuôn và 4 μ L H₂O. Chu trình nhiệt của PCR là: 94°C 6 phút; 35 chu kỳ (94°C 30 giây; 46°C 30 giây; 72°C 8 phút). Sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agrose 1%, tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Purification Kit, và được gửi đọc trình tự gen tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học bằng máy đọc trình tự tự động Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ)

Các trình tự gen sau đó phân tích bằng phần mềm BioEdit v.7.0.5.3 [126] và so sánh với các trình tự đã công bố trên Ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa trên các trình tự gen 16S rRNA bằng phần mềm Mega X với phương pháp neighbor-joining và giá trị Bootstrap 1000 [127].

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 cống trắng đực Wistar, trọng lượng khoảng 180-220 g được cung cấp bởi bộ phận chăn nuôi khoa Dược lý, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Việt Nam. Chuột được nuôi nhốt 3÷4 con/chuồng bằng nhựa lót trấu, có nắp làm bằng các thanh inox 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 $55 \pm 5\%$. Tất cả chuột được cho ăn, uống theo nhu cầu với thức ăn công thức và uống nước RO.

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. Bệnh tiểu đường được xác minh sau 96 giờ tiêm streptozotocin, các mẫu máu sử dụng để kiểm tra được lấy từ tĩnh mạch đuôi chuột và xác định nồng độ glucose bằng máy đo đường huyết mỗi ngày một lần cho đến khi tình trạng gia tăng đường huyết đạt được một cách ổn định. 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 liên tiếp trong nước cất vô trùng. 100 μL huyền phù pha loãng ở nồng độ cuối cùng được cấy vào đĩa thạch MRS và sau đó kiểm tra khuẩn lạc trên mỗi đĩa. Đĩa này được sử dụng để chuẩn bị liều lượng cho động vật. Nồng độ của dung dịch pha loãng cuối cùng 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 ($n = 6$).

Bảng 2.3. Các nhóm chuột tham gia thử nghiệm

Nhóm	Đối tượng	Liều dùng hàng ngày
Nhóm 1	Chuột khỏe mạnh	Uống nước RO
Nhóm 2	Chuột bị tiểu đường	Uống nước RO
Nhóm 3	Chuột tiểu đường cho dùng <i>Lactobacillus</i>	10^7 CFU/mL
Nhóm 4	Chuột tiểu đường điều trị với Liraglutide	150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ thể trọng

Thuốc và liều vi khuẩn được dùng qua đường uống bằng kim bơm ngày một

lần, liên tục trong 4 tuần.

2.2.6.5. 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.

2.2.6.6. 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. Mẫu máu được thu thập vào các ống giữ lạnh có chứa EDTA và chất ức chế DPP-4 (sitagliptin) để phân tích GLP-1 trong huyết thanh. Việc định lượng GLP-1 thực hiện bằng bộ kit ELISA chuột (Bộ xét nghiệm miễn dịch men RayBio® chuột GLP-1) sử dụng máy đọc đĩa đa năng Varioskan LUX. 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 3000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và bảo quản -80°C.

2.2.7. Thống kê phân tích số liệu

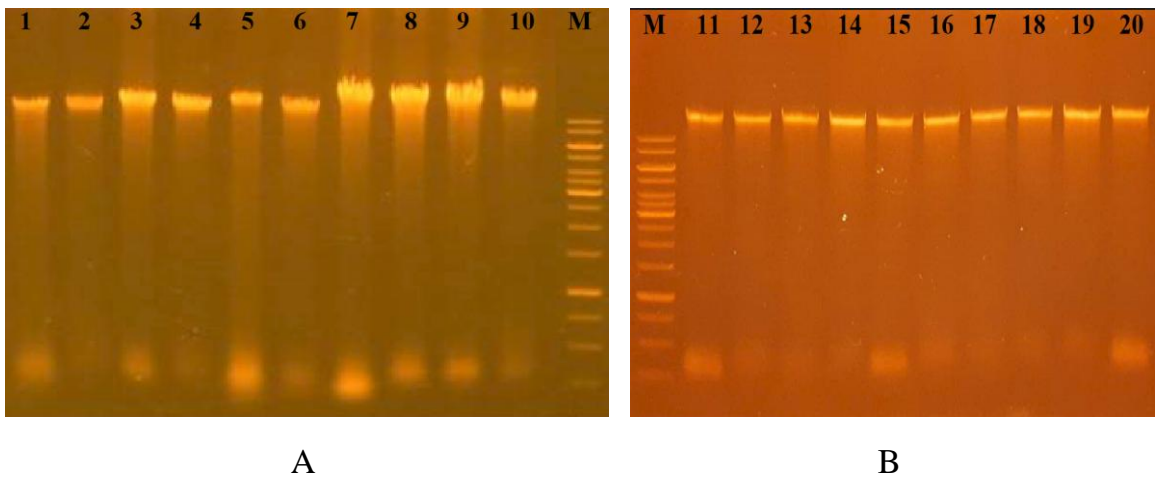
Các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel theo phương pháp t-test và IBM SPSS Statistics 22 với giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

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.



Hình 3.1. Hình ảnh điện di metagenomic DNA tách từ mẫu phân của nhóm người bệnh tiểu đường type 2 (A), nhóm đối chứng (B)

Chú thích: 1 đến 10: bệnh nhân tiểu đường type 2; 11 đến 20: đối chứng;

Giếng M: Thang DNA chuẩn 1kb.

Thông thường DNA được phân lập từ phân sẽ chứa một lượng đáng kể các chất ức chế, như phenolic và polysaccharide, là những chất mà có thể ngăn cản sự khuếch đại DNA trong phản ứng PCR. Trong nhiều trường hợp, việc pha loãng DNA tinh sạch là rất cần thiết để đạt được kết quả PCR như mong muốn. Sử dụng bộ KIT QIAamp DNA Stool Mini, DNA của vi khuẩn từ các mẫu phân người của các đối tượng nghiên cứu đã được tách chiết thành công và đủ tiêu chuẩn đọc Next-generation sequencing (NGS).

DNA tổng số của 20 mẫu phân của các đối tượng nghiên cứu được trình bày trên Hình 3.1. 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. Toàn bộ sản phẩm thu được, được lưu trữ ở nhiệt độ -20°C để phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo.

Trước khi giải trình tự thế hệ mới (NGS), 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. Kết quả kiểm tra độ tinh sạch được thể hiện ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA

TT	Loại mẫu	Nồng độ (ng/ μ L)	Độ tinh sạch (OD 260/280)
1	D1	329,9	1,89
2	D2	203,8	1,99
3	D3	91,8	1,78
4	D4	286,8	1,9
5	D5	124,5	1,77
6	D6	77,5	2,06
7	D7	648,8	1,9
8	D8	428,9	1,96
9	D9	97,5	1,89
10	D10	380,9	1,86
11	C1	302	1,97
12	C2	890,2	1,9
13	C3	677,8	1,94
14	C4	101	1,81
15	C5	454,9	1,88
16	C6	310,6	2,0
17	C7	427,9	1,93
18	C8	214,3	1,95
19	C9	152,2	1,86
20	C10	256,6	1,79

Kết quả Bảng 3.1 cho thấy, DNA của các mẫu được tách chiết với hàm lượng cao. 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

Hệ vi khuẩn đường ruột có liên quan đến trao đổi chất và bệnh tật ở người. Vai trò quan trọng của hệ vi khuẩn đường ruột không chỉ thể hiện mối quan hệ chặt chẽ giữa sự đa dạng của chúng với bệnh tật của con người, mà còn với tính bền vững của chính hệ vi khuẩn trong đường tiêu hóa. Nghiên cứu hệ vi khuẩn ở mức quần xã sẽ giúp chúng ta hiểu được phần nào cơ chế bệnh tật ở người. Không chỉ vậy, việc đánh giá sự thay đổi hệ vi khuẩn một cách định tính và định lượng sẽ là thước đo cho các thay đổi ngắn hạn và dài hạn đối với trao đổi chất ở ruột già. Như vậy, để phân tích sự thay đổi hệ vi khuẩn đường ruột một cách toàn diện cần xác định tính đa dạng, chức năng của một số loài và sự tương tác giữa các loài trong hệ vi khuẩn đó.

Đối với vi khuẩn (bacteria) và vi khuẩn cổ (archaea), gen 16S rRNA mã hóa tiểu phần nhỏ của ribosome được coi là marker phân loại học phổ biến. Gen rRNA 16S chứa các khu vực có tính bảo thủ cao, trong đó vùng V3 V4 được coi là đoạn đặc trưng nhất và phổ biến nhất trong phân tích metagenome. Sau khi khuếch đại bằng PCR, số lượng bản sao từ các mẫu DNA tổng số đạt được tới hàng triệu bản sao (khuếch đại) của vùng DNA đích. Các đoạn khuếch đại (amplicons) có chiều dài trung bình 415 đến 423 bp được xác định trình tự NGS là cơ sở để phân tích và tìm kiếm các OTU liên quan đến khu hệ vi khuẩn của mẫu nghiên cứu, bao gồm các bacteria và archaea.

Thành phần hệ vi khuẩn đường ruột dựa trên các OTU trong phân của 2 nhóm người nghiên cứu (07 người mắc bệnh tiểu đường type 2 và 07 người không mắc bệnh tiểu đường) được phân tích bằng phần mềm Uparse, cơ sở dữ liệu Unite và thuật toán Blast, kết hợp phần mềm QIIME.

Các loài vi khuẩn khác nhau thì quá trình trao đổi chất cũng khác nhau, thông thường các lợi khuẩn sẽ tác động tích cực đến sức khỏe của con người. Để hiểu rõ hơn mối liên quan giữa hệ vi khuẩn đường ruột và bệnh tiểu đường, chúng tôi tập trung nghiên cứu làm rõ sự khác biệt về hệ vi khuẩn giữa nhóm không mắc bệnh tiểu đường và nhóm mắc bệnh tiểu đường type 2 ở cấu trúc quần xã vi khuẩn dựa trên các phân tích metagenome 16S rDNA.

Dữ liệu giải trình tự metagenome amplicons của các mẫu phân thu thập từ các vùng đặc hiệu V3 V4 của trình tự 16S rDNA được mô tả cụ thể trong Bảng 3.2. Sau khi xử lý số liệu trình tự thô, chúng tôi thu được tổng 1.627.646 trình tự ở 14 mẫu.

Số lượng trình tự thay đổi trong khoảng 34.411-134.397, giá trị trung bình là 116.260 (độ lệch chuẩn SD 25.494). Các dữ liệu trong bảng được xác định sau khi đã loại bỏ các trình tự chimera, trình tự môi và adaptor.

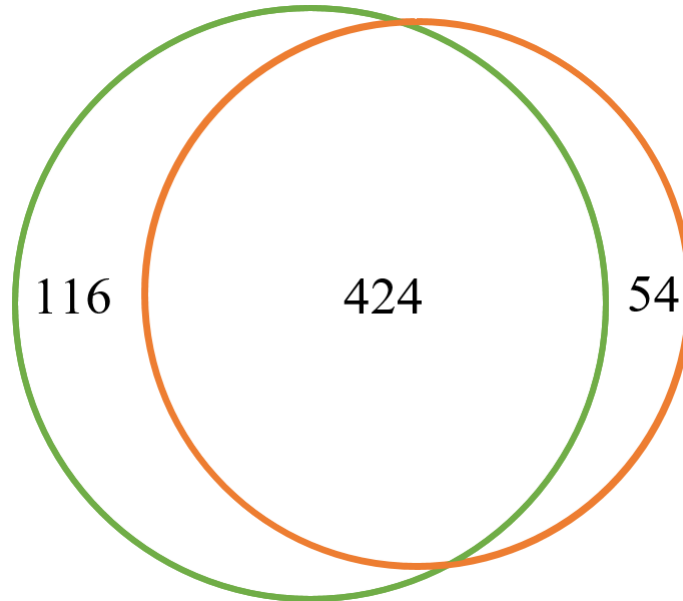
Bảng 3.2. Kết quả các thông số giải trình tự và các chỉ số đa dạng từ các mẫu của nhóm nữ giới

TT	Tên mẫu	Số lượng trình tự	Độ dài trung bình (nt)	Số OTU	Chao1	ACE	Good's coverage
1	C1	34411	416	292	314.077	319.34	0.997
2	C2	120516	417	367	464.5	458.5	0.994
3	C3	106163	416	279	365.719	356.106	0.995
4	C4	127451	415	364	418.412	423.737	0.995
5	C5	128711	417	289	349.06	388.043	0.995
6	C6	134182	416	204	237.476	234.975	0.997
7	C7	113669	417	221	257.033	263.982	0.997
8	D1	128305	423	246	363.04	334.885	0.995
9	D2	121968	418	208	271.143	258.629	0.996
10	D3	102246	416	175	242.562	228.098	0.997
11	D4	132071	422	180	234.05	234.1	0.997
12	D5	119757	420	229	292.033	292.439	0.996
13	D6	134397	417	177	210.115	217.246	0.997
14	D7	123799	418	287	352	345.564	0.995

Trong tổng số 1.627.646 trình tự có độ tin cậy cao, 99,9378% thuộc vi khuẩn (Bacteria) và 0,0602 thuộc 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). 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

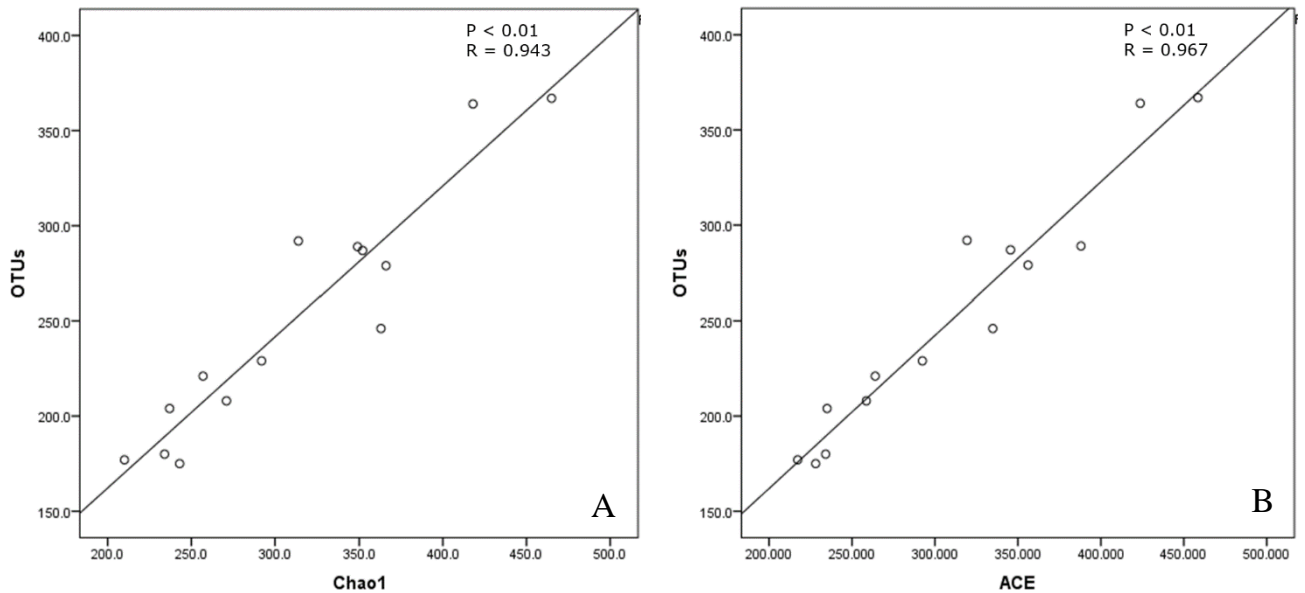
cho các loài có trong mẫu.

Các trình tự được sắp xếp vào đơn vị phân loài (OUT) với 97% tương đồng. Kết quả cho thấy, số lượng OTU ở các mẫu phân của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường và nhóm mắc bệnh tiểu đường lần lượt là 540, 478. Biểu đồ Venn trên Hình 3.2 mô tả sự chia sẻ OTU giữa mẫu phân của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường và mẫu phân của nhóm nữ giới mắc bệnh tiểu đường. Từ biểu đồ cho thấy, 2 mẫu chia sẻ nhau 424 OTU.



Hình 3.2. Biểu đồ Venn mô tả sự chia sẻ các OTU chung giữa mẫu phân của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường và nhóm nữ giới mắc bệnh tiểu đường

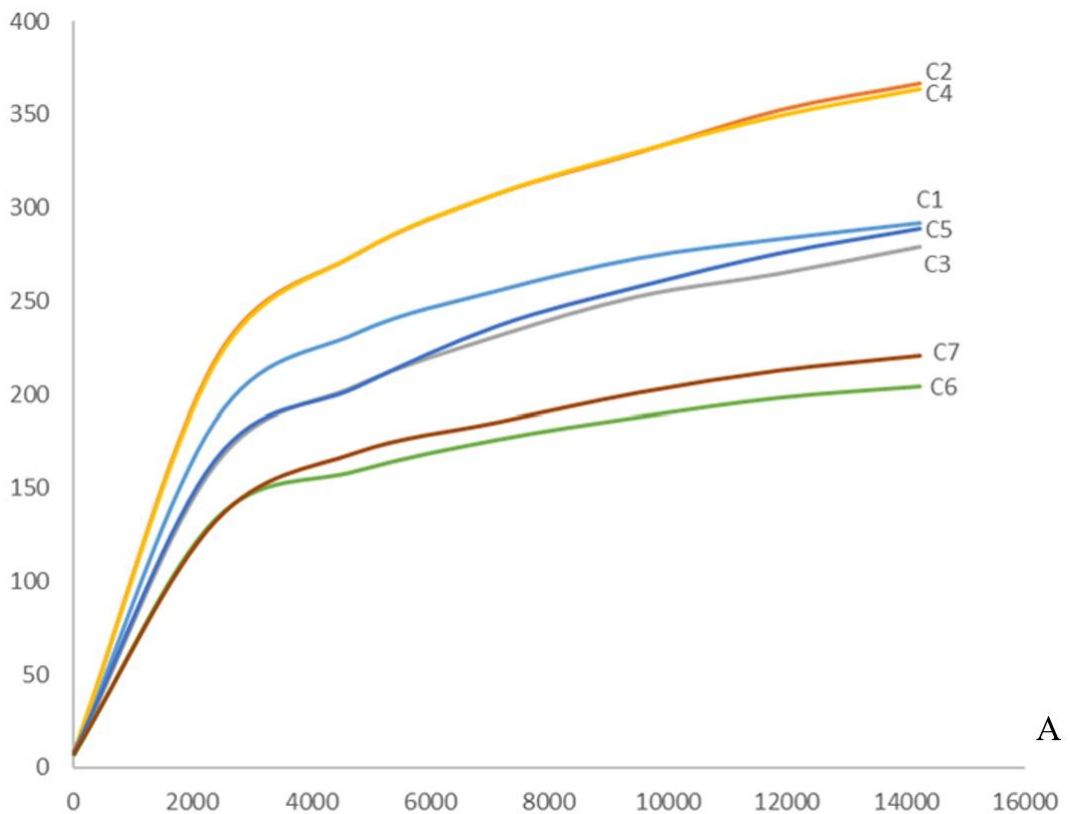
Giá trị ước lượng số loài còn được thể hiện bởi các giá trị ACE và Chao1. Kết quả phân tích alpha diversity cho thấy giá trị ACE và Chao1 của các mẫu tỷ lệ thuận với giá trị OTUs ($P < 0,01$) (Hình 3.3). Tất cả các mẫu đều có giá trị ACE và Chao1 cao hơn giá trị OTUs, điều này có nghĩa nếu số lượng các trình tự tăng lên thì số lượng các loài được dự đoán sẽ tăng lên. 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).

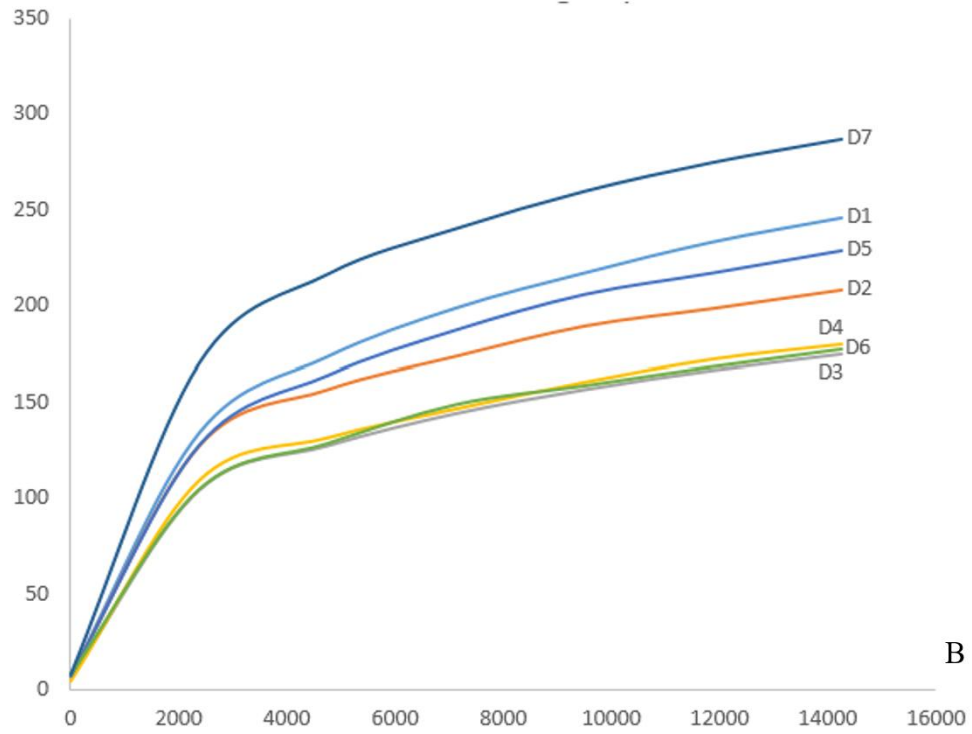


Hình 3.3. A. Tương quan giữa Chao 1 và OTUs ở nhóm nữ giới. B. Tương quan giữa ACE và OTUs ở nhóm nữ giới.

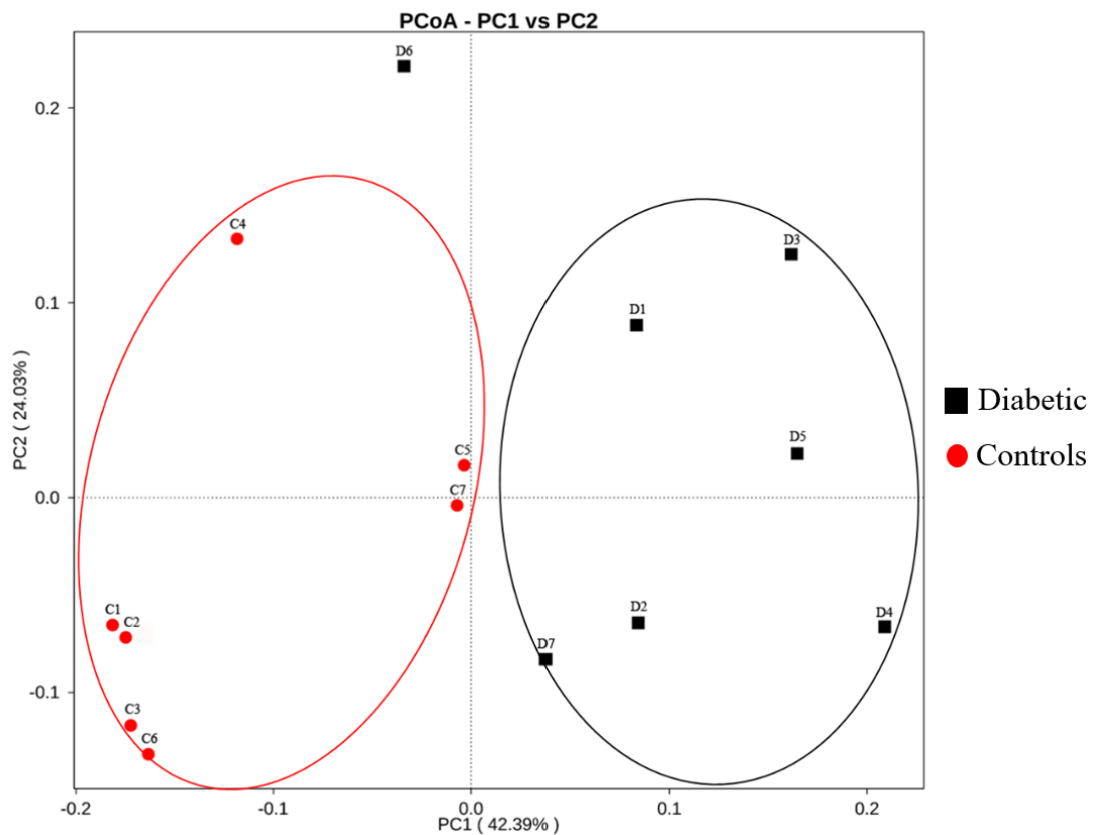
- Kết quả phân tích so sánh các chỉ số đa dạng sinh học

Kết quả phân tích rarefaction (Hình 3.4) 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.





Hình 3.4. A. Rarefaction của các OTU vi sinh vật quan sát được của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường. B. Rarefaction của các OTU vi sinh vật quan sát được của nhóm nữ giới mắc 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

Chú thích: Chấm tròn đỏ là mẫu của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường; chấm đen vuông là mẫu của nhóm nữ giới mắc bệnh tiểu đường type 2

Phân tích thành phần chính (Principal coordinate analysis - PCoA) ở Hình 3.5 cho thấy, thành phần vi khuẩn trong phân của nhóm bị 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. Nói cách khác, có sự khác biệt các quần thể vi sinh vật từ nhóm bị bệnh tiểu đường type 2 (diabetes group) và nhóm đối chứng (control). Kết quả này cho thấy 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. Điều này chứng tỏ sự cân bằng đa dạng hệ vi sinh vật đường ruột đóng vai trò quan trọng trong tiêu hóa và khỏe mạnh của con người. Do đó, có thể thấy sự cân bằng này thường tồn tại ở người không tiểu đường và bị phá vỡ sự ổn định ở nhóm mắc bệnh tiểu đường type 2.

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

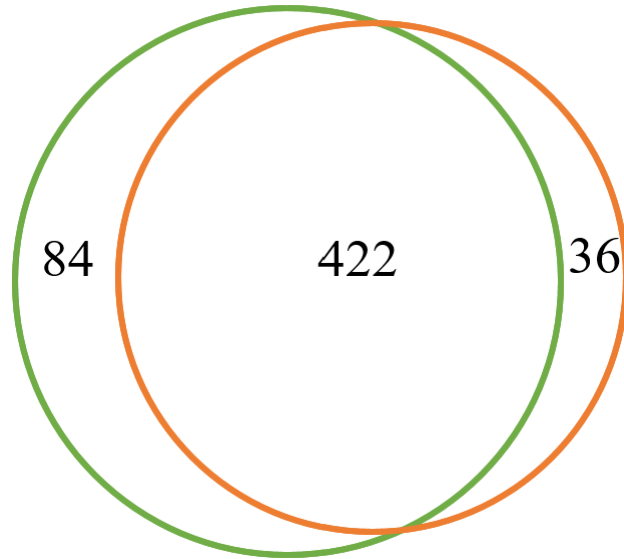
- Kết quả tính toán các chỉ số đa dạng sinh học

Bảng 3.3. Kết quả các thông số giải trình tự và các chỉ số đa dạng từ các mẫu phân nam giới

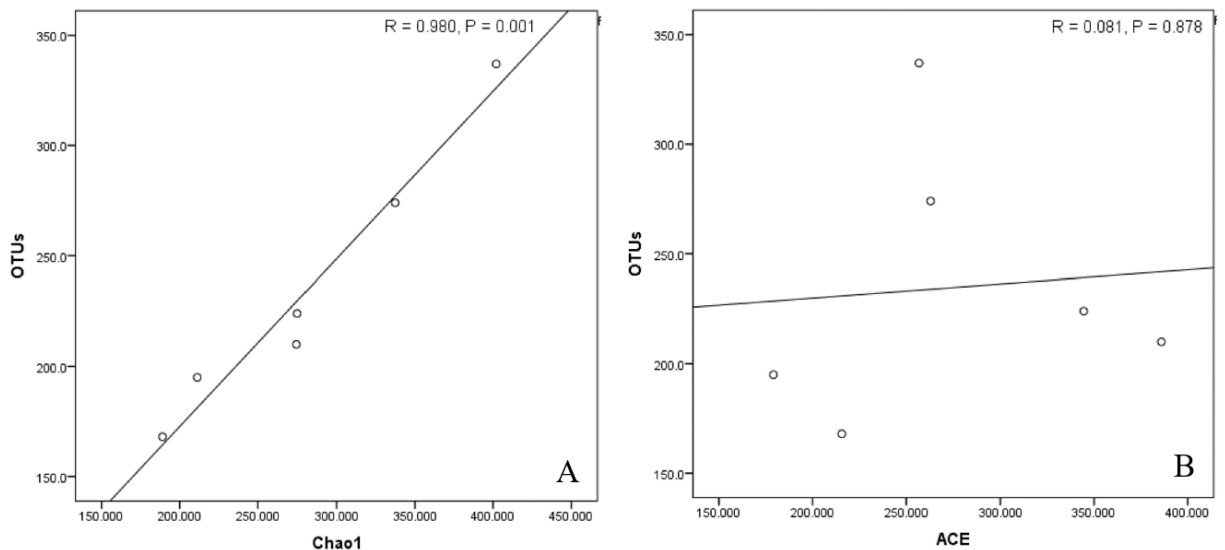
TT	Tên mẫu	Số lượng trình tự	Độ dài trung bình (nt)	Số OTU	Chao1	ACE	Good's coverage
1	C8	23.932	417	168	189	179.104	0.998
2	C9	126.976	417	274	337,405	344.505	0.995
3	C10	130.945	419	210	274,565	256.805	0.996
4	D8	31.369	413	195	211,24	215.594	0.998
5	D9	125.250	420	224	275,042	262.724	0.996
6	D10	121.284	417	337	402,029	385.982	0.995

Kết quả phân tích trình tự cho thấy: tổng số 559.756 trình tự có độ tin cậy cao, 99,9883% thuộc vi khuẩn (Bacteria) và phần còn lại chiếm 0,0117% thuộc về 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 (Bảng 3.3). 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.

Biểu đồ Venn ở Hình 3.6 mô tả sự chia sẻ OTU giữa mẫu phân của nhóm nam giới không mắc bệnh tiểu đường và nhóm nam giới mắc bệnh tiểu đường. Từ biểu đồ cho thấy, 2 nhóm mẫu chia sẻ nhau 422 OTU.



Hình 3.6. Biểu đồ Venn mô tả sự chia sẻ các OTU chung giữa mẫu phân của nhóm nữ giới không mắc bệnh tiểu đường và nhóm nữ giới mắc bệnh tiểu đường



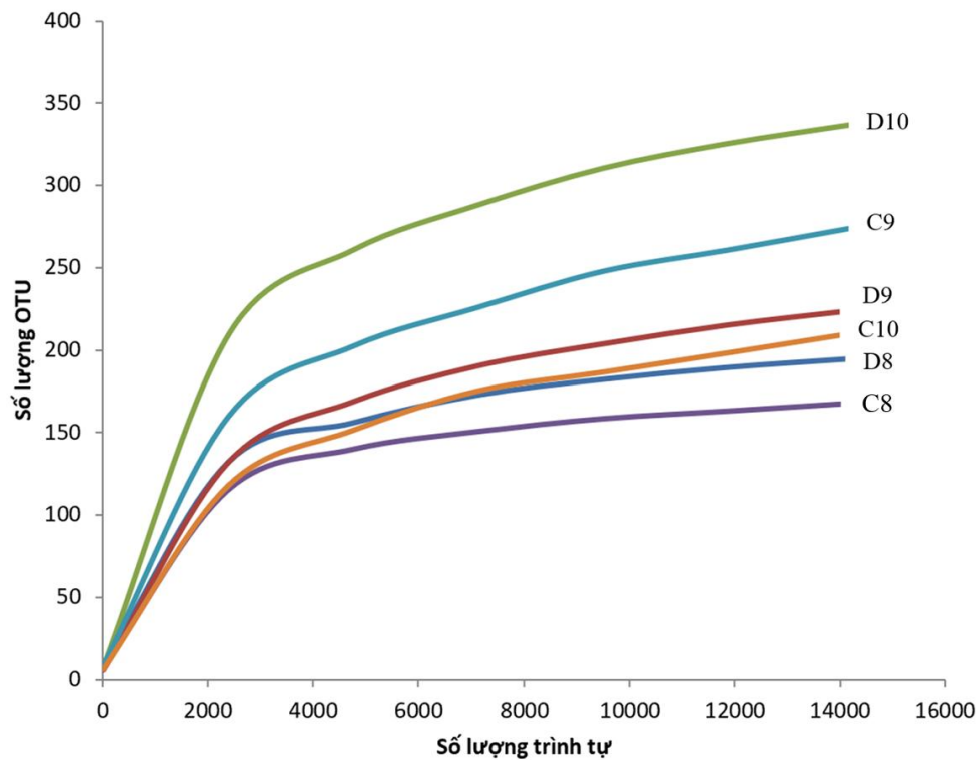
Hình 3.7. A. Tương quan giữa Chao1 và OTUs ở nhóm nam giới. B. Tương quan giữa ACE và OTUs ở nhóm nam giới

Giá trị ước lượng số lượng loài còn được thể hiện bởi giá trị Chao1 và ACE. Kết quả phân tích alpha diversity cho thấy giá trị Chao1 và ACE của các mẫu tỷ lệ thuận với giá trị OTUs ($P = 0,001$ và $P = 0.878$ tương ứng) (Hình 3.7). Trong tất cả các mẫu, giá trị Chao1 và ACE 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 (5,782 và 0,947 tương ứng), giá trị thấp nhất (4,093 và 0,837 tương ứng). Trong khi đó, giá trị Shannon và Simpson cao nhất từ phân của nhóm tiêu đường type 2 (5,428 và 0,948 tương ứng), giá trị thấp nhất (3,879 và 0,852 tương ứng).

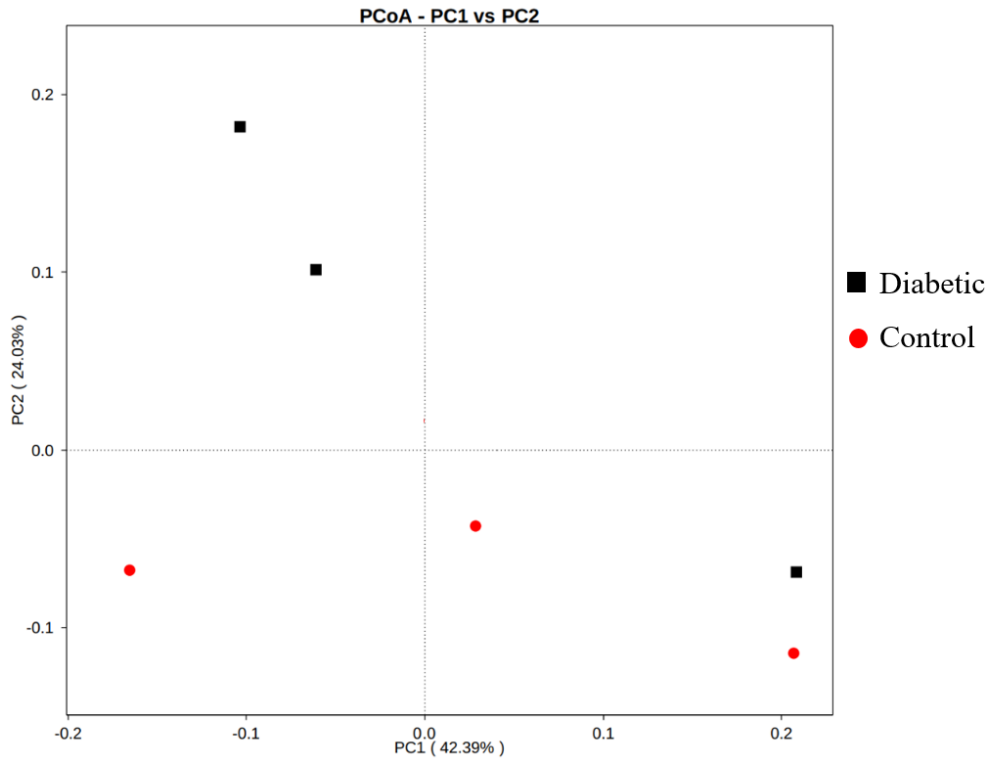
- Kết quả phân tích so sánh các chỉ số đa dạng sinh học

Kết quả phân tích rarefaction (Hình 3.8) 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 tiêu đường type 2 có xu hướng đa dạng hơn nhóm đối chứng.



Hình 3.8. Rarefaction của các OTU vi sinh vật quan sát được của nhóm 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 tiêu 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 tiêu đường type 2 (diabetes group) và nhóm đối chứng (control). Nhóm đối chứng có sự tương đồng cao hơn so với nhóm bị bệnh tiêu đường type 2. Sự cân bằng vi sinh vật thường tồn tại ở người không tiêu đường và bị phá vỡ sự ổn định ở nhóm mắc bệnh tiêu đường type 2.



Hình 3.9. Kết quả phân tích tọa độ chính (PCoA) ở các mẫu phân của nam giới
 Chú thích: Chấm tròn đỏ là mẫu của nam giới không mắc bệnh tiểu đường; chấm đen vuông là mẫu của nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2

3.1.3. Thành phần loài vi khuẩn

Giới tính là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khu hệ vi khuẩn đường ruột, nhưng mối liên quan vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Kết quả nghiên cứu năm 2006 được thực hiện bởi bốn trung tâm ở Pháp, Đức, Ý và Thụy Điển cho thấy, ở nam giới, chi vi khuẩn *Bacteroides* - *Prevotella* cao hơn ở nữ [128]. Tuy nhiên, với nghiên cứu năm 2005 trên 91 người Bắc Âu từ Pháp, Đan Mạch, Đức, Hà Lan và Vương quốc Anh, lại cho thấy không có sự khác biệt đáng kể trong thành phần chính của khu hệ vi khuẩn đường ruột giữa nam và nữ [129]. Trong một báo cáo khác năm 2008, nghiên cứu về nhóm *Bacteroides* spp trong một gia đình Trung Quốc cho thấy, số lượng *Bacteroides thetaiotaomicron* ở nam giới phong phú hơn ở nữ giới [130]. Mặc dù các kết quả nghiên cứu là không nhất quán, nhưng như vậy có thể thấy, giới tính có thể mang đến sự khác biệt về thành phần loài khu hệ vi khuẩn đường ruột. Chính 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

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc tìm ra mối liên quan giữa thành phần hệ vi sinh vật đường ruột với bệnh tiểu đường [131], [132],

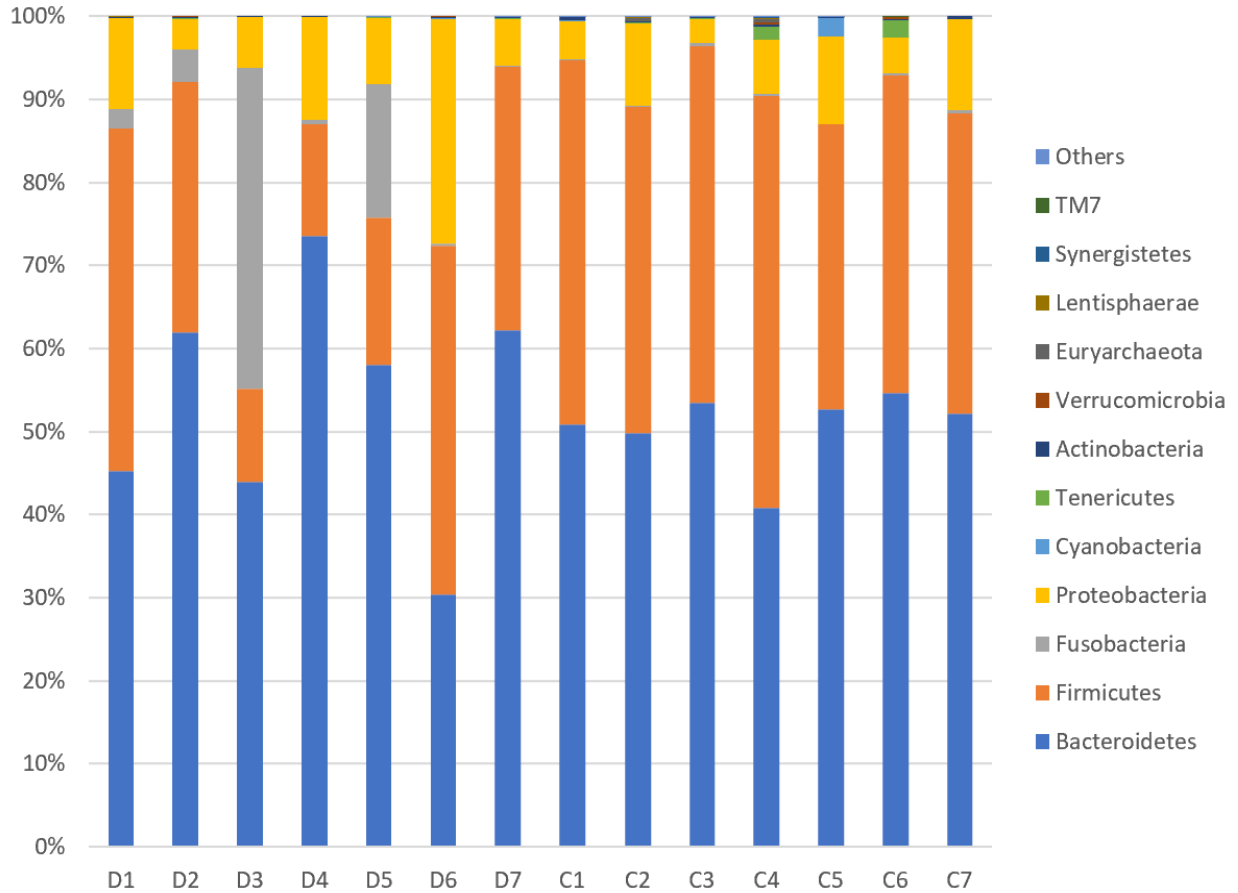
[133]. Kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy, số lượng trình tự đọc của hai nhóm gồm 13 ngành chính. Các OTU vi khuẩn tập trung ở bốn ngành và chiếm > 98,56% tổng số OTU xác định được, đó là Bacteroidetes (30,42%-73,58%), Firmicutes (11,25%-49,58%), Proteobacteria (2,97%-27,05%) và Fusobacteria (0%-38,49%).

Bảng 3.4. Tỷ lệ trung bình một số ngành vi sinh vật trong phân của nhóm nữ giới tiêu đường type 2 và nhóm nữ giới không tiêu đường

TT	Ngành vi sinh vật	Tỷ lệ trung bình (%)		Chỉ số p
		Nhóm nữ không tiêu đường	Nhóm nữ tiêu đường type 2	
1	Bacteroidetes	50.636	53.623	0.613
2	Firmicutes	40.595	26.778	0.021
4	Proteobacteria	7.121	10.580	0.305
3	Fusobacteria	0.208	8.786	0.137
5	Cyanobacteria	0.346	0.017	0.316
6	Tenericutes	0.530	0.038	0.161
7	Actinobacteria	0.212	0.124	0.131
8	Verrucomicrobia	0.094	0.020	0.201
9	Euryarchaeota	0.119	0.001	0.144
10	Lentisphaerae	0.060	0.007	0.078
11	Synergistetes	0.017	0.001	0.042
12	TM7	0.001	0.000	0.337
13	Others	0.061	0.024	0.047

Thông thường, hệ vi sinh vật đường ruột của con người được chia thành nhiều ngành (phyla) khác nhau, trong đó có một số ngành chính, chiếm ưu thế với tỉ lệ vượt trội và những ngành chính này có thể khác nhau giữa các dân tộc. Những nghiên cứu đối với người Ý cho thấy, 4 ngành chính trong hệ vi sinh đường ruột của họ thường là Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria và Actinobacteria với tỉ lệ lần lượt là 45,42%, 37,45%, 7,05% và 1,01% [134]. Trong khi đó ở người Đan Mạch, 5 ngành chính trong đó Firmicutes và Bacteroidetes chiếm đến 90%, còn lại Proteobacteria, Actinobacteria và Verrumicrobia chiếm khoảng 1-4% mỗi loại [62]. Nghiên cứu đối với người Trung quốc, 3 ngành chiếm ưu thế nhất đó là Firmicutes, Bacteroidetes và Proteobacteria với tỷ lệ là 49,08%, 42,06% và 5,39% tương ứng [130]. Với đối tượng

ngiên cứu là người Châu Phi, 3 ngành phong phú nhất đó là Firmicutes, Actinobacteria và Bacteroidetes với tỉ lệ 78%, 16,5% và 2,2% [135]. Như vậy có thể thấy, tùy đối tượng người nghiên cứu khác nhau sẽ có đặc thù riêng về các ngành vi sinh vật ưu thế trong đường tiêu hóa.



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)

Trong số các ngành chính, 2 ngành chiếm tỉ lệ lớn đó là Bacteroidetes và Firmicutes, đại diện cho khoảng 90% vi khuẩn đường ruột.

Bacteroidetes là vi khuẩn kỵ khí Gram âm không sinh bào tử, chúng có mặt ở nhiều nơi của đường tiêu hóa, bao gồm khoang miệng và dạ dày, ngay cả khi có sự hiện diện của acid dạ dày và các enzyme tiêu hóa [136]. Ngành này có 4 lớp: Bacterodia, Flavobacteria, Sphingobacteria và Cytophagia. Chúng đóng vai trò phân hủy và giải phóng năng lượng từ các phân tử hữu cơ khác nhau, cung cấp chất dinh dưỡng cho các vi khuẩn khác và bảo vệ cơ thể khỏi tác nhân gây hại [137]. Bacteroidetes có cả tác dụng tích cực lẫn tiêu cực đối với vật chủ. Vi khuẩn thuộc nhóm này có thể giúp ngăn chặn tình trạng viêm, nhưng chúng cũng có khả năng thúc đẩy quá trình viêm và một số được coi là mầm bệnh cơ hội [138]. Trong khi đó, ngành

Firmicutes là những vi khuẩn mà đa số có cấu trúc màng tế bào Gram dương. Ngành này bao gồm ba lớp Bacilli, Clostridia và Erysipelotrichia. Chúng lên men chất xơ và tinh bột kháng, cung cấp khoảng 10% tổng năng lượng cho cơ thể [139]. Tuy nhiên khi số lượng tăng cao, vi khuẩn này ảnh hưởng tiêu cực đối với quá trình chuyển hóa glucose và chất béo. Do vậy, việc tăng tỷ lệ Firmicutes so với các loài Bacteroidetes có liên quan đến bệnh béo phì và bệnh tiểu đường type 2 [140].

Khi tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes < 0,8 chứng tỏ cơ thể bị rối loạn vi khuẩn đường ruột [139]. 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.

Nghiên cứu cho thấy, sự suy giảm tỷ lệ Firmicutes ở người tiểu đường type 2 so với người không tiểu đường được xem là một trong những dấu hiệu của chứng loạn khuẩn. Khi so sánh mức độ phong phú trong ngành Firmicutes của 2 nhóm, chúng tôi nhận thấy Firmicutes ở nhóm tiểu đường type 2 (trung bình 26,78%) thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng (trung bình 40,59%) với $p = 0,021$. Một trong những nghiên cứu đầu tiên về thành phần khu hệ vi khuẩn đường ruột ở những người tiểu đường type 2 đã được thực hiện bởi Larsen và cộng sự [62]. Tương tự nghiên cứu của chúng tôi, kết quả nghiên cứu của Larsen cho thấy có sự giảm của ngành Firmicutes. Tuy nhiên, một số nghiên cứu khác lại có nhận định về sự thay đổi tỷ lệ vi sinh vật đường ruột ở người bệnh tiểu đường type 2 là do rối loạn sinh học. Điều này có thể liên quan đến sự gia tăng đáng kể của Firmicutes so với Bacteroidetes ($F/B > 0,8$) vì ngành vi khuẩn này có số lượng loài nhiều nhất tham gia vào quá trình lên men đường, làm gia tăng hấp thu calo, gia tăng giải phóng khí và tăng tính thấm của hàng rào biểu mô ruột. Do đó, có thể dẫn đến tăng cân và gây viêm, đây là những đặc điểm thường gặp ở người mắc bệnh tiểu đường type 2 [61], [134].

Vi sinh vật thuộc ngành Bacteroidetes ở mẫu bệnh tiểu đường trong nghiên cứu này là 53,62% có xu hướng cao hơn so với ở mẫu đối chứng là 50,64. Ở người tiểu đường type 2 và người béo phì, Bacteroidetes thường giảm đi [134], dẫn đến sự suy giảm sản xuất butyrate [141], một trong những acid béo chuỗi ngắn hỗ trợ chức năng của tế bào β trong tuyến tụy sau khi ăn [76]. Butyrate còn góp phần điều chỉnh các chức năng của hệ thống miễn dịch và bảo vệ chống lại sự xâm nhập của mầm bệnh [142] đồng thời giúp kích hoạt quá trình tạo glucose ở ruột, giúp cân bằng nội

môi [72].

Đối với ngành chiếm ưu thế thứ 3, Proteobacteria, ở nhóm bệnh tiểu đường type 2 có xu hướng cao hơn nhóm không bị tiểu đường (tỷ lệ trung bình là 10,58% so với 7,12%). Proteobacteria là một trong những ngành chính khi xác định vi khuẩn của đường ruột. Tuy nhiên, sự phong phú của vi khuẩn này có thể khác nhau ở các nghiên cứu. Đặc biệt, nhiều loài thuộc ngành Proteobacteria trở nên phong phú ở những đối tượng mắc bệnh tiểu đường [143], [144]. Những thay đổi này có thể được giải thích đó là, vi khuẩn thuộc ngành Proteobacteria và Bacteroidetes là những vi khuẩn gram âm, chúng có chứa lipopolysaccharit (LPS) ở màng ngoài - có tác dụng kích thích phản ứng viêm mạnh và có thể biểu hiện nội độc tố trong máu. Do đó, khi có sự tăng lên của 2 ngành này, lượng LPS xuất hiện nhiều trong ruột, điều này có thể gây ra phản ứng viêm và là một trong những tác nhân làm phát triển bệnh tiểu đường [145]. Nghiên cứu của Larsen và cộng sự cũng cho thấy, bệnh lý tiểu đường type 2 có liên quan đến những thay đổi rõ rệt về thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột ở cấp độ ngành [62].

Fusobacteria là vi khuẩn kỵ khí, Gram âm, không sinh bào tử. Vi khuẩn này biến động khi bị tiểu đường. Fusobacteria kích hoạt các phản ứng viêm của vật chủ, liên quan viêm niêm mạc, đến béo phì ở đối tượng lớn tuổi mắc hội chứng chuyển hóa. Khi so sánh thành phần vi sinh vật của ngành Fusobacteria, tỉ lệ trung bình vi khuẩn này ở nhóm bệnh tiểu đường type 2 có xu hướng cao so với nhóm đối chứng (8,79% so với 0,21). Trong một số nghiên cứu, Fusobacteria được xếp sau Firmicutes, Bacteroidetes Proteobacteria tương tự như phát hiện của chúng tôi [146]. Trong nghiên cứu về vi sinh vật đường ruột của bệnh nhân tiểu đường type 2 ở miền bắc Trung Quốc, chi Fusobacterium, thuộc ngành Fusobacteria, tăng lên đáng kể ở bệnh nhân tiểu đường ($p = 0,019$) so với đối chứng [147].

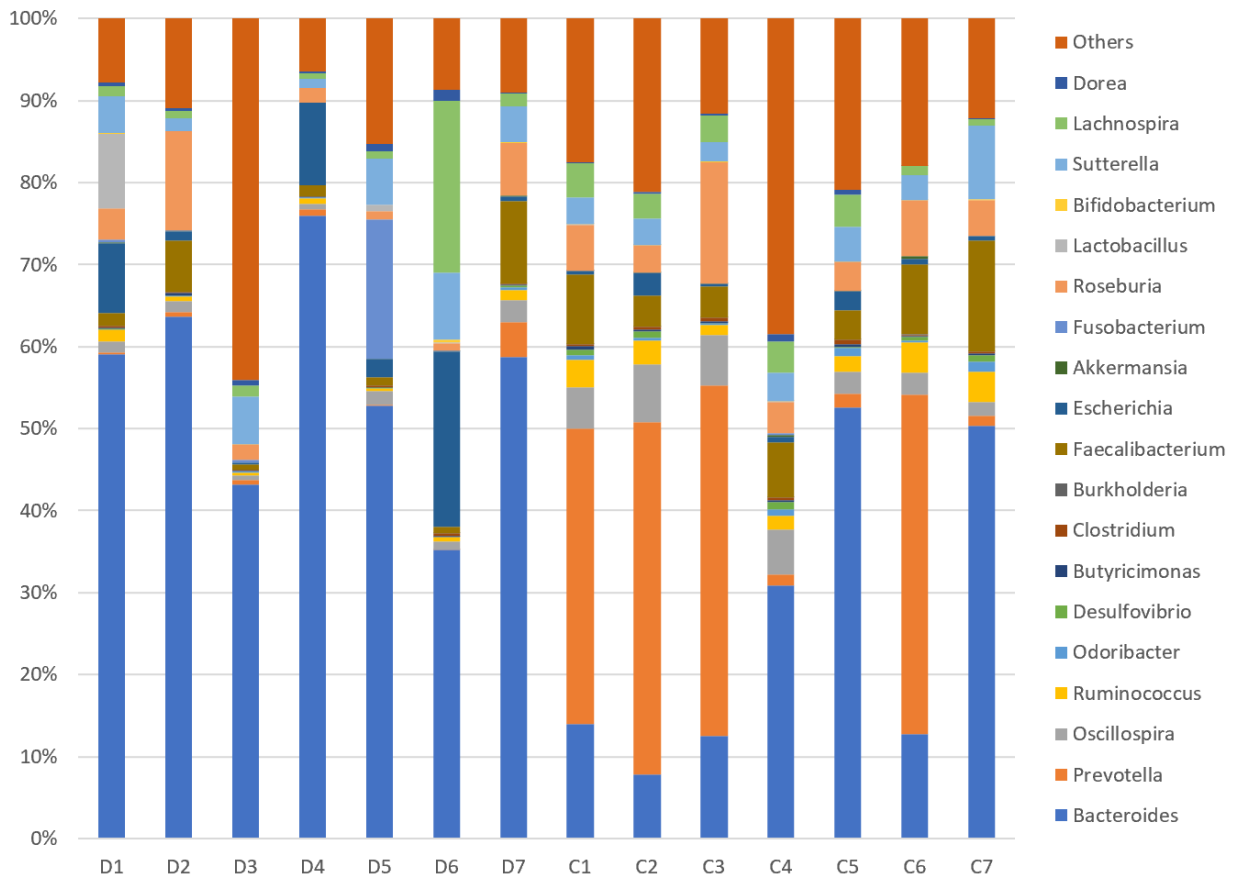
Trong số 4 ngành chiếm ưu thế, chỉ duy nhất sự khác biệt của ngành Firmicutes là có ý nghĩa thống kê. Bên cạnh đó, 2 ngành còn lại, như Synergistetes và các vi sinh vật khác (Others), sự khác biệt giữa 2 nhóm nghiên cứu cũng có ý nghĩa thống kê với p lần lượt là 0.042 và 0.047.

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 [62]. 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.

Bảng 3.5. Tỷ lệ trung bình một số chi vi sinh vật trong phân của nhóm nữ giới tiểu đường type 2 và nhóm nữ giới không tiểu đường

TT	Chi vi sinh vật	Tỷ lệ trung bình (%)		Chỉ số p
		Nhóm nữ không tiểu đường	Nhóm nữ tiểu đường type 2	
1	<i>Bacteroides</i>	22.897	47.934	0.010
2	<i>Prevotella</i>	21.476	0.847	0.014
3	<i>Oscillospira</i>	3.901	1.136	0.002
4	<i>Ruminococcus</i>	2.397	0.609	0.001
5	<i>Desulfovibrio</i>	0.460	0.054	0.003
6	<i>Odoribacter</i>	0.548	0.114	0.009
7	<i>Clostridium</i>	0.257	0.119	0.016
8	<i>Butyricimonas</i>	0.232	0.082	0.007
9	<i>Burkholderia</i>	0.041	0.010	0.001
10	<i>Faecalibacterium</i>	6.202	2.789	0.084
11	<i>Escherichia</i>	0.983	4.968	0.098
12	<i>Akkermansia</i>	0.084	0.020	0.220
13	<i>Fusobacterium</i>	0.029	2.151	0.312
14	<i>Roseburia</i>	5.427	3.503	0.353
15	<i>Lactobacillus</i>	0.018	1.067	0.286
16	<i>Bifidobacterium</i>	0.034	0.055	0.510
17	<i>Sutterella</i>	3.636	3.714	0.943
18	<i>Lachnospira</i>	2.533	3.030	0.819
19	<i>Dorea</i>	0.299	0.468	0.330
20	Others	17.676	12.939	0.418



Hình 3.11. Độ phong phú tương đối ở mức độ chi của hệ vi sinh vật trong phân 7 nữ giới tiêu đường type 2 (D1-D7) và 7 nữ giới không tiêu đường (C1-C7)

Khi nghiên cứu thành phần vi khuẩn 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 (Bảng 3.5, Hình 3.11).

Nhiều báo cáo cho thấy, các chi *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Roseburia* và *Bifidobacterium* gia tăng ở người tiêu đường type 2, trong khi các chi *Ruminococcus*, *Fusobacterium* và *Blautia* lại giảm [141].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, chi *Bacteroides* gia tăng mạnh ở nhóm bệnh tiêu đường type 2 (giá trị trung bình 47,93% so với 22,9%), và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p = 0,009$). Trong số các nghiên cứu về hệ vi khuẩn đường ruột của người tiêu đường type 2, *Bacteroides* là một trong hai đại diện thường xuyên được quan tâm nghiên cứu nhất. Trong số 8 nghiên cứu được thực hiện, 5 nghiên cứu cho thấy, *Bacteroides* tăng cao ở người tiêu đường type 2 [56], [148], [149], [150], [151] trong khi 3 nghiên cứu khác cho thấy sự suy giảm của vi khuẩn này [152], [153]. Sự không nhất quán này có thể được giải thích là do tác dụng kháng khuẩn của thuốc điều trị tiêu đường metformin [154] hoặc do đặc thù riêng của mỗi cá thể khi tương

tác với hệ vi khuẩn đường ruột. Nghiên cứu của He và cộng sự [155], [156] cho thấy *Bacteroides intestinalis* và *Bacteroides vulgatus* đã giảm ở người mắc bệnh tiểu đường type 2 nhưng *Bacteroides stercoris* lại tăng. Khi thử nghiệm trên động vật, bổ sung *Bacteroides acidifaciens* [157] và *Bacteroides uniformis* [158] đã cải thiện tình trạng không dung nạp glucose và kháng insulin ở chuột bị tiểu đường. Như vậy có thể thấy, *Bacteroides* có thể đóng một vai trò có lợi đối với quá trình chuyển hóa glucose ở người tiểu đường type 2.

Đối với chi *Prevotella*, ở người tiểu đường type 2 vi khuẩn này giảm đi rõ rệt (giá trị trung bình 0,85% so với 21,48%) với $p = 0,014$. *Prevotella* là một trong 2 chi chiếm ưu thế trong ngành Bacteroidetes. Vi khuẩn *Bacteroides* thông thường rất phổ biến, nhưng khi *Prevotella* xuất hiện thì các vi khuẩn thuộc chi *Bacteroides* sẽ giảm đi rõ rệt [28], [159]. Nghiên cứu cho thấy sự phong phú của *Prevotella* cao hơn có liên quan đến chế độ ăn kiểu giàu trái cây và rau xanh, trong khi sự phong phú của *Bacteroides* thường liên quan đến chế độ ăn giàu chất béo và giàu protein [29], [160]. Như vậy sự gia tăng *Bacteroides* và giảm *Prevotella* ở người tiểu đường có thể do ảnh hưởng của chế độ ăn uống. Tuy nhiên, tác dụng của vi khuẩn này phụ thuộc vào chủng vì trong khi một số chủng *Prevotella* trong ruột cải thiện quá trình chuyển hóa glucose thì một số chủng khác lại thúc đẩy các bệnh như hội chứng chuyển hóa và béo phì [161].

Bảng 3.5 cho thấy, chi *Odoribacter* và *Clostridium* giảm đi ở bệnh nhân tiểu đường. *Odoribacter* và *Clostridium* là vi khuẩn có tác dụng cải thiện bệnh tiểu đường type 2. Những rối loạn liên quan đến béo phì của hệ vi khuẩn đường ruột được đặc trưng bởi sự gia tăng số lượng lớn các vi khuẩn sản xuất succinate, đồng thời với việc giảm lượng vi khuẩn tiêu thụ succinate như *Odoribacter* và *Clostridium* [162]. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi, kết quả phân tích cho thấy, 2 chi vi khuẩn này bị giảm đi ở người bệnh tiểu đường type 2 so với người không mắc bệnh tiểu đường.

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). Trong chi vi khuẩn *Ruminococcus*, loài *Ruminococcus gnavus* có thể gây bệnh do chúng tổng hợp một polysacaride phức tạp với chuỗi chính rhamnose và chuỗi bên glucose, polysacaride này làm tăng sự bài tiết các độc tố gây viêm như TNF α [163].

Ngoài ra, những nghiên cứu gần đây cho thấy hệ vi sinh vật của người mắc bệnh tiểu đường type 2 có sự gia tăng của vi khuẩn khử sulphate *Desulfovibrio*. 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 [164].

Ngoài ra, kết quả phân tích từ hình 3.11 cũng chỉ ra rằng 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 [165].

Theo tìm hiểu của chúng tôi, một số vi khuẩn thuộc chi *Bifidobacterium* như *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. pseudocatenulatum* và *B. breve* đều cải thiện khả năng dung nạp glucose ở động vật bị bệnh tiểu đường type 2 [166], [167]. Với những chi vi khuẩn còn lại, mặc dù có sự khác biệt khi so sánh giữa người tiểu đường type 2 và người không bị tiểu đường, nhưng những sai khác này không có ý nghĩa thống kê.

Hệ vi sinh vật có liên quan đến sinh lý bệnh của nhiều bệnh mãn tính trong đó có tiểu đường type 2. Trong 10 năm qua, số lượng dữ liệu chỉ ra những thay đổi về thành phần hoặc chức năng của vi khuẩn đường ruột ở bệnh nhân tiểu đường type 2 thu được ngày càng tăng. Nhiều kết quả ngược nhau đã được ghi nhận. Phân tích “rối loạn vi khuẩn” cho phép phát hiện những thay đổi ở vi khuẩn liên quan đến sự xuất hiện hoặc tiến triển của bệnh tiểu đường type 2. Một nghiên cứu lớn gần đây đã quan sát thấy rằng các vi khuẩn khác nhau được tìm thấy có liên quan đến kết quả trao đổi chất giống nhau ở các khu vực địa lý khác nhau [155]. Sự khác biệt giữa các kết quả và sự bất đồng về cách diễn giải là những đặc điểm chung của bất kỳ lĩnh vực khoa học mới nổi nào. Tuy nhiên, khi xác định được các thuộc tính của các vi sinh vật trong cơ thể người với bệnh tiểu đường type 2 sẽ góp phần làm rõ ràng hơn vấn đề này.

Trong một nghiên cứu khác với 150 người tham gia gồm có 74 người mắc bệnh tiểu đường type 2 và 76 người không mắc bệnh tiểu đường. Kết quả cho thấy, nhóm người mắc bệnh tiểu đường type 2 có những khác biệt về hệ vi sinh vật đường

ruột: so với nhóm người không mắc bệnh tiểu đường và mức đa dạng α thấp hơn, tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes cao hơn, và đặc biệt, sự đa dạng β khác biệt có ý nghĩa thống kê. Ở cấp độ ngành, hầu hết các lần đọc trình tự được phân thành bốn nhóm ngành và chiếm 98,61%, bao gồm: Firmicutes (65,33%), Bacteroidetes (18,33%), Actinobacteria (8,03%) và Proteobacteria (6,94%). Sự phong phú tương đối của từng hệ vi sinh vật đường ruột ở cấp độ ngành không khác biệt đáng kể giữa nhóm mắc bệnh tiểu đường và nhóm không mắc bệnh tiểu đường. Ở cấp độ chi, 21 chi có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm người mắc bệnh tiểu đường type 2 và nhóm người không mắc bệnh tiểu đường.

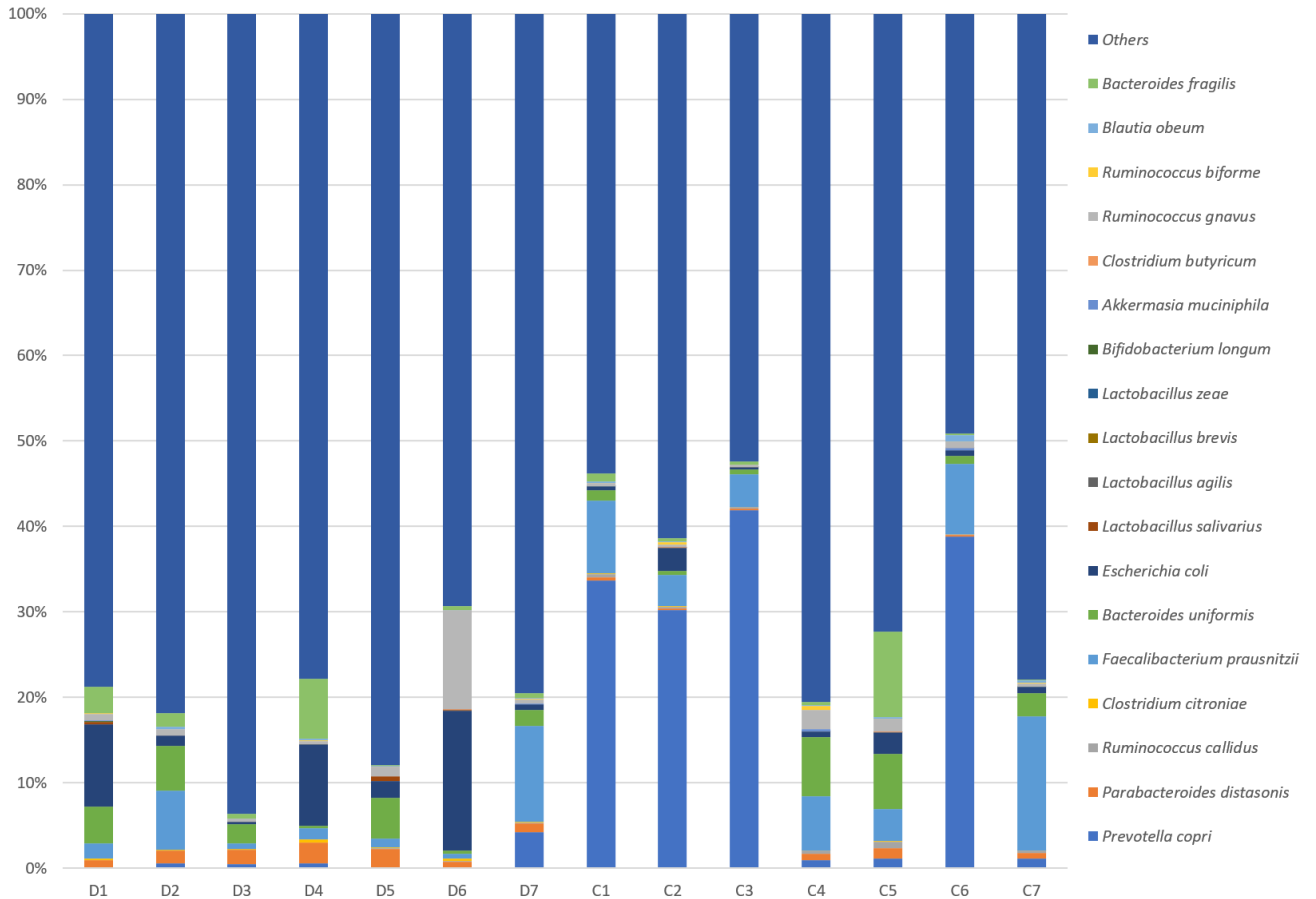
Khi phân tích các vi sinh vật trong cơ thể người của 2 nhóm, ở cấp độ phân loại ngành, thành phần giữa các cá thể khá giống nhau, trong khi ở cấp độ phân loại loài, sự tương đồng này bị mất đi.

Bảng 3.6. Tỷ lệ trung bình một số loài vi sinh vật trong phân của nhóm nữ giới

TT	Loài vi sinh vật	Tỷ lệ trung bình (%)		Chỉ số p
		Nhóm nữ không tiểu đường	Nhóm nữ tiểu đường type 2	
1	<i>Prevotella copri</i>	19.180	0.711	0.017
2	<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.441	1.348	0.007
3	<i>Ruminococcus callidus</i>	0.267	0.033	0.005
4	<i>Clostridium citroniae</i>	0.030	0.126	0.041
5	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6.198	2.788	0.084
6	<i>Bacteroides uniformis</i>	0.983	4.968	0.944
7	<i>Escherichia coli</i>	2.344	2.264	0.098
8	<i>Lactobacillus salivarius</i>	0.010	0.119	0.143
9	<i>Lactobacillus agilis</i>	0.003	0.000	0.337
10	<i>Lactobacillus brevis</i>	0.000	0.002	0.337
11	<i>Lactobacillus zeae</i>	0.002	0.000	0.147
12	<i>Bifidobacterium longum</i>	0.010	0.011	0.911
13	<i>Akkermasia muciniphia</i>	0.084	0.020	0.220
14	<i>Clostridium butyricum</i>	0.007	0.006	0.866
15	<i>Ruminococcus gnavus</i>	0.709	2.063	0.399

16	<i>Ruminococcus biforme</i>	0.124	0.014	0.102
17	<i>Blautia obeum</i>	0.198	0.121	0.432
18	<i>Bacteroides fragilis</i>	1.444	1.640	0.892
19	<i>Others</i>	55.566	70.748	0.023

Hình 3.12. Độ phong phú tương đối ở mức độ loài 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)

Trong tất cả các loài được phân tích và 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* (Bảng 3.6, Hình 3.22). Trong đó *P. copri* bị suy giảm ở nhóm người tiểu đường. Báo cáo cho thấy, vi khuẩn này được chứng minh có tác dụng hạ đường huyết ở chuột và ở người [168].

Prevotella, vi khuẩn gram âm kỵ khí bắt buộc, là một trong những loài phổ biến nhất trong đường tiêu hóa của con người [169]. Khoảng 10-25% người Mỹ và châu Âu khỏe mạnh, lượng *Prevotella* trong phân có thể chiếm đến trên 10%. Trong số 5 loài *Prevotella* được báo cáo có mặt trong ruột người thì *P. copri* chiếm tỉ lệ nhiều nhất [170], [171].

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 [58]. *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.

Béo phì là một yếu tố nguy cơ chính đối với bệnh tiểu đường type 2, chiếm 90–95% trong tất cả các trường hợp mắc bệnh tiểu đường [172]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối liên hệ trực tiếp giữa thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột và cơ chế bệnh sinh của bệnh béo phì và tiểu đường [173]. Chế độ ăn gây béo phì có thể dẫn đến tăng tính thấm của ruột và rối loạn vi sinh vật, góp phần gây viêm mãn tính trong ruột và mô mỡ, đồng thời phát triển tình trạng kháng insulin, hậu quả dẫn đến bệnh tiểu đường type 2 [174].

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 [175], [176], [177]. 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 [178].

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.

Kết quả trong Bảng 3.6 cho thấy, *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 [179].

Những nghiên cứu gần đây cho thấy *Bacteroides uniformis* có vai trò quan trọng trong chuyển hóa giúp giảm cân, giảm chứng gan nhiễm mỡ, giảm nồng độ cholesterol và triglyceride ở gan, tăng các acid béo chuỗi ngắn [180]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, kết quả phân tích cho thấy hầu như không có sự khác biệt giữa thành phần loài *B. uniformis* ở mẫu đối chứng (2,34%) và mẫu người tiểu đường type 2 (2,26%).

Phân tích các loài chính thuộc ngành Firmicutes cho thấy có sự khác biệt giữa thành phần loài vi khuẩn *F. prausnitzii*. Ở người tiểu đường type 2, vi khuẩn này giảm đi rõ rệt, chỉ còn 2,79% so với 6,20% ở mẫu đối chứng. *F. prausnitzii* là vi khuẩn sản xuất butyrate chiếm ưu thế trong đường ruột và chúng chiếm tới 4% hệ vi sinh vật đường ruột [181]. Vi khuẩn này sản xuất các chất chuyển hóa chống viêm nhờ duy trì chức năng của hàng rào ruột, giúp giảm viêm nhiễm ở người béo phì [182]. Khi bị tiểu đường type 2, sự phong phú của *F. prausnitzii* đã giảm rõ rệt. Khi số lượng giảm đi, butyrate được tạo ra ở mức độ thấp và sẽ tạo điều kiện để các vi khuẩn sản xuất các cytokine gây viêm, làm tăng nguy cơ viêm nhiễm.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm người tiểu đường type 2 có sự gia tăng đáng kể về vi khuẩn *E. coli* (4,97% so với 0,98%). *E. coli* là một trong những mầm bệnh phổ biến nhất ở bệnh nhân tiểu đường. Khoảng 70% bệnh nhân tiểu đường bị nhiễm trùng đường tiết niệu, và khoảng 40% bệnh nhân tiểu đường bị viêm túi mật là do nhiễm vi khuẩn này [183]. Đường máu cao ở người bệnh có tác động tiêu cực đến chức năng thực bào, do đó người tiểu đường type 2 dễ bị nhiễm khuẩn.

Một nghiên cứu toàn bộ metagenome của người đã chứng minh rằng ở bệnh nhân tiểu đường, mức *Lactobacillus* spp và *Bifidobacterium* spp cao hơn nhiều so với người không mắc bệnh tiểu đường [184]. Tuy nhiên, so với *Bifidobacterium*, chi *Lactobacillus* mặc dù được nghiên cứu và báo cáo thường xuyên, nhưng các kết quả thường có sự không đồng nhất.

Trong nghiên cứu này có 4 loài thuộc chi *Lactobacillus* là *L. salivarius*, *L. agilis*, *L. brevis* và *L. zae* được phát hiện. Trong số 4 loài, lượng vi sinh vật thuộc loài *L. salivarius* ở nhóm bệnh tiểu đường type 2 có xu hướng cao hơn so với nhóm đối chứng (0,119% so với 0,01%), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,143$). *Lactobacillus salivarius* là vi khuẩn tồn tại trong miệng và ruột non,

vi khuẩn này có vai trò tăng cường hệ thống miễn dịch. Trong nghiên cứu của Pei-Shan Hsieh và cộng sự cho thấy *L. salivarius* có thể tăng cường biểu hiện GLUT2 trong các tế bào biểu mô ruột của người, giúp vận chuyển glucose từ máu vào tế bào và giúp điều chỉnh quá trình chuyển hóa lipid trong máu ở người tiểu đường type 2. Bên cạnh đó, *L. salivarius* còn làm giảm đáng kể tổn thương gan và thận [185]. Wang và cộng sự đã phát hiện ra khả năng của *L. salivarius* để điều chỉnh giảm các cytokine gây viêm IL-8, TNF- α , IL-17, MIP-1 β đồng thời điều chỉnh tăng cytokine kháng viêm TGF- β 1, đây là những cytokine liên quan đến cơ chế bệnh sinh của tiểu đường [186]. Vi khuẩn gia tăng trong ruột của bệnh nhân tiểu đường type 2 cũng bao gồm vi khuẩn khử sulphate *Desulfovibrio*, cũng như *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus plantarum* [187], [188]. Hơn nữa, việc điều trị người bệnh tiểu đường tít 2 tại Nhật Bản bằng thuốc ức chế α -glucosidase đã làm tăng *Lactobacillus* spp [188].

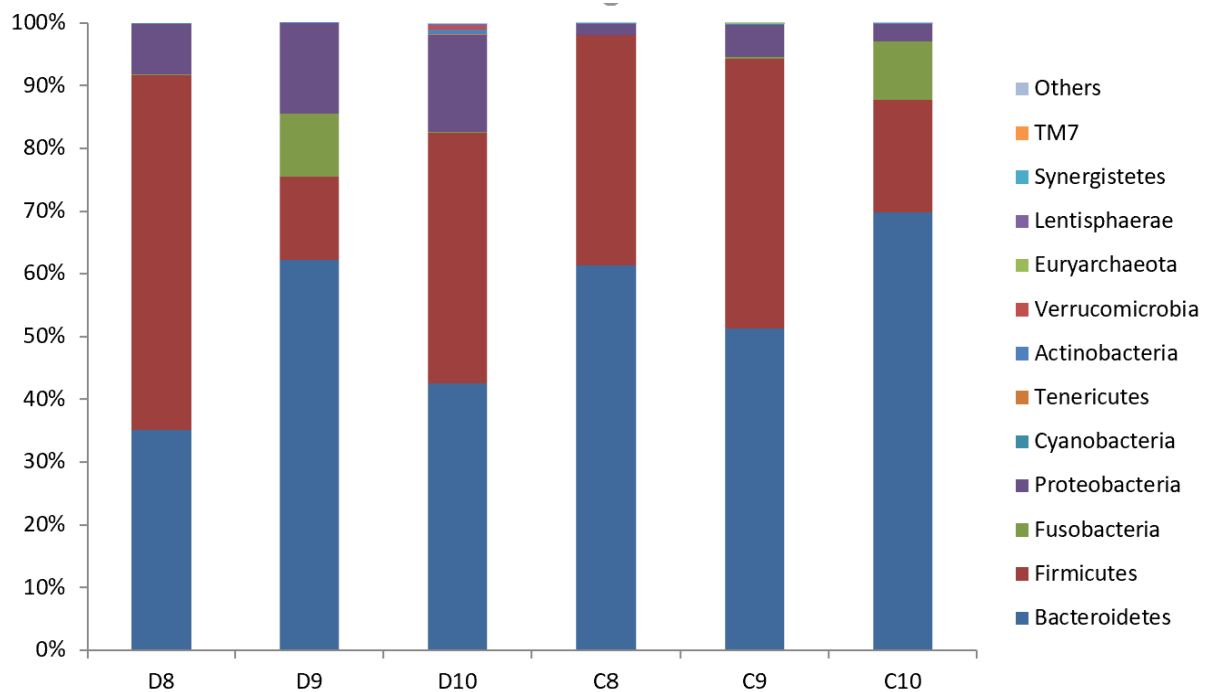
3.1.3.2. Kết quả phân tích thành phần loài ở nhóm nam giới

Số lượng trình tự đọc của 2 nhóm gồm 13 ngành chính (Hình 3.13). Kết quả Hình 3.13 chỉ ra rằng 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 tiểu 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.

Bảng 3.7. Tỷ lệ trung bình một số ngành vi sinh vật trong phân của nhóm nam giới tiểu đường type 2 và nhóm nam giới không tiểu đường

TT	Ngành vi sinh vật	Tỷ lệ trung bình (%)		Chỉ số p
		Nhóm nam tiểu đường type 2	Nhóm nam không tiểu đường	
1	Bacteroidetes	46.601	60.826	0.216
2	Firmicutes	36.522	32.469	0.796
3	Fusobacteria	3.540	3.232	0.948
4	Proteobacteria	12.582	3.225	0.021

5	Cyanobacteria	0.030	0.009	0.363
6	Tenericutes	0.021	0.023	0.917
7	Actinobacteria	0.311	0.103	0.373
8	Verrucomicrobia	0.189	0.023	0.430
9	Euryarchaeota	0.009	0.014	0.795
10	Lentisphaerae	0.102	0.019	0.461
11	Synergistetes	0.023	0	0.374
12	TM7	0	0	#DIV/0!
13	Others	0.056	0.049	0.909

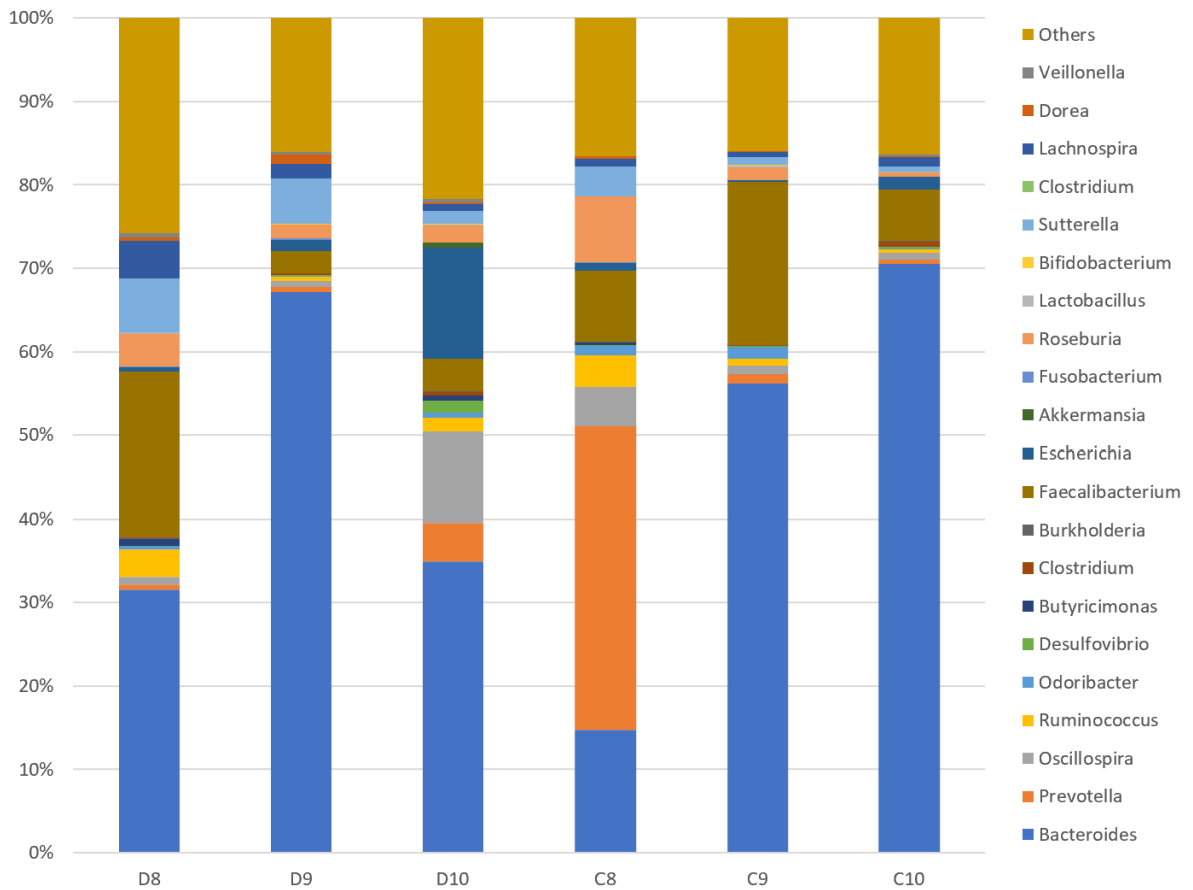


Hình 3.13. Độ phong phú tương đối ở mức độ ngành của hệ vi sinh vật trong phân 3 nam giới tiểu đường type 2 (D8-D10) và 3 nam giới không tiểu đường (C8-C10)

Kết quả phân tích trình tự của 22 chi vi khuẩn chính (Bảng 3.8, Hình 3.14) chỉ ra rằng nhóm người bị bệnh tiểu 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 tiểu đường type 2 là 0,39%, sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê ($p = 0,025$).

Bảng 3.8. Tỷ lệ trung bình một số chi vi sinh vật trong phân của nhóm nam giới tiểu đường type 2 và nhóm nam giới không tiểu đường

TT	Chi vi sinh vật	Tỷ lệ trung bình (%)		Chỉ số p
		Nhóm nam tiểu đường type 2	Nhóm nam không tiểu đường	
1	<i>Bacteroides</i>	39.731	44.158	0.829
2	<i>Prevotella</i>	1.743	10.811	0.420
3	<i>Oscillospira</i>	3.700	1.921	0.605
4	<i>Ruminococcus</i>	1.624	1.437	0.882
5	<i>Odoribacter</i>	0.351	0.803	0.302
6	<i>Desulfovibrio</i>	0.449	0.101	0.422
7	<i>Butyricimonas</i>	0.449	0.112	0.205
8	<i>Clostridium</i>	0.243	0.250	0.976
9	<i>Burkholderia</i>	0.021	0.030	0.618
10	<i>Faecalibacterium</i>	7.895	10.464	0.705
11	<i>Escherichia</i>	4.493	0.835	0.378
12	<i>Akkermansia</i>	0.190	0.023	0.422
13	<i>Fusobacterium</i>	0.094	0.002	0.185
14	<i>Roseburia</i>	2.265	2.855	0.788
15	<i>Lactobacillus</i>	0.089	0.077	0.825
16	<i>Bifidobacterium</i>	0.044	0.023	0.531
17	<i>Sutterella</i>	4.011	1.507	0.184
18	<i>Lachnospira</i>	2.132	0.840	0.275
19	<i>Dorea</i>	0.512	0.143	0.228
20	<i>Veillonella</i>	0.377	0.080	0.025
21	<i>Others</i>	18.954	14.878	0.200



Hình 3.14. Độ phong phú tương đối ở mức độ chi của hệ vi sinh vật trong phân 3 nam giới tiểu đường type 2 (D8-D10) và 3 nam giới không tiểu đường (C8-C10)

Ngoài ra, khi nghiên cứu 2 chi probiotic là *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* chúng tôi thấy nhóm người tiểu đường type 2 có tỷ lệ 2 chi vi khuẩn này đều cao hơn so với nhóm đối chứng. Đối với chi *Lactobacillus* ở nhóm đối chứng tỷ lệ trung bình là 0,077% và nhóm tiểu đường type 2 là 0,089%. Chi *Bifidobacterium* chiếm 0,023% ở nhóm đối chứng và 0,045% ở nhóm tiểu đường type 2. Nguyên nhân dẫn tới 2 chi vi khuẩn này tăng ở nhóm bệnh tiểu đường có thể do người mắc bệnh tiểu đường thường ăn ít tinh bột, nhưng lại ăn nhiều chất xơ, đây có thể là nguyên nhân làm tăng 2 nhóm vi khuẩn probiotic này.

Trong ngành Bacteroidetes, vi khuẩn thuộc lớp Bacteroidia chiếm đa số trong cả mẫu đối chứng và mẫu nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2. Tuy nhiên ở mẫu đối chứng có tỷ lệ trung bình Bacteroidia cao hơn so với mẫu nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2 (60,82% và 46,60% tương ứng). Trong số các loài thuộc lớp Bacteroidia, loài vi khuẩn *B. uniformis* trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự khác biệt giữa thành phần loài *B. uniformis* ở mẫu đối chứng (3,22%) và mẫu người tiểu đường type 2 (1,13%) ($p = 0,44$).

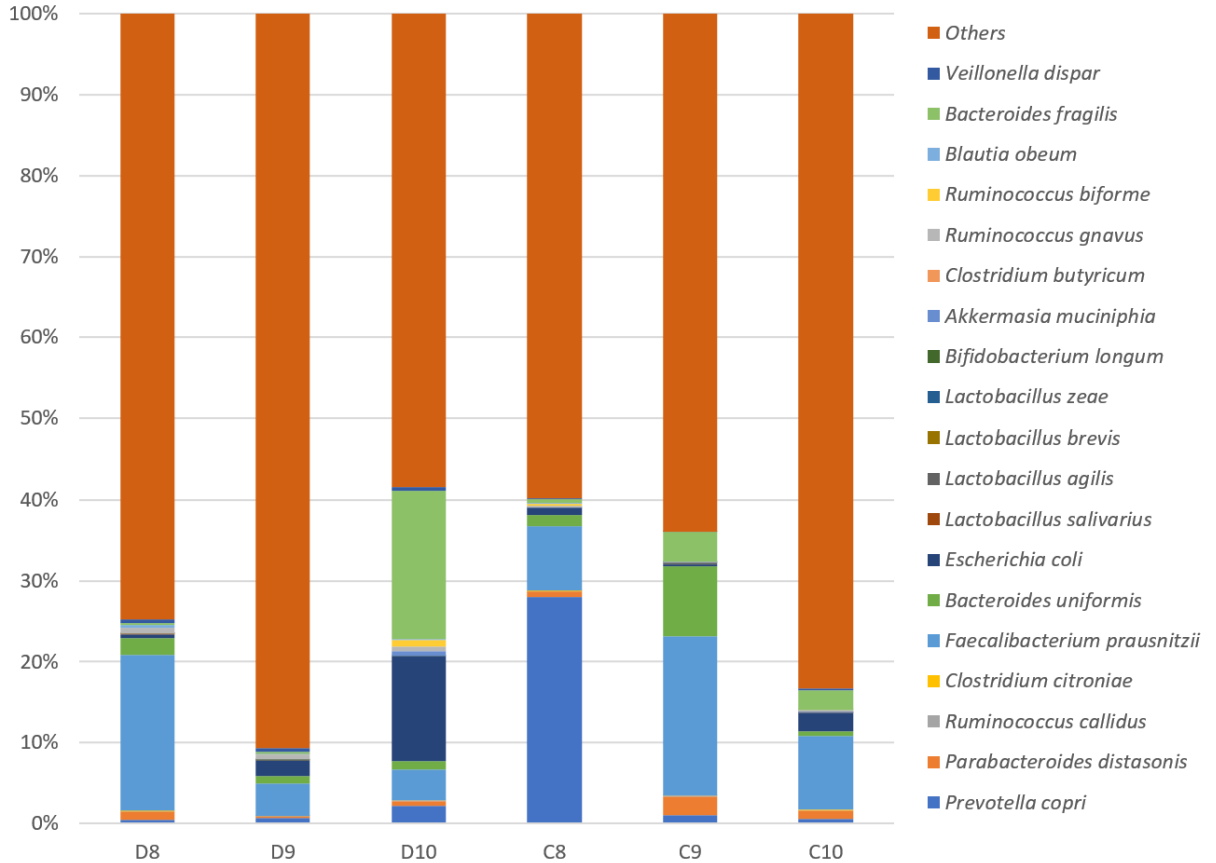
Phân tích các loài chính thuộc ngành Firmicutes (Hình 3.15) cho thấy có sự khác biệt giữa thành phần loài vi khuẩn *F. prausnitzii*. Ở mẫu đối chứng thành phần loài vi khuẩn chiếm 10,46% và mẫu người tiểu đường type 2 chiếm 7,9%. Thành phần loài vi khuẩn *F. prausnitzii* ở nhóm đối chứng cao hơn so với nhóm nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2 ($p = 0,70$). Đây là vi khuẩn sản xuất butyrate và các axit béo chuỗi ngắn trong đường tiêu hóa, vì vậy đây có thể là một trong loài ảnh hưởng hoặc liên quan đến bệnh tiểu đường type 2.

Phân tích loài thuộc ngành Proteobacteria cho thấy có sự khác biệt giữa thành phần loài *E. coli*. Ở mẫu đối chứng thành phần loài *E. coli* chiếm 0,8354%, trong khi ở người tiểu đường type 2 là 4,4928% ($p = 0,37$).

Bảng 3.9. Tỷ lệ trung bình một số loài vi sinh vật trong phân của nhóm nam giới tiểu đường type 2 và nhóm nam giới không tiểu đường

TT	Loài vi sinh vật	Tỷ lệ trung bình (%)		Chỉ số p
		Nhóm nam tiểu đường type 2	Nhóm nam không tiểu đường	
1	<i>Prevotella copri</i>	0.913	8.967	0.387
2	<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.576	1.144	0.361
3	<i>Ruminococcus callidus</i>	0.026	0.021	0.749
4	<i>Clostridium citroniae</i>	0.040	0.063	0.502
5	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	7.895	10.460	0.705
6	<i>Bacteroides uniformis</i>	1.126	3.225	0.443
7	<i>Escherichia coli</i>	4.493	0.835	0.378
8	<i>Lactobacillus salivarius</i>	0.021	0.002	0.275
9	<i>Lactobacillus agilis</i>	0.007	0.056	0.408
10	<i>Lactobacillus brevis</i>	0.000	0.000	#DIV/0!
11	<i>Lactobacillus zeae</i>	0.000	0.000	#DIV/0!
12	<i>Bifidobacterium longum</i>	0.009	0.009	1.000
13	<i>Akkermasia muciniphia</i>	0.190	0.023	0.422
14	<i>Clostridium butyricum</i>	0.005	0.000	0.374
15	<i>Ruminococcus gnavus</i>	0.489	0.145	0.023
16	<i>Ruminococcus biforme</i>	0.260	0.073	0.511

17	<i>Blautia obeum</i>	0.164	0.080	0.453
18	<i>Bacteroides fragilis</i>	5.679	1.771	0.522
19	<i>Veillonella dispar</i>	0.344	0.073	0.026
20	<i>Others</i>	58.769	55.854	0.625



Hình 3.15. Độ phong phú tương đối ở mức độ loài hệ vi sinh vật trong phân 3 nam giới bệnh tiểu đường type 2 (D8-D10) và 3 nam giới không tiểu đường (C8-C10)

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* (Bảng 3.9). Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có các nghiên cứu sâu về tác động của các loài này đối với người tiểu đường type 2.

Đi vào phân tích cụ thể 02 chi vi khuẩn probiotics là *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* chúng tôi thấy nhóm nữ tiểu đường type 2 có tỷ lệ 2 chi vi khuẩn này đều cao hơn nhóm đối chứng. Đối với chi *Lactobacillus* ở nhóm đối chứng tỷ lệ là 0,018% và nhóm tiểu đường type 2 là 1,07% ($p = 0,29$). Chi *Bifidobacterium* chiếm 0,034% ở nhóm đối chứng và 0,055% ở nhóm tiểu đường type 2 ($p = 0,51$). Phân tích đối với nhóm nam (Bảng 3.9) thì nhóm tiểu đường cũng cho kết quả 2 chi vi khuẩn này cao hơn nhóm đối chứng. Mặc dù *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* là hai chi vi

khuẩn gram dương được sử dụng rộng rãi như các chế phẩm sinh học để cải thiện thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột nhưng cho đến nay sự khác biệt giữa 2 nhóm vẫn chưa rõ ràng. Các nghiên cứu cơ bản đều cho kết quả *Lactobacillus* ở người tiểu đường type 2 cao hơn ở người không tiểu đường. Số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium* ở người tiểu đường type 2 có xu hướng thấp hơn ở người không tiểu đường. Thành phần hệ vi sinh vật đường ruột thay đổi nhiều ở những người mắc bệnh tiểu đường type 2. Số lượng vi khuẩn gram dương, chẳng hạn như *Lactobacillus* và *Clostridium* (phylum Firmicutes) và *Bifidobacterium* (phylum Actinobacteria) giảm. Trong khi đó, số lượng vi khuẩn gram âm thuộc ngành Bacteroidetes tăng lên [189]. Số lượng vi khuẩn gram âm cao có thể làm tăng nguy cơ biến chứng ở những người mắc bệnh tiểu đường type 2.

Nguyên nhân chi vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* trong nghiên cứu của chúng tôi và các nghiên cứu khác tăng ở nhóm người tiểu đường type 2 có thể là do sử dụng các sản phẩm probiotics hằng ngày hoặc khi sử dụng giải trình tự các sản phẩm PCR đã phát hiện vi khuẩn chết không biểu hiện tác dụng trao đổi chất của chúng. Một số kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, khi sử dụng sữa chua có chứa vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* để giảm stress thì cũng giảm giá trị glucose máu và kháng insulin [190].

Nghiên cứu của Sato cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus* có xu hướng gia tăng ở những người mắc bệnh tiểu đường type 2 ở Nhật Bản, cũng như những người mắc bệnh tiểu đường type 2 ở Châu Âu. Các nghiên cứu đối với người tiểu đường type 2 và người không tiểu đường ở Châu Á cũng thấy có sự khác biệt về số lượng *Lactobacillus*. Tất cả các nghiên cứu này đều có chung kết quả là *Lactobacillus* ở người mắc bệnh tiểu đường type 2 cao hơn người không tiểu đường. Theo các nghiên cứu trước đây, không phải tất cả các vi khuẩn *Lactobacillus* đều có tác dụng tích cực đối với người mắc bệnh tiểu đường [188]. Vì vậy cần nghiên cứu thêm để xác định sự khác biệt về số lượng vi khuẩn *Lactobacillus* trên từng nhóm đối tượng, từ đó đưa ra kết quả chi tiết, cụ thể.

Các khả năng khác có thể là nguyên nhân khiến số lượng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* khác biệt giữa 2 nhóm nghiên cứu đó là do sử dụng thuốc trong điều trị bệnh tiểu đường type 2. Một số nghiên cứu trước đây cho biết có xu hướng giảm số lượng vi khuẩn *Lactobacillus* trong đường tiêu hóa của những người mắc bệnh tiểu

đường loại 2. Tuy nhiên, điều này có thể thay đổi nếu bệnh nhân bắt đầu thực hiện các thói quen mới như ăn thực phẩm giàu probiotics, thực phẩm giàu chất xơ hoặc dùng thuốc chống tăng đường huyết. Khi ăn thực phẩm giàu probiotics như sữa chua, kefir, pho mát và thực phẩm giàu chất xơ không hòa tan đã làm tăng số lượng vi khuẩn *Lactobacillus* trong đường tiêu hóa [191].

Là một chi chiếm ưu thế trong ngành Firmicutes, *Lactobacillus* thể hiện tác dụng chống tiểu đường nổi bật thông qua tác dụng kích thích tiết hormone incretine và giảm nội độc tố trong máu [192]. Một số nghiên cứu cho thấy, các thuốc hạ đường huyết khác nhau có thể điều chỉnh có chọn lọc sự phong phú của các loài *Lactobacillus* sp. Nghiên cứu của Zhang và cộng sự cho rằng điều trị bằng metformin dẫn đến thay đổi hơn 20 chi. Trong đó tỷ lệ vi khuẩn sản xuất SCFA như *Butyricimonas*, *Coprococcus* và *Ruminococcus* tăng lên, phù hợp với sự thay đổi về hàm lượng SCFA trong phân. Các chi *Lactobacillus* và *Akkermansia* cộng sinh cũng tăng theo, ngược lại hai loại mầm bệnh cơ hội, *Prevotella* và *Proteus*, đã giảm khi điều trị bằng metformin [193]. Khi có sự kết hợp, Metformin và Sitagliptin đã làm tăng tính phong phú của *L. johnsonii* và *L. intestinalis* spp. Acarbose làm tăng đáng kể *L. intestinalis*, nhưng làm giảm các loài *L. johnsonii* và *Lactobacillus* sp. Trong một báo cáo khác, Wang và cộng sự đã chỉ ra rằng các chi *Lactobacillus* cũng được làm giàu sau khi điều trị bằng Liraglutide và Saxagliptin [194].

Nhưng cũng có nghiên cứu cho thấy, ở người tiểu đường type 2, sử dụng metformin làm suy giảm sự phong phú của 5 chi vi khuẩn quan trọng trong đường ruột, trong khi những người không sử dụng hoặc dùng thuốc khác thì thành phần vi khuẩn đường ruột gần giống với nhóm đối chứng không bị tiểu đường type 2 [195]. Như vậy, việc chia nhóm tiểu đường type 2 theo chế độ dùng thuốc có thể giúp đánh giá được ảnh hưởng của chúng đối với biến động về khu hệ vi khuẩn đường ruột ở người tiểu đường type 2 so với người không tiểu đường.

Một số nước như Nhật Bản, Iran và một số nơi của Trung Quốc có thói quen ăn thực phẩm chứa nhiều probiotics. Đặc biệt, Nhật Bản được biết đến là quốc gia dẫn đầu thị trường toàn cầu trong lĩnh vực men vi sinh. Kết quả đánh giá nghiên cứu ở Iran cũng cho thấy rằng người Iran đã bắt đầu nhận ra tầm quan trọng của việc tiêu thụ thực phẩm hoặc sản phẩm chứa nhiều probiotics, do đó nhu cầu về thực phẩm hoặc các sản phẩm probiotics tăng lên. Truyền thống đổi sữa thành các sản phẩm lên men cũng đã được áp dụng từ lâu ở Trung Quốc vì vậy người Trung Quốc rất có thể

đã quen với việc tiêu thụ sữa lên men có chứa vi sinh, một trong số đó là chi *Lactobacillus* [196]. Những lý do này là nguyên nhân khiến *Lactobacillus* ở người tiểu đường type 2 cao hơn so.

Đánh giá về số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium* giữa 2 nhóm, các kết quả nghiên cứu vẫn còn tranh luận. Tuy nhiên, đa số các nghiên cứu đều kết luận rằng xu hướng số lượng *Bifidobacterium* của những người không tiểu đường cao hơn so với những người tiểu đường. Bằng chứng này không đáng chú ý vì vi khuẩn thuộc chi *Bifidobacterium* có tác dụng chống viêm mà những người có thói quen ăn kiêng chất béo và những người bị rối loạn chuyển hóa như tiểu đường type 2 sẽ giảm thành phần của chi vi khuẩn *Bifidobacterium* [196].

Nghiên cứu các loài thuộc chi *Bifidobacterium* của chúng tôi cho thấy: chỉ thấy xuất hiện 1 loài là *Bifidobacterium longum* và tỷ lệ tương đương nhau giữa 2 nhóm. Nhóm nữ tiểu đường type 2 chiếm $0,011\% \pm 0,018\%$, nhóm đối chứng là $0,01\% \pm 0,015\%$; nhóm nam tiểu đường type 2 chiếm $0,009\% \pm 0,004\%$, nhóm đối chứng là $0,009\% \pm 0,016\%$. Sự khác biệt ở cả đối tượng nữ và nam đều không có ý nghĩa thống kê. *Bifidobacterium longum* ở nhóm nữ tiểu đường type 2 lớn hơn so với nhóm đối chứng. Trong khi đó, nhóm nam nghiên cứu, sự biến động loài *B. longum* ở nhóm tiểu đường type 2 nhỏ hơn so với nhóm đối chứng.

Các nghiên cứu khác cũng cho thấy số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium fragilis* và *B. longum* không khác biệt đáng kể trong đường tiêu hóa giữa 2 nhóm. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của Le và cộng sự cho thấy có sự khác biệt đáng kể về số lượng vi khuẩn *Bifidobacterium adolescentis* của những người tiểu đường type 2 và những người không tiểu đường. Số lượng *B. adolescentis* trong đường tiêu hóa của người không tiểu đường cao hơn.

Tác dụng của probiotic rất rộng và khác nhau tùy thuộc vào loài vi sinh vật. Do đó, cần nghiên cứu thêm về số lượng loài vi khuẩn từ chi *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*. Ngoài ra, nên phát triển liệu pháp dựa trên hệ vi sinh vật cho những người tiểu đường type 2, đặc biệt là vi khuẩn từ chi *Bifidobacterium* và một số loài thuộc chi *Lactobacillus* có tác dụng tích cực trong việc giảm lượng đường trong máu.

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

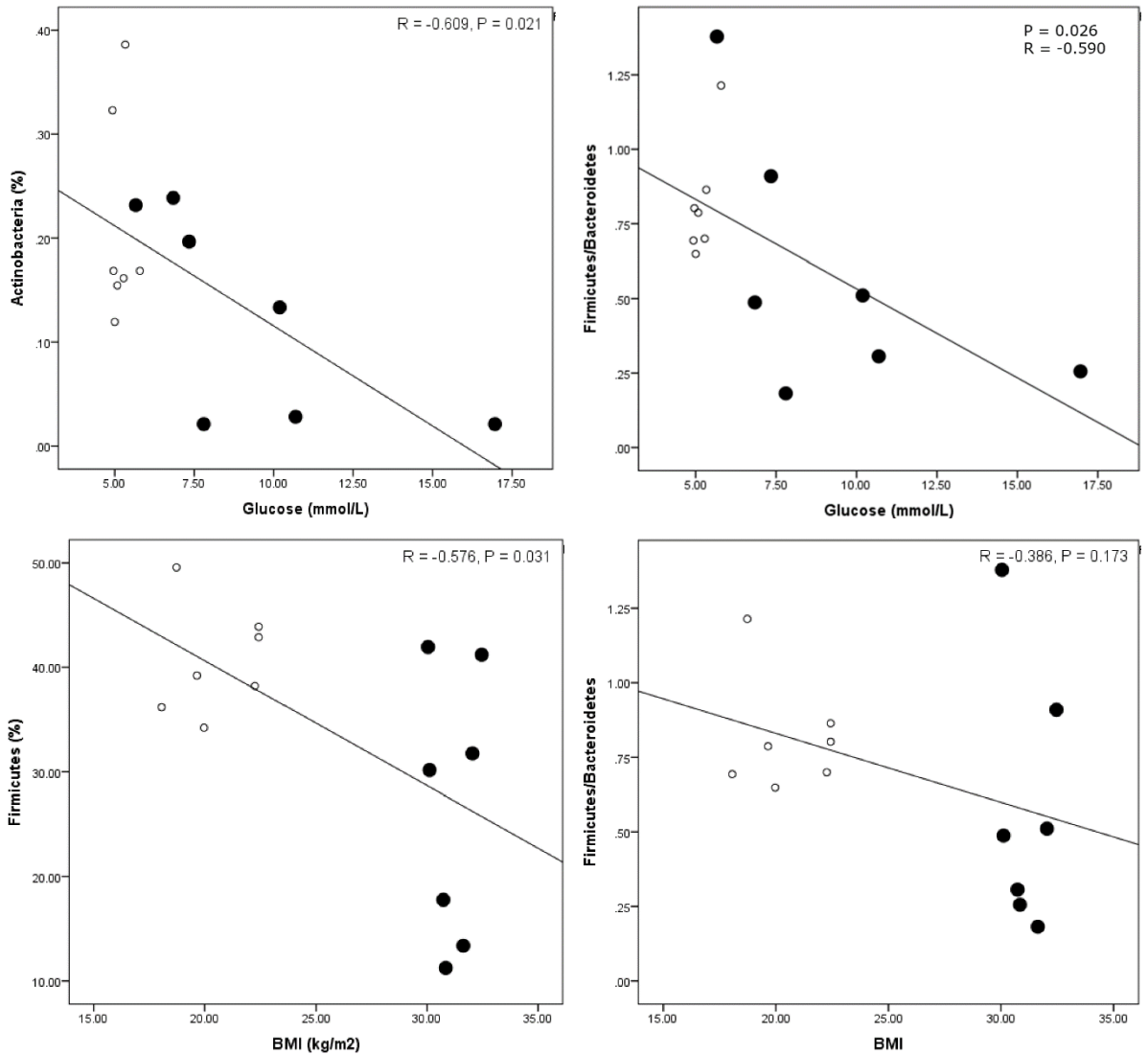
Phân tích tương quan vi khuẩn đường ruột với chỉ số BMI và glucose cho

thấy: trong số 13 ngành có 10/13 ngành có tương quan nghịch với chỉ số BMI, 11/13 ngành tương quan nghịch với chỉ số glucose. Đối với 10 ngành (Firmicutes, Cyanobacteria, Tenericutes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Euryarchaeota, Lentisphaerae, Synergistetes, TM7, Others) có mối tương quan nghịch với BMI thì cũng có tương quan nghịch với chỉ số glucose. Ngoài ra, ngành Proteobacteria có tương quan thuận với BMI nhưng tương quan nghịch với glucose. Trong số các ngành có tương quan nghịch với chỉ số glucose chỉ có ngành Actinobacteria tương quan có ý nghĩa thống kê ($R = -0.609$, $P = 0.021$). Khi nghiên cứu các ngành có tương quan nghịch với chỉ số BMI thì 04/10 ngành (Firmicutes, Lentisphaerae, Synergistetes và Others) tương quan có ý nghĩa thống kê ($R = -0.576$, $P = 0.031$; $R = -0.537$, $P = 0.048$; $R = -0.555$, $P = 0.039$ và $R = -0.539$, $P = 0.047$ tương ứng). Đối với các ngành có tương quan thuận với glucose (Bacteroidetes, Fusobacterium) và tương quan thuận với chỉ số BMI (Bacteroidetes, Fusobacterium, Proteobacteria) thì đều không có ý nghĩa thống kê.

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 ($R = -0.386$, $P = 0.173$) (Hình 3.16).

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, nhưng những thay đổi của chúng còn gây tranh cãi trong các nghiên cứu khác nhau [49], [197], [198]. Phù hợp với kết quả của chúng tôi, Duan và cộng sự cho thấy, Firmicutes của đối tượng béo phì giảm đi (đối chứng: 61,45%, béo phì: 37,39%), trong khi Bacteroidetes tăng lên đáng kể (đối chứng: 32,44%, béo phì: 53,73%), và tỷ lệ Firmicutes/Bacteroidetes giảm, phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi [199]. Tương tự như vậy, nghiên cứu của Schwiertz 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 [49].

Sự mất cân bằng trong thành phần phân loài được ghi nhận rõ ràng trong bệnh tiểu đường type 2 và được coi là sự gia tăng tương đối tỷ lệ Firmicutes/ Bacteroidetes [200]. Chứng loạn khuẩn trong các rối loạn chuyển hóa thường bao gồm sự gia tăng tỷ lệ vi khuẩn thuộc ngành Proteobacteria [201], ngành này bao gồm nhiều mầm bệnh phổ biến ở người được tìm thấy như *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Helicobacter...* [202].

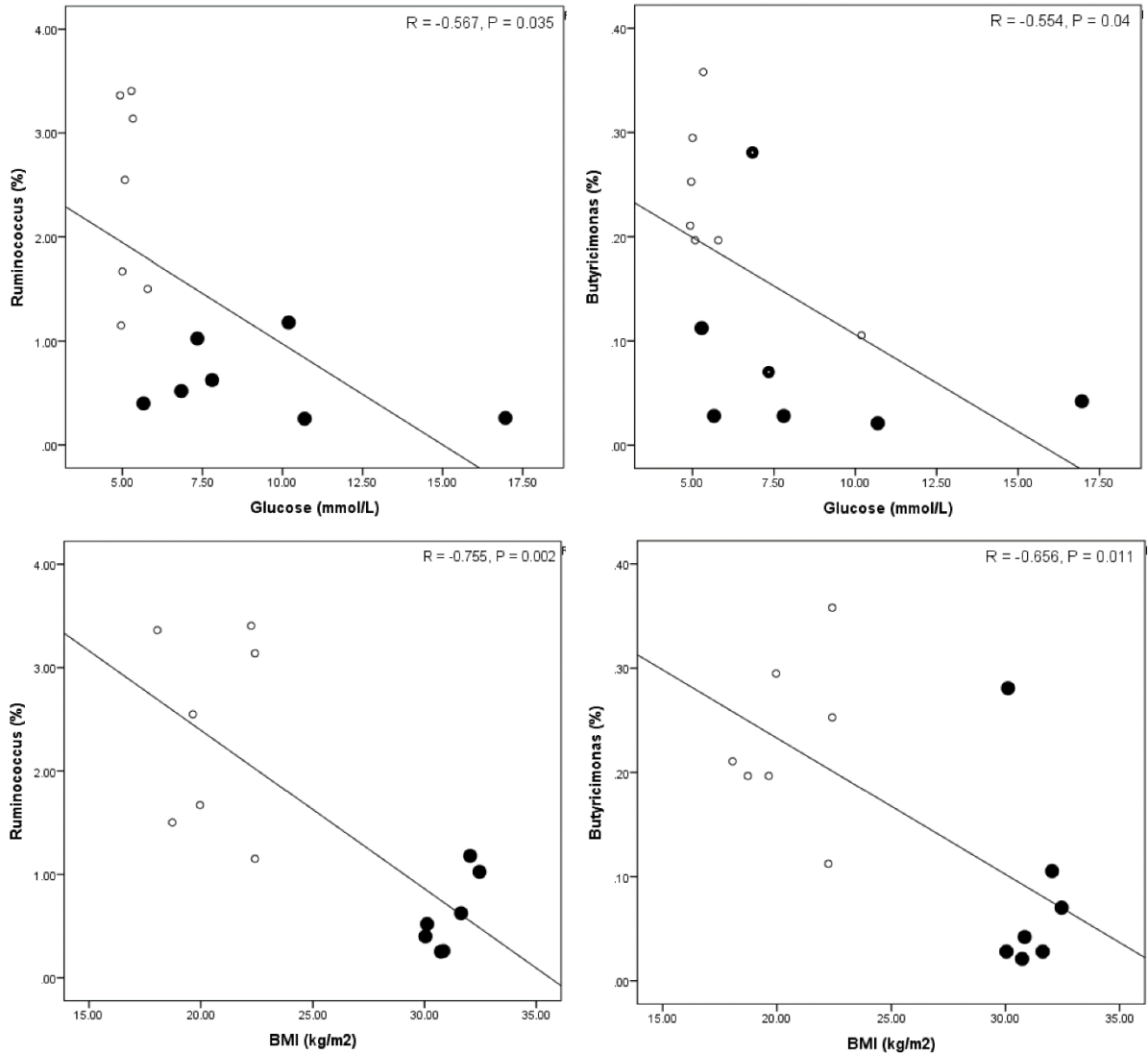


Hình 3.16. Mối tương quan giữa Actinobacteria, Firmicutes/ Bacteroidetes với chỉ số glucose; Firmicutes, Firmicutes/ Bacteroidetes với chỉ số BMI

Kháng insulin xảy ra khi các tế bào trong cơ, mỡ và gan không phản ứng tốt với tín hiệu của insulin để vận chuyển glucose từ máu vào tế bào, kết quả là làm lượng đường trong máu tăng cao. Hiện tượng này kéo dài sẽ dẫn đến bệnh lý tiểu đường type 2.

Nghiên cứu cho thấy, tình trạng kháng insulin và lượng mỡ tăng cao sẽ làm giảm sự đa dạng của vi khuẩn đường ruột [203]. Allin và cộng sự báo cáo, người có nồng độ glucose máu cao có hệ vi sinh vật đường ruột bất thường trong đó có sự giảm độ phong phú của chi *Clostridium* cũng như vi khuẩn phân giải chất nhầy *A. muciniphila*, đồng thời, tỷ lệ của *Bifidobacteria* và *Staphylococci* cao hơn bình thường [204]. Hiện tượng kháng insulin được thúc đẩy bởi vi khuẩn *Prevotella copri* và *Bacteroides vulgatus* [203]. Ở cấp độ chi, sự phong phú của *Clostridium* tương quan nghịch với nồng độ glucose [205]. Phù hợp với sự phong phú ngày càng tăng ở

những người mắc bệnh tiền tiểu đường, *Ruminococcus* có mối tương quan thuận với nồng độ glucose. Phát hiện này đã chứng minh rằng sự đa dạng loài ngày càng tăng có liên quan đến việc điều chỉnh glucose được cải thiện và giảm lượng mỡ và giảm viêm, trong khi đó mức độ phong phú vi khuẩn thấp có liên quan đến mỡ, kháng insulin, rối loạn lipid máu và viêm [205].

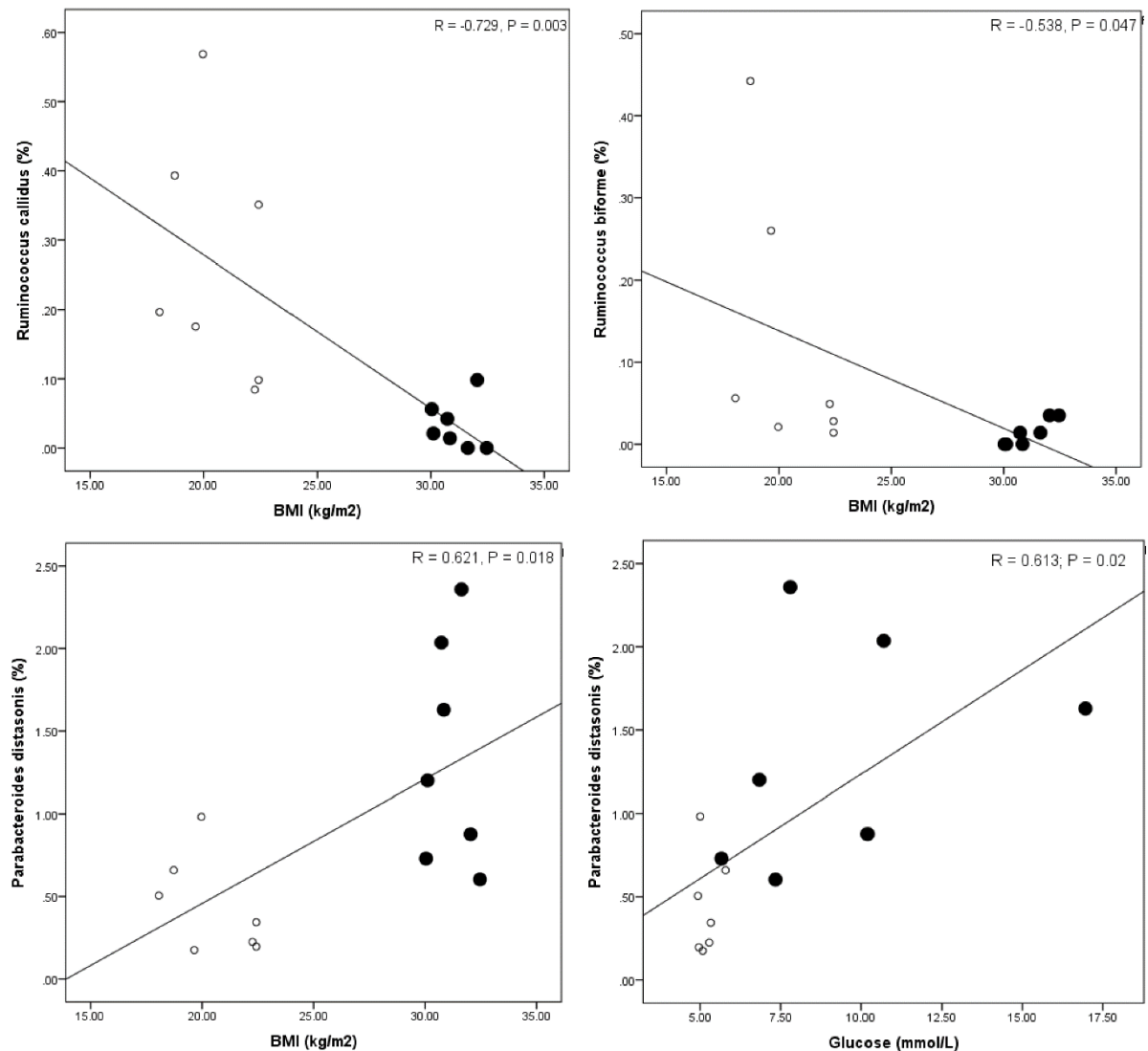


Hình 3.17. Mối tương quan giữa *Ruminococcus*, *Butyricimonas* với chỉ số glucose và chỉ số BMI

Phân tích mối tương quan của các chi đối với chỉ số BMI và glucose máu chúng tôi thấy: trong số 20 chi đã phân tích ở trên thì 11 chi (*Prevotella*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Odoribacter*, *Desulfovibrio*, *Butyricimonas*, *Clostridium*, *Burkholderia*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* và *Roseburia*) có tương quan nghịch với cả chỉ số BMI và glucose. Ngoài 11 chi trên thì chi *Sutterella* và *Others* cũng có tương quan nghịch với BMI; các chi *Escherichia*, *Bifidobacteria* và *Lachnospira* có tương quan nghịch với chỉ số glucose. Trong số các chi tương quan thuận

(*Bacteroides*, *Escherichia*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lachnospira* và *Dorea*) với chỉ số BMI thì tương quan của chi *Bacteroides* có ý nghĩa thống kê ($R = 0.577$, $P = 0.031$). Các chi (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Dorea* và *Others*) tương quan thuận với chỉ số glucose nhưng đều không có ý nghĩa thống kê.

Trong số 11 chi có mối tương quan nghịch với cả 02 chỉ số glucose và BMI thì 03 chi có tương quan nghịch với glucose (*Ruminococcus*, *Butyricimonas*, *Clostridium*) và có ý nghĩa thống kê ($R = -0.567$, $P = 0.035$; $R = -0.554$, $P = 0.04$; $R = -0.567$, $P = 0.034$ tương ứng) nhưng có tới 06 chi tương quan nghịch với chỉ số BMI (*Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Odoribacter*, *Desulfovibrio*, *Butyricimonas*, *Burkholderia*) và có ý nghĩa thống kê. Qua kết quả nghiên cứu thì 02 chi (*Ruminococcus*, *Butyricimonas*) có mối tương quan nghịch và có ý nghĩa thống kê với cả 02 chỉ số glucose máu và BMI (Hình 3.17)



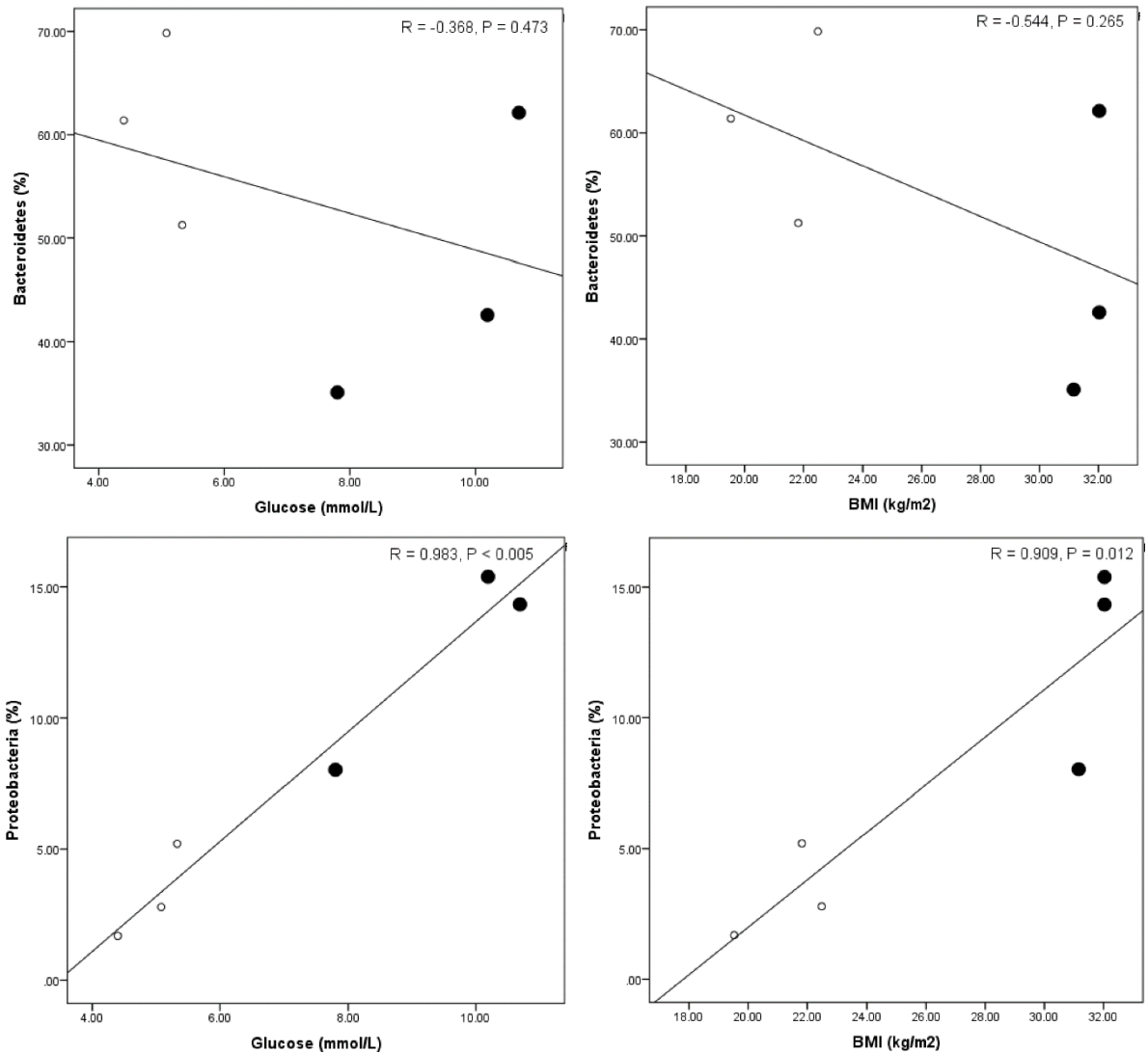
Hình 3.18. Mối tương quan giữa *R. callidus*, *R. biforme* và *P. distasonis* với chỉ số glucose, BMI ở nhóm nữ giới

Khi phân tích mối tương quan của 19 loài thì 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. zeae*, *A. muciniphia*, *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 ($R = -0.729$, $P = 0.003$; $R = -0.538$, $P = 0.047$ tương ứng). 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 (Hình 3.18).

Đối với các chi probiotics truyền thống chúng tôi thấy có 02 loài (*L. salivarius*, *L. brevis*) thuộc chi *Lactobacillus* được tìm thấy đều tương quan thuận với glucose và BMI. Ngược lại, 02 loài (*L. agilis*, *L. zeae*) có tương quan nghịch với cả 2 chỉ số glucose và BMI. Đối với chi *Bifidobacterium* chỉ phát hiện được loài *B. longum* và tương quan nghịch với chỉ số glucose nhưng lại tương quan thuận với chỉ số BMI.

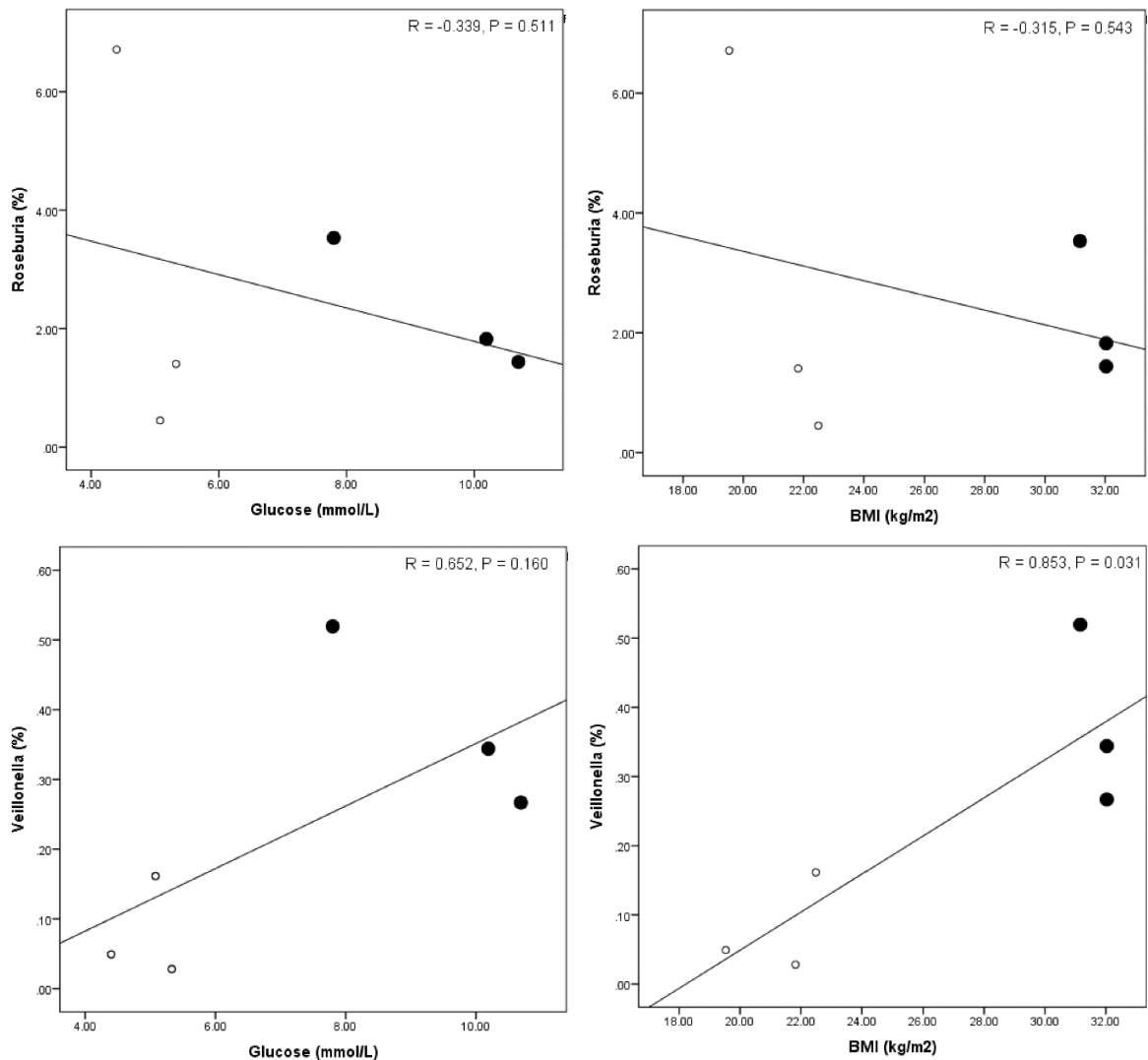
3.2.2. Mối tương quan giữa tính đa dạng của vi khuẩn đường ruột với chỉ số glucose và BMI ở nhóm nam giới

Phân tích vi khuẩn đường ruột của nam giới với chỉ số glucose và BMI cho thấy: trong số 13 ngành thì ngành TM7 chiếm 0% ở tất cả các mẫu của cả 2 nhóm nghiên cứu, 2/13 ngành có tương quan nghịch với glucose (Firmicutes, Bacteroidetes) và 3/13 ngành tương quan nghịch với chỉ số BMI (Bacteroidetes, Tenericutes, Euryarchaeota). Các ngành có tương quan nghịch với chỉ số glucose và BMI đều không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên tỷ lệ giữa Firmicutes/Bacteroidetes lại tương quan thuận với glucose và BMI nhưng 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 ($R = 0.983$, $P < 0.05$; $R = 0.909$, $P = 0.012$) (Hình 3.19).



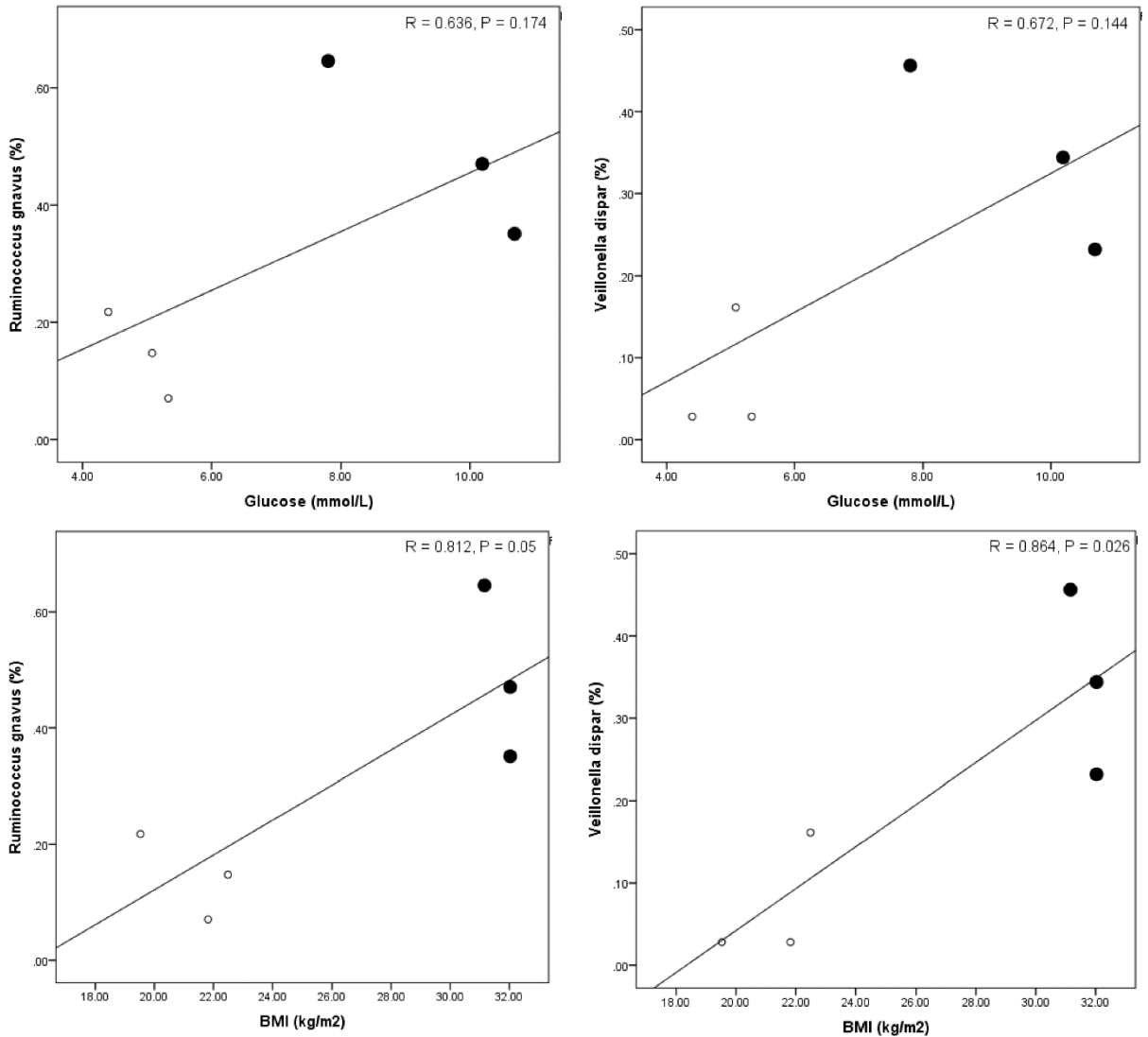
Hình 3.19. Mối tương quan giữa ngành Bacteroidetes, Proteobacteria với chỉ số glucose và BMI

Phân tích tương quan của các chi đối với chỉ số glucose máu và BMI chúng tôi thấy: trong số 21 chi thì 06 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 ($R = 0,853$, $P = 0,031$) (Hình 3.20) nhưng tương quan với chỉ số glucose lại không có ý nghĩa thống kê ($R = 0,652$, $P = 0,160$). 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. Chi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* đều có tương quan thuận với chỉ số glucose và BMI, trong khi chi *Faecalibacterium* và *Roseburia* có tương quan nghịch với cả chỉ số glucose máu và BMI. Các nghiên cứu gần đây cho thấy chi *Roseburia* có thể cải thiện hệ sinh thái đường ruột và giảm tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường.



Hình 3.20. Môi tương quan giữa *Roseburia*, *Veillonella* với chỉ số glucose và BMI

Khi phân tích môi tương quan của 20 loài thì 8/20 loài có môi tương quan nghịch với glucose, 6/20 loài có tương quan nghịch với BMI. Trong số các loài có tương quan nghịch này thì 6/20 loài (*P. copri*, *P. distasonis*, *Clostridium citroniae*, *F. prausnitzii*, *B. uniformis*, *L. agilis*) có tương quan nghịch với cả 02 chỉ số glucose và BMI. Tất cả các loài có tương quan nghịch với chỉ số glucose và BMI đều không có ý nghĩa thống kê. Loài *B. longum* và *Others* tương quan nghịch với chỉ số glucose nhưng lại tương quan thuận với chỉ số BMI. Hai loài thuộc chi *Lactobacillus* là *L. brevis* và *L. zae* không phát hiện được trong bất cứ mẫu nào. 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.



Hình 3.21. Mối tương quan giữa *R. gnavus*, *V. dispar* với chỉ số glucose và BMI

BMI là một thước đo tốt của bệnh béo phì. BMI tăng là một yếu tố nguy cơ của nhiều bệnh như tăng huyết áp, thiếu máu cơ tim, đột quỵ, tiểu đường, rối loạn hô hấp...

Béo phì là một tình trạng phức tạp chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như yếu tố di truyền, nội tiết và môi trường [206]. Hệ vi sinh vật đường ruột có thể ảnh hưởng đến việc tăng cân và thay đổi chuyển hóa năng lượng. Hệ vi sinh vật đường ruột tiết ra enzym để phân giải các polysaccharide mà cơ thể không tiêu hóa được, tạo ra các monosaccharide để cơ thể hấp thu được; nó kích hoạt lipoprotein lipase trên biểu mô ruột, từ đó glucose và axit béo nhanh chóng được hấp thu, góp phần làm tăng khối lượng chất béo và tăng cân. Nhiều nghiên cứu trên cả đối tượng người và động vật thí nghiệm cho thấy mối liên hệ đáng kể giữa sự gia tăng của một số nhóm vi khuẩn và bệnh béo phì. Một số nghiên cứu phát hiện ra rằng chi *Lactobacillus* là loại vi sinh vật chiếm ưu thế nhất trong phân của những người thừa cân và béo phì [207]. Ngoài ra,

tỷ lệ Firmicutes (Lactobacilli) tăng và Bacteroidetes giảm (Bacteroides) có liên quan đến béo phì. Loài vi khuẩn *L. reuteri* thường xuyên được tìm thấy ở những đối tượng béo phì trong khi *L. paracasei* và *L. plantarum* có liên quan đến tình trạng gầy [52]. Do nhiều vi sinh vật không nuôi cấy được nên việc phát hiện bằng các công cụ phân tử dựa trên sự tương đồng về trình tự 16S rDNA rất có ý nghĩa. Tuy nhiên, phương pháp này có thể phát hiện cả những vi sinh vật chết không biểu hiện tác dụng trao đổi chất nên vai trò của của chúng với một số bệnh cần có những nghiên cứu sâu hơn.

Ở Việt nam, các nghiên cứu của *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* đối với người tiểu đường vẫn chưa được biết đến, đặc biệt là nhóm người trưởng thành. Bên cạnh đó, chế độ ăn uống và di truyền ở cộng đồng người Việt Nam khác với các dân tộc khác nên có thể ảnh hưởng đến tình trạng của hệ vi sinh vật đường ruột. Dựa vào kết quả nghiên cứu của chúng tôi và các nghiên cứu khác sẽ là cơ sở để phát triển các sản phẩm hỗ trợ cho điều trị bệnh tiểu đường type 2 ở Việt Nam. Tuy nhiên để chắc chắn mối liên quan giữa *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* với người tiểu đường type 2 thì cần nghiên cứu sâu hơn đối với mỗi loài cụ thể của hai chi vi sinh vật này để xác định tính loạn khuẩn cũng như xác định liệu pháp vi sinh cụ thể cho người mắc bệnh tiểu đường type 2.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy: *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. salivarius* tăng ở người tiểu đường type 2. Trong khi loài *L. amylovorus* lại giảm ở bệnh nhân tiểu đường type 2. Điều này chứng tỏ tác động chức năng đa dạng đối với sự trao đổi chất của vật chủ bởi vi khuẩn từ chi này. Hơn nữa, một số loài từ chi này cũng đã được thử nghiệm như chế phẩm sinh học. Các nghiên cứu thực nghiệm trên chuột cho thấy hầu hết các tác dụng 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, nghiên cứu trên người cho thấy loài *L. sporogenes*, *L. casei* Shirota, *L. reuteri* được sử dụng như monoprobiotics để cải thiện bệnh 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 [208].

Để nghiên cứu vai trò của chi *Lactobacillus* chúng tôi đã tiến hành phân lập và định danh cũng như khả năng sống của chúng trong một số môi trường mà các vi sinh vật này có thể trải qua khi đưa vào đường ruột nhằm hỗ trợ điều trị một số bệnh hiện nay.

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*

Vi khuẩn lactic (LAB - Lactic Acid Bacteria) là nhóm vi khuẩn an toàn, Gram dương, tế bào có dạng hình que hay hình cầu, không sinh bào tử và không di động. Vi khuẩn lactic có khả năng sống sót trong điều kiện sinh trưởng ở dải nhiệt độ rộng từ 15 đến 45°C, pH từ 3-11, bao gồm các chi chính *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* và *Weissella*.

Những loài như *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei rhamnosus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis lactis*, *L. lactis cremoris*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, và *E. faecium* là những loài phổ biến nhất thường sử dụng như probiotic hữu ích cho người [209]. Ngoài khả năng sinh acid hữu cơ, một số chủng vi khuẩn lactic còn có khả năng sinh ra các chất ức chế vi sinh vật gây bệnh như diacetyl, hydroperoxyt, acetaldehyde và bacteriocin [210].



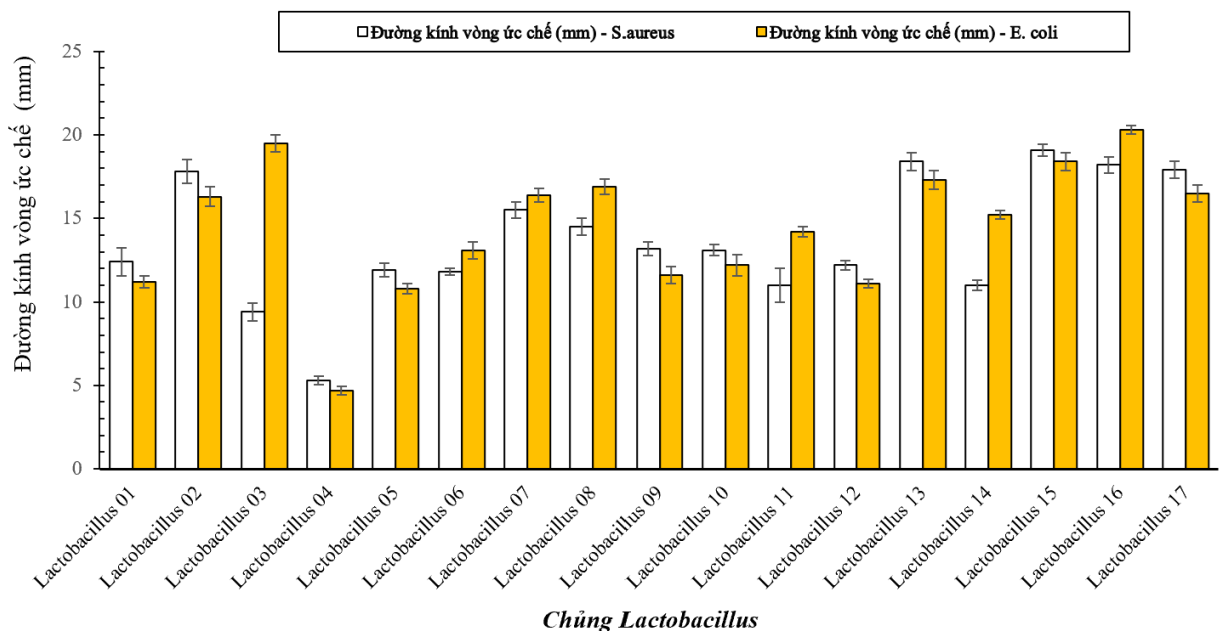
Hình 3.22. Khuẩn lạc vi khuẩn *Lactobacillus* phân lập từ mẫu phân người

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. Như vậy lượng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* ở nhóm người khỏe mạnh cao hơn nhóm bệnh tiểu đường type 2.

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 xẻ thùy đồng thời có vòng tan CaCO_3 xung quanh khuẩn lạc lớn và rõ ràng.

3.3.1.2. Đánh giá hiệu quả kháng khuẩn

E. coli và *S. aureus* là nguyên nhân phổ biến gây ra các bệnh nhiễm trùng mắt phải tại cộng đồng và bệnh viện, bệnh có thể dẫn đến tử vong nếu không được chữa trị đúng cách và kịp thời. Các nghiên cứu gần đây về phân tích thành phần loài trong hệ vi sinh vật đường ruột cho thấy lượng *E. coli* ở người mắc bệnh tiểu đường type 2 cao hơn so với những người khỏe mạnh. Do vậy, trong nghiên cứu này 2 chủng kiểm định *E. coli* ATCC 11105 và *S. aureus* ATCC13709 được sử dụng để đánh giá khả năng kháng khuẩn sơ bộ của các chủng *Lactobacillus* tuyển chọn. Trong 68 chủng *Lactobacillus* được phân lập, đã tuyển chọn được 17 chủng kháng cả 2 chủng kiểm định, đường kính vòng kháng khuẩn 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, đường kính vòng kháng từ 16,3 mm đến 20,3 mm, đó là các chủng *Lactobacillus* 02, 13, 15, 16, 17.



Hình 3.23. Khả năng kháng khuẩn của chủng *Lactobacillus* tuyển chọn

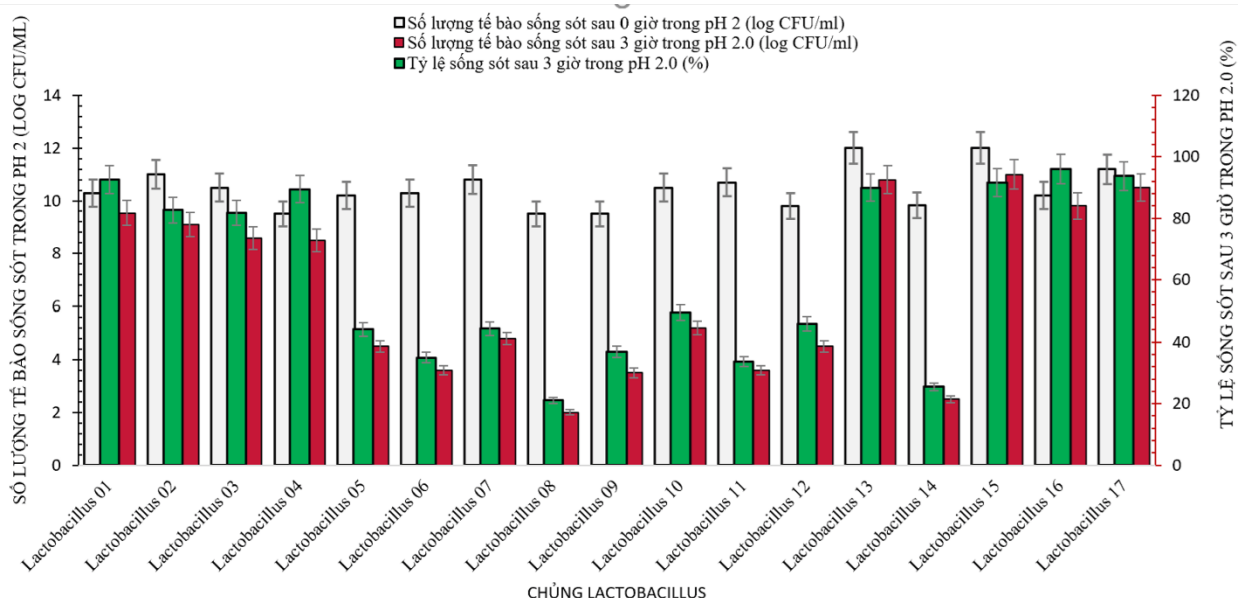
Trong một nghiên cứu khác về khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của 20 chủng *Lactobacillus* cho thấy 3 chủng gồm *Lactobacillus* 1089, 1115 và 1141 có khả năng kháng tốt nhất *S. aureus* với đường kính vòng kháng lên đến hơn 20 mm [211].

Nghiên cứu của Y.H. Shim và cộng sự đã đánh giá sự ức chế vi khuẩn *E. coli* của 6 chủng *Lactobacillus* bao gồm *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* SNUL, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* (Antibio300). Nhóm tác giả này chỉ ra vùng ức chế trung bình của từng chủng có sự khác nhau tuy nhiên sự chênh lệch không lớn, đường kính vòng kháng trong khoảng từ 10,5 mm đến 20,5 mm [212]. Điều đáng chú ý, cả 17 chủng được lựa chọn trong nghiên cứu của chúng tôi đều có khả năng kháng tốt với cả hai chủng kiểm định, đồng thời chúng luôn ổn định hoạt tính sau nhiều lần thử nghiệm.

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

- Khả năng chịu acid của *Lactobacillus*

Chủng *Lactobacillus* ức chế tác nhân gây bệnh chỉ có giá trị như một probiotic nếu chúng chịu được pH và muối mật trong đường tiêu hóa của người. Trước khi đến đường ruột, vi khuẩn probiotic phải tồn tại trong môi trường axit của dạ dày khoảng 3 giờ. Thông thường pH trong dạ dày khác nhau ở mỗi người và dao động 2,0 đến 4,0 [211]. Trong môi trường pH 2,0 tỷ lệ sống sót của 17 chủng dao động trong khoảng 21 đến 96%. Trong đó có 8 chủng bao gồm *Lactobacillus* 01, 02, 03, 04, 13, 15, 16, 17 có số tế bào sống sót dao động từ 82 đến 96%. Những chủng *Lactobacillus* 05, 06, 07, 08, 09, 11, 14 có khả năng sống sót thấp ở pH 2,0 dao động từ 21 đến 50%.



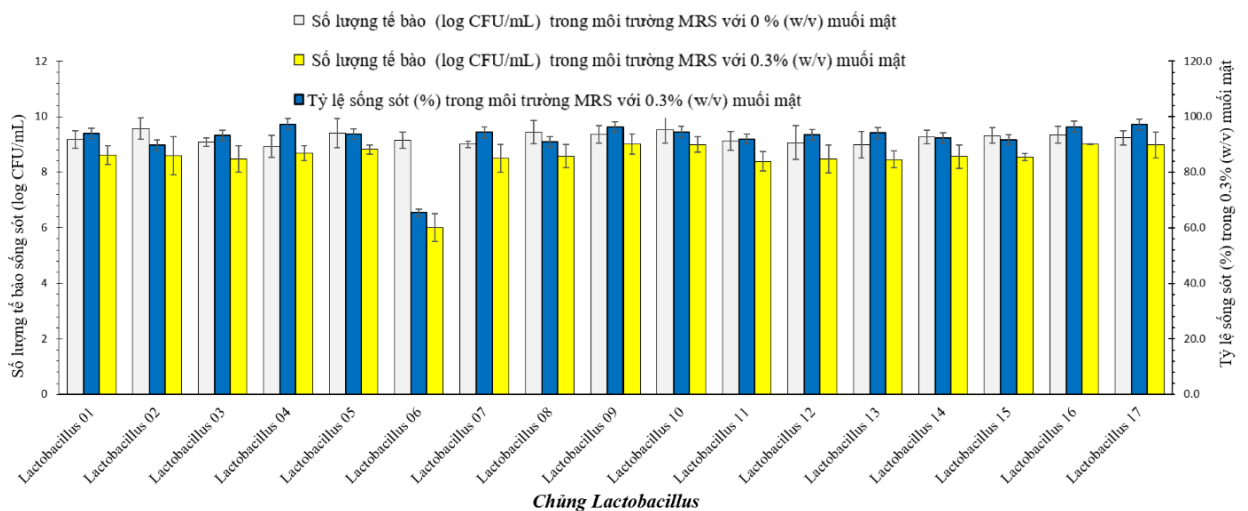
Hình 3.24. Khả năng chịu acid của các chủng *Lactobacillus* tuyển chọn ở pH 2

Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Jacobsen và cộng sự (1999) khi nhóm tác giả kiểm tra sự sống sót của *Lactobacillus* sau 3 giờ ở pH 2,5 [212]. Nghiên cứu của Hà Thị Thu (2020), sau 3h nuôi cấy ở pH 3,0, cả 3

chủng *Lactobacillus* thử nghiệm đều có tỷ lệ sống sót cao (95,27%, 94,15% và 98,54%) [213]. Nghiên cứu của Yan Bao và các cộng sự ở pH 3 của 90 chủng *Lactobacillus* phân lập từ nguồn sữa lên men truyền thống của vùng dân tộc thiểu số tại Mông Cổ và Trung Quốc [214]. Kết quả cho thấy 35/90 chủng sinh trưởng tốt ở điều kiện axit (pH 3,0). Mười một chủng được sàng lọc thêm từ 35 chủng có khả năng chịu đựng cao với dịch dạ dày mô phỏng (pH 2,5 trong 3 giờ). Trong đó chỉ có chủng F6 sống sót với tỷ lệ 53,7% trong dịch dạ dày mô phỏng (pH 2,0). Trong khi kết quả nghiên cứu của chúng tôi 17 chủng được thử nghiệm về khả năng sống sót cao ở pH 2 trong thời gian nuôi cấy là 3 giờ, khả năng sống sót giao động trong khoảng từ 21 đến 96% kết quả này có sự khác biệt với nghiên cứu của Yan Bao và cộng sự. Đây có thể là do nguồn gốc chủng nghiên cứu. Cụ thể, các chủng *Lactobacillus* này được phân lập trong đường ruột của người, do đó chúng cũng đã từng chịu áp lực pH thấp trong dạ dày vật chủ và trở nên thích nghi với môi trường acid dạ dày nên ưu thế hơn các loài *Lactobacillus* trong sản phẩm lên men.

- Khả năng chịu muối mật của *Lactobacillus*

Khả năng dung nạp mật được coi là một đặc tính quan trọng của *Lactobacillus* giúp nó tồn tại. Nồng độ mật trung bình trong ruột người là 0,3% nên đây là nồng độ dùng để chọn lọc những chủng probiotic kháng mật. Trong thí nghiệm này, sau 24 giờ ủ trong môi trường MRS có bổ sung 0,3% (w/v) muối mật, tất cả 17 chủng thử nghiệm cho thấy tỷ lệ sống sót cao và tương đối đồng đều giữa các chủng. Có 16/17 chủng có tỷ lệ sống sót dao động trong khoảng từ 90 đến 97,3% và duy nhất 1 chủng *Lactobacillus* 06 có số tế bào sống sót thấp hơn với 65,5% (Hình 3.25).



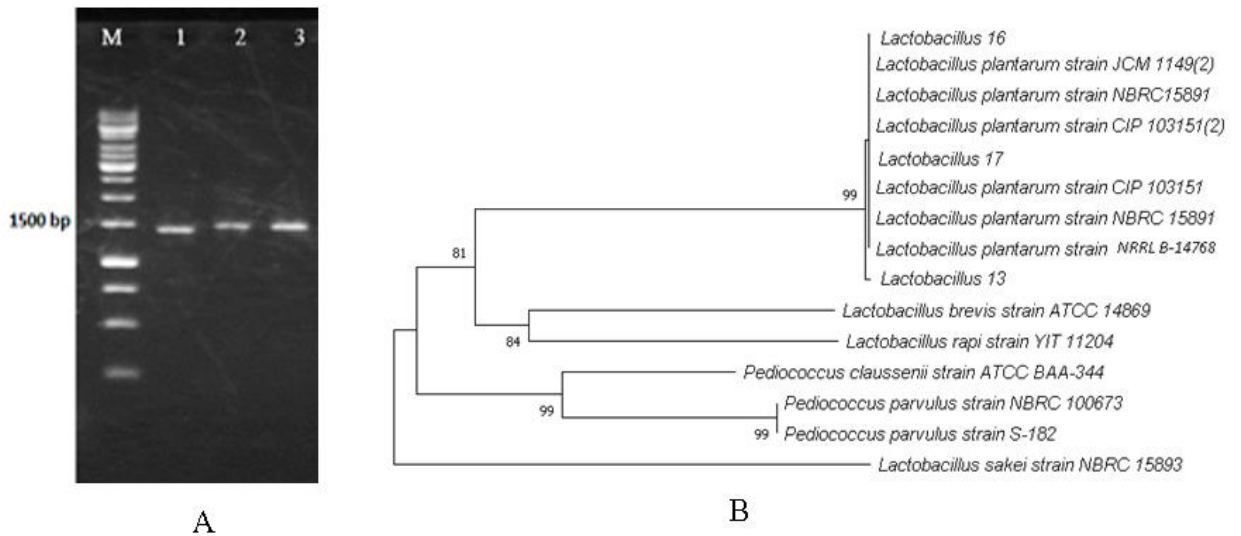
Hình 3.25. Khả năng chịu muối mật của các chủng *Lactobacillus* tuyển chọn ở nồng độ 0.3%

Chúng có số tế bào sống sót cao trên 95% là *Lactobacillus* 04, *Lactobacillus* 09, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 17. Chúng có số tế bào sống sót thấp nhất là *Lactobacillus* 08, *Lactobacillus* 06, *Lactobacillus* 02. Khả năng chịu đựng muối mật cao của chúng thể hiện lợi thế cho sự tồn tại của những chủng *Lactobacillus* này trong đường ruột. Một số minh chứng khẳng định cho giả thiết này đã được chứng minh bởi tác giả Song và cộng sự [215]. Cũng cùng mục đích, đối tượng nghiên cứu nhưng khác về nguồn gốc phân lập chủng, Song và cộng sự khi nghiên cứu 10 chủng *Lactobacillus* được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau cho thấy: 5/10 chủng (chiếm 50%) có khả năng chống chịu hoàn toàn với muối mật 0,3% bao gồm các chủng *Lactobacillus* sp. JNU 8829, *L. casei* MB3, *L. sakei* MA9, *L. sakei* CH8, và *L. acidophilus* [215]. Một nghiên cứu khác cũng cùng mục đích, khi nghiên cứu khả năng dung nạp mật của 28 chủng *Lactobacillus*, thuộc 3 loài *L. plantarum*, *L. casei* và *Lactobacillus delbruki* được phân lập từ pho mát Koozeh, cho thấy có 27/28 chủng phân lập không có khả năng dung nạp muối mật và duy nhất chủng *L. casei* sống sót được trong môi trường muối mật 0.3% [216]. Trong khi nghiên cứu của Hà Thị Thu thì hầu hết *Lactobacillus* trong đường ruột người đều có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường bổ sung 0,3% muối mật, tỷ lệ sống sót dao động từ 90-99% [213].

3.3.3. Định danh vi khuẩn *Lactobacillus*

Từ những kết quả nghiên cứu về *Lactobacillus* trong đường ruột của người bị bệnh tiểu đường. Trong số 17 chủng, chúng tôi đã xác định được 3 chủng *Lactobacillus* 17, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 13 hội tụ được cả 3 đặc tính probiotic quý. Do đó, chúng tôi lựa chọn 3 chủng này cho các nghiên cứu về định loại đến loài. Bằng cặp mồi 27F/1492R đã khuếch đại được đoạn gen 16S rRNA có kích thước khoảng 1500 bp (Hình 3.26A). Trình tự gen của 3 chủng được so sánh đối chiếu với dữ liệu nguồn gen và phân tích bằng BLAST trên GeneBank. Kết quả cả 3 chủng *Lactobacillus* 17, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 13 có độ tương đồng lần lượt là 99,93%, 99,93% và 100%, với loài *L. plantarum* trên GenBank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA7 so sánh và phân tích về trình tự nucleotide chủng *Lactobacillus* 17, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 13 với các loài tương đồng về thành phần loài trên GenBank (Hình 3.26B). Kết quả đã chỉ ra cả 3

chủng *Lactobacillus* 13, *Lactobacillus* 16, *Lactobacillus* 17 đều thuộc về loài *L. plantarum* và kí hiệu *L. plantarum* 13, *L. plantarum* 16 và *L. plantarum* 17.



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

Nghiên cứu cụ thể về khả năng kháng khuẩn và sống sót trong môi trường pH 2, muối mật 0,3% của 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.

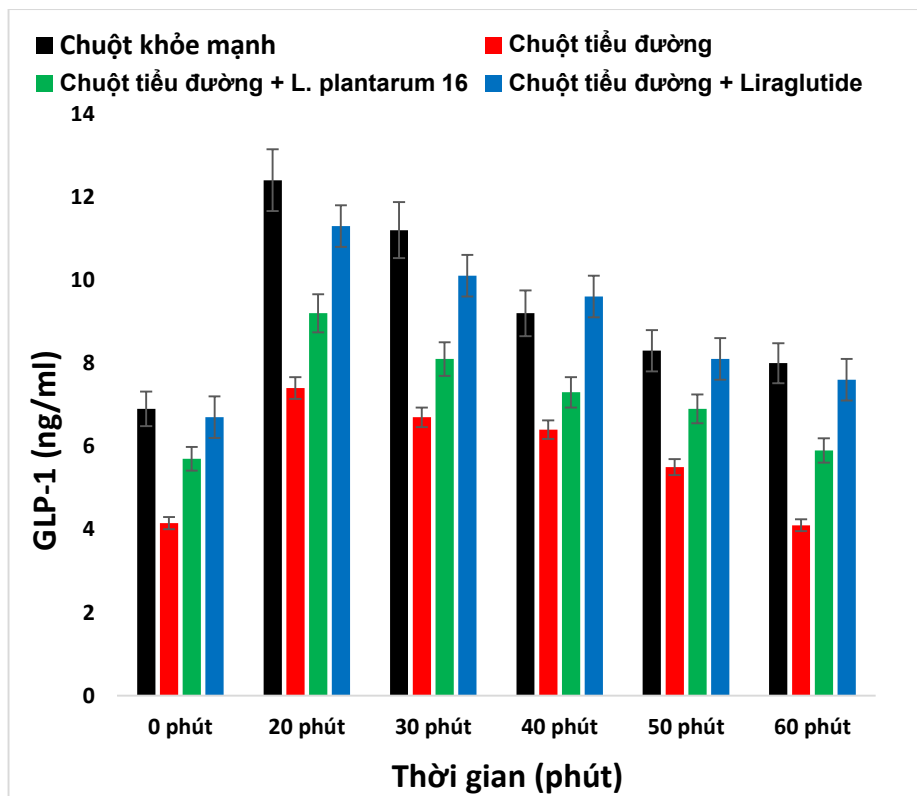
L. plantarum là vi khuẩn lactic rất hữu ích, được tìm thấy trong thực phẩm lên men, trong đường ruột của người và động vật. Hiện nay, *L. plantarum* được sử dụng phổ biến như probiotic hỗ trợ trong việc điều trị chứng rối loạn tiêu hóa ở người và động vật. Đáng chú ý, chủng *L. plantarum* 17, *L. plantarum* 16, *L. plantarum* 13 được phân lập từ bệnh nhân tiểu đường type 2 ở Việt Nam. Chủng này có khả năng kháng khuẩn tốt với hai chủng kiểm định thử nghiệm đồng thời sống sót cao trên 90% trong điều kiện acid thấp pH 2 và muối mật 0,3% sau 3 giờ nuôi cấy. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy *L. plantarum* cải thiện chuyển hóa và làm giảm glucose trong máu [208]. Kết quả này góp phần hữu ích nhằm định hướng ứng dụng chủng trong việc tạo thực phẩm bổ sung giúp tăng cường miễn dịch trong phòng và hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường.

Nghiên cứu của Lee và cộng sự cho thấy, khi sử dụng *L. plantarum* HAC01 trong điều trị bệnh tiểu đường đã làm giảm đáng kể lượng đường và HbA1c trong máu, đồng thời cải thiện khả năng dung nạp glucose và tình trạng kháng insulin [217].

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 kể ($p < 0,01$). 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 3.27).



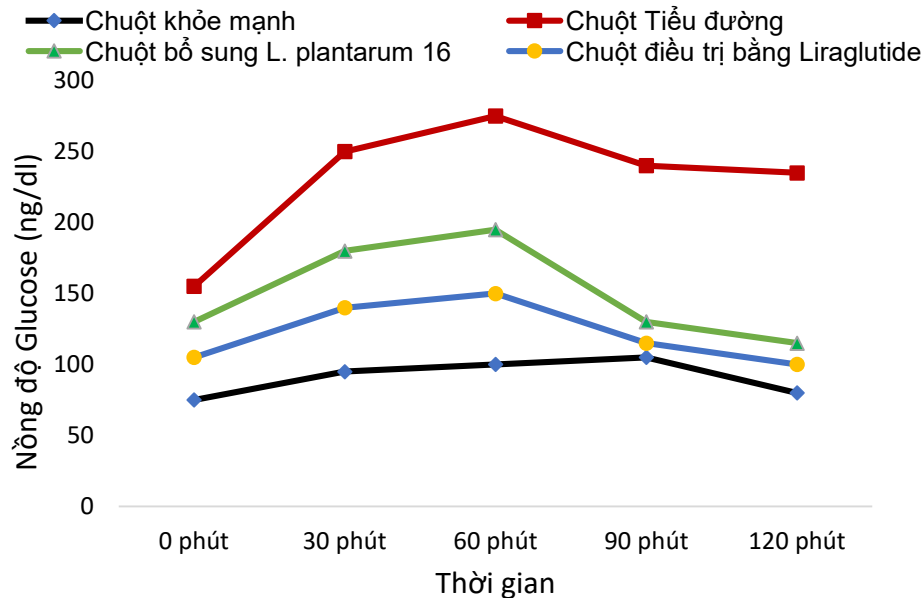
Hình 3.27. Nồng độ GLP-1 trong huyết thanh chuột khi kết thúc thử nghiệm

Việc điều tiết các hormone, sinh lý ruột của vi khuẩn đường ruột và các chất chuyển hóa của chúng mang lại một phương pháp mới để hỗ trợ sức khỏe đường ruột cũng như của cơ thể. Chúng tôi đã hướng mục tiêu đến hormone incretin, GLP-1, do tác động của hormone này đối với việc giảm đường huyết và tăng cảm giác no, được mô tả chi tiết trong những nghiên cứu gần đây. Thật vậy, điều trị bệnh tiểu đường type 2 bằng các chất chủ vận thụ thể GLP-1, bao gồm exenatide và liraglutide được FDA chấp thuận, đã chứng minh giảm đáng kể tình trạng tăng đường huyết, HbA1c [218]. Các nghiên cứu trước đây đã xác định hệ vi sinh vật đường ruột rất quan trọng trong việc điều hòa bài tiết GLP-1, mặc dù cơ chế hoạt động và các vi khuẩn chịu trách

nhệm cho hoạt động này vẫn chưa được xác định rõ ràng [219]. Trong nghiên cứu này, lần đầu chúng tôi hướng đến việc xác định các chủng vi sinh vật có khả năng thúc đẩy bài tiết GLP-1.

3.3.4.2. Hiệu quả dung nạp sucrose

Sau 4 tuần, thử nghiệm dung nạp đường sucrose được thực hiện và chúng tôi nhận 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). Chuột được điều trị bằng *L. plantarum* 16 hay Liraglutide cho thấy mức độ glucose đã giảm đáng kể sau khi thử nghiệm dung nạp đường sucrose (2 g/kg thể trọng).



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

Nhiều nghiên cứu cho thấy 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 [220]. 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 đã được Manaer và cộng sự nghiên cứu [221]. Nghiên cứu trước đây cho thấy điều trị với *L. plantarum* đơn lẻ hoặc kết hợp (liều duy nhất hàng ngày 1.0×10^7 CFU/mL) giúp giảm căng thẳng và chống lại tình trạng tăng đường huyết [222].

Bổ sung *Lactobacillus* được chứng minh là có khả năng chống bệnh tiểu đường ở loài gặm nhấm. Nghiên cứu trên người dung nạp glucose kém cho thấy *L. reuteri* giúp cải thiện sự bài tiết incretin và insulin [223]. Theo Panwar và cộng sự, các chủng *Lactobacillus* khác nhau như *L. rhamnosus* GG, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* và *L. reuteri* đều làm giảm mức glucose máu hoặc cải thiện tình trạng kháng insulin ở chuột tiểu đường [224]. Thí nghiệm bổ sung *L. plantarum* 16 bốn tuần của chúng tôi cũng cho thấy lợi khuẩn này làm giảm đáng kể mức glucose máu ở chuột bị tiểu đường. Kết quả này cho thấy, chính *Lactobacillus* có thể được coi là một ứng cử viên hỗ trợ điều trị cho bệnh tiểu đường type 2.

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, chúng tôi nhận thấy rằng 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. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng điều trị bằng probiotic làm tăng cường tiết hormon incretin 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 [225]. 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 [226]. 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

[227]. 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 [228]. 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 [226]. 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 bifforme*) 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 Hương, 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 H₂O₂ 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. R. Lakhtakia, *The history of diabetes mellitus*, Sultan Qaboos Univ. Med. J., 2013, vol. 13, no. 3, pp. 368–370.
2. Trần Hữu Dàng, *Giáo trình sau Đại học chuyên ngành Nội tiết Chuyển hóa*. NXB Đại học Huế., 2008, tr. 221 – 246, 304.
3. N. Holman, B. Young, R. Gadsby, *Current prevalence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in the UK*. Diabet Med., 2015, 32: 1119-20.
4. Y. Saisho, *B-cell dysfunction: its critical role in prevention and management of type 2 diabetes*. World Journal of Diabetes., 2015, 6(1), 109-124.
5. V.A. Fonseca, *Defining and Characterizing the Progression of type 2 Diabetes*, American Diabetes Association., 2009, S151-S155.
6. C.R. Keith, *Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes*. Journal of the American Pharmacists Association., 2009, 9, 1-13.
7. D.B. Savage, R.K. Semple, V.K.K Chatterjee, et al., *A Clinical Approach to Severe Insulin Resistance*. Endocr Dev., 2007, Vol 11, pp.122-132.
8. A.C. Powers, *“Diabetes Mellitus”*, *The Principles of Harrison’s Internal Medicine*. McGraw Hill Medical., 2008, 17th, pp. 2280-2282.
9. Y. Seino, D. Yabe, *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagonlike peptide-1: Incretin actions beyond the pancreas*. J Diabetes Investig., 2013, 4(2):108-130.
10. Nguyễn Hải Thủy, *Bệnh tim mạch trong đái tháo đường*. NXB Đại học Huế., 2009, tr. 25.
11. J. Marsha, J. Daniel, *Lipid Management in Patients with Type 2 Diabetes*. Am Health Drug Benefits., 2011, 4(5): 312–322.
12. G. Forlani G,P.D. Bonito, E. Mannucci, et al., *Prevalence of elevated liver enzymes in Type 2 diabetes mellitus and its association with the metabolic syndrome*. J Endocrinol Invest., 2008, 31(2):146-52.
13. H.E. Bays, R.H. Chapman, S. Grandy, *The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from two national surveys*. Int J Clin Pract., 2007, 61(5): 737–747.
14. J.D. Sorkin, D.C. Muller, J.L. Fleg, R. Andres, *The relation of fasting and 2-h postchallenge plasma glucose concentrations to mortality: data from the*

- Baltimore Longitudinal Study of Aging with a critical review of the literature.* Diabetes Care., 2005, 28: 2626-2632.
15. A. Ralph, D. Fronzo, E. Ferrannini, et al., *International Textbook of Diabetes Mellitus*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Ltd., 2015, 641-56.
 16. L. Brunton, R. Hilal-Dandan and B. C. Knollmann, *Endocrine Pancreas and Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus and Hypoglycemia*, Goodman and Gilman's Manual of pharmacology and therapeutic, 13th edition, Mc Graw Hill Education., 2018, 863-886.
 17. G. H. Tomkin, *Treatment of type 2 diabetes, lifestyle, GLP1 agonists and DPP4 inhibitors*, World J Diabetes., 2014, 5(5), 636-650.
 18. D. Röhrborn, N. Wronkowitz and J. Eckel, *DPP4 in diabetes*, Frontier in Immunology., 2015, 6, 1-20.
 19. T. Karagiannis, P. Paschos, K. Paletas, et al., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus in the clinical setting: systematic review and meta-analysis*, BMJ., 2012, vol. 344, 1369-72.
 20. R. Godinho, C. Mega, et al., *The Place of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapeutics: A ‘Me Too’ or ‘the Special One’ Antidiabetic Class?* Journal of Diabetes Research., 2015, vol. 2015.
 21. M. B. Narkhede, *Inhibition of α - amylase and α -glucosidase activities of polyherbal extract*, IJPRD., 2011, 3(8), pp.97-103.
 22. Hà Huy Khôi, *Dinh dưỡng hợp lý và sức khỏe*, NXB Y học., 2009, tr. 55 – 56.
 23. Thái Hồng Quang, *Dự phòng hoặc làm chậm xuất hiện bệnh đái tháo đường type 2*, Kỷ yếu Hội nghị Nội tiết Đái tháo đường Miền Trung lần thứ IV, Tạp chí Y học thực hành (616 – 617)., 2008, tr. 69
 24. J. Qin, R. Li, J. Raes, et al., *A human gut microbial gen catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature., 2010, vol. 464, no 7285, pp. 59–65.
 25. W.T. Xu, Y.Z. Nie, Z. Yang, N.H. Lu, *The crosstalk between gut microbiota and obesity and related metabolic disorders*. Future Microbiol., 2016, vol. 11, no 6, pp. 825–36.
 26. M.I. Naseer, F. Bibi, M.H. Alqahtani, et al., *Role of gut microbiota in obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease*. CNS Neurol. Disord. Drug Targets., 2014, vol. 13, no. 2, pp. 305-311.

27. S. Schwartz, I. Friedberg, I.V. Ivanov, et al., *A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response*. *Genome Biol.*, 2012, 13: R32.
28. M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. *Nature.*, 2011, vol. 473, no. 7346, pp. 174–180.
29. G.D. Wu, J. Chen, C. Hoffmann, et al., *Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes*. *Sci.*, 2011, vol. 334, no. 6052, pp.105-108.
30. A. Woting, N. Pfeiffer, L. Hanske, et al., *Alleviation of high fat diet-induced obesity by oligofructose in gnotobiotic mice is independent of presence of *Bifidobacterium longum**. *Mol Nutr Food Res.*, 2015, vol. 59, no. 11, pp. 2267-2278.
31. W. Fan, G. Huo, X. Li, et al., *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in infants during the six months of life*. *J Microbiol Biotechnol.*, 2014, vol. 24, no. 2, pp. 133–143.
32. J.K. Nicholson, E. Holmes, J. Kinross, et al., *Host-gut microbiota metabolic interactions*. *Science.*, 2012, vol. 336, pp.1262–1267.
33. G. den Besten, K. van Eunen, A.K. Groen, et al., *The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism*. *J Lipid Res.*, 2013, vol. 54, no. 9, pp. 2325-2340.
34. P.D. Cani, N.M. Delzenne, J. Amar, R. Burcelin, *Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding*. *Pathol Biol (Paris).*, 2008, vol. 56, no. 5, pp. 305–309.
35. A. Paun, C. Yau, J.S. Danska, *The influence of the microbiome on type 1 diabetes*. *J Immunol.*, 2017, vol. 198, no. 2, pp. 590–595.
36. A.L. Kau, P.P. Ahern, N.W. Griffin, et al., *Human nutrition, the gut microbiome and the immune system*. *Nature.*, 2011, vol. 474, no. 7351, pp. 327–336.
37. L. Wen, A. Duffy, *Factors influencing the gut microbiota, inflammation, and type 2 diabetes*, *J Nutr.*, 2017, vol. 147, no 7, pp. 1468S-1475S.
38. R. Caesar, C.S. Reigstad, H.K. Backhed, et al., *Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice*. *Gut.*, 2012, vol. 61, no. 12, pp. 1701–1707.
39. C. Gérard and H.Vidal, *Impact of Gut Microbiota on Host Glycemic Control*.

- Front Endocrinol., 2019, vol. 10, no. JAN.
40. P.J. Turnbaugh, M. Hamady, T. Yatsunencko, et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature., 2009, vol. 457, no. 740, pp. 222–227.
 41. E.B. Hollister, C. Gao, and J. Versalovic, *Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health*, Gastroenterology., 2014, vol. 146, no. 6, pp. 1449–1458.
 42. J.L. Round and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*, Nat. Rev. Immunol., 2009, vol. 9, pp. 313–323.
 43. P.D. Cani, A. Everard, and T. Duparc, *Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism*, Curr. Opin. Pharmacol., 2013, vol. 13, no. 6, pp. 935–940.
 44. C.A. Thaiss, N. Zmora, M. Levy, and E. Elinav, *The microbiome and innate immunity*, Nature., 2016, vol. 535, no. 7610, pp. 65–74.
 45. T. Magrone and E. Jirillo, *The Interplay between the Gut Immune System and Microbiota in Health and Disease: Nutraceutical Intervention for Restoring Intestinal Homeostasis*, Curr. Pharm. Des., 2013, vol. 19, no. 7, pp. 1329–1342.
 46. R.E. Ley, F. Bäckhed, P. Turnbaugh, et al., *Obesity alters gut microbial ecology*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005, vol. 102, no. 31, pp. 11070–11075.
 47. A. Parashar and M. Udayabanu, *Gut microbiota regulates key modulators of social behavior*, Eur. Neuropsychopharmacol., 2016, vol. 26, no. 1, pp. 78–91.
 48. P.J. Turnbaugh, R.E. Ley, M.A. Mahowald, et al., *An obesity associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature., 2006, vol. 444, no. 7122, pp. 1027–1031.
 49. A. Schwartz, D. Taras, K. Schafer, et al., *Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects*. Obesity., 2010, vol. 18, no. 1, pp. 190–195.
 50. G.S. Baillie, et al., *Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine*, Science (80-.), 2001, vol. 291, pp. 881–884.
 51. J. Graessler, Y. Qin, H. Zhong, et al., *Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: Correlation with inflammatory and metabolic parameters*.

- Pharmacogenomics J., 2013, vol. 13, no. 6, pp. 514-522.
52. M. Million, M. Maraninchi, M. Henry, et al., *Obesity-associated gut microbiota is enriched in Lactobacillus reuteri and depleted in Bifidobacterium animalis and Methanobrevibacter smithii*. Int J Obes., 2012, vol. 36, no. 6, pp. 817-825.
 53. S. Li, C. Zhang, Y. Gu, et al., *Lean rats gained more body weight than obese ones from a high-fibre diet*. Br J Nutr., 2015, vol. 114, no. 8, pp. 1188-1194.
 54. I. Nadal, A. Santacruz, A. Marcos, et al., *Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents*. Int J Obes., 2009, vol. 33, no. 7, pp. 758-767.
 55. H.K. Pedersen, V. Gudmundsdottir, H.B. Nielsen, et al., *Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity*. Nature., 2016, vol. 535, no. 7612, pp. 376-381.
 56. X. Zhang, D. Shen, Z. Fang, et al., *Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance*. PLoS One., 2013, vol. 8, no. 8.
 57. M. Yassour, M.Y. Lim, H.S. Yun, et al., *Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes*. Genome Med., 2016, vol. 8, pp. 17.
 58. P. Kovatcheva-Datchary, et al., *Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella*, Cell Metab., 2015, vol. 22, no. 6, pp. 971–982.
 59. F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, C. Zitoun, et al., *Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis*, Cell Metab., 2016, vol. 24, no. 1, pp. 151–157.
 60. F. Bäckhed, H. Ding, T. Wang, et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. PNAS., 2004, vol. 101, no. 44, pp. 15718-15723.
 61. J. Wang, et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*, Nature., 2012, vol. 490, no. 7418, pp. 55–60.
 62. N. Larsen, F.K. Vogensen, F.W. van den Berg, et al., *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults*. PLoS One., 2010, vol. 5, no. 2.
 63. M. Serino, E. Luche, S. Gres, et al., *Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota*. Gut., 2012, vol. 61, no. 4, pp.

- 543-553.
64. N.R. Shin, J.C. Lee, H.Y. Lee, et al., *An increase in the Akkermansia spp. Population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice.* Gut., 2014, vol. 63, no. 5, pp. 727-735.
 65. K. Forslund, F. Hildebrand, T. Nielsen, et al., *Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota.* Nature., 2015, vol. 528, no. 7581, pp. 262-266.
 66. C.C. Roy, C.L. Kien, L. Bouthillier, E. Levy, *Short-chain fatty acids: ready for prime time.* Nutr Clin Pract., 2006, vol. 21, no. 4, pp. 351-366.
 67. H. Ohira, W. Tsutsui, Y. Fujioka, *Are short chain fatty acids in gut microbiota defensive players for inflammation and atherosclerosis.* J Atheroscler Thromb., 2017, vol. 24, no. 7, pp. 660-672.
 68. A. Koh, F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, F. Bäckhed, *From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites.* Cell., 2016, vol. 165, no. 6, pp. 1332-1345.
 69. N.T. Baxter, N.A. Lesniak, H. Sinani, et al., *The glucoamylase inhibitor acarbose has a diet-dependent and reversible effect on the murine gut microbiome.* mSphere., 2019, vol. 4, no. 1.
 70. M.J. Mandøe, K.B. Hansen, B. Hartmann, et al., *The 2-monoacylglycerol moiety of dietary fat appears to be responsible for the fat-induced release of GLP-1 in humans.* Am J Clin Nutr., 2015, vol. 102, no. 3, pp. 548-555.
 71. A. Amato, L. Cinci, A. Rotondo, et al., *Peripheral motor action of glucagonlike peptide-1 through enteric neuronal receptors.* Neurogastroenterol Motil., 2010, vol. 22, no. 6.
 72. F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, D. Goncalves, et al., *Microbiotagenerated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits.* Cell., 2014, vol. 156, no. 1-2, pp. 84-96.
 73. R.J. Perry, L. Peng, N.A. Barry, et al., *Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome.* Nature., 2016, vol. 534, no. 7606, pp. 213-217.
 74. J. He, P. Zhang, L. Shen, et al., *Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism.* Int J

- Mol Sci., 2020, vol. 21, no. 17, pp. 1-16.
75. G. Frost, M.L. Sleeth, M. Sahuri-Arisoylu, et al., *The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism*. Nat Commun., 2014, vol. 5.
 76. S. Sanna, N.R. van Zuydam, A. Mahajan, et al., *Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases*. Nat Genet., 2019, vol. 51, no. 4, pp. 600-605.
 77. G. den Besten, K. Lange K, R. Havinga, et al., *Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 2013, vol. 305, no. 12.
 78. A. Pingitore, E.S. Chambers, T. Hill, et al., *The diet-derived short chain fatty acid propionate improves beta-cell function in humans and stimulates insulin secretion from human islets in vitro*. Diabetes Obes Metab., 2017, vol. 19, no. 2, pp. 257-265.
 79. L. Zhao, F. Zhang, X. Ding, et al., *Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes*. Science., 2018, vol. 359, no. 6380, pp. 1151-6.
 80. M. Vitale, R. Giacco, M. Laiola, et al., *Acute and chronic improvement in postprandial glucose metabolism by a diet resembling the traditional Mediterranean dietary pattern: can SCFAs play a role*. Clin Nutr., 2021, vol. 40, no. 2, pp. 428-437.
 81. G.M. Mathew, Y.M. Ju, C.Y. Lai, D.C. Mathew, C.C. Huang, *Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes formosanus*: the implication of *Bacillus* as mutualists*. FEMS Microbiology Ecology., 2012, vol. 79, no. 2, pp. 504-517.
 82. D. Lelie, S. Taghavi, S.M. McCorkle, et al., *The Metagenome of an Anaerobic Microbial Community Decomposing Poplar Wood Chips*. PLOS ONE., 2012, vol. 7, no. 5.
 83. D.T. Huyen, N.T. Thao, N.T. Ngoc, L.Q. Giang, N. Cuong, K. Kimura, T.N. Hai, *Mining biomass-degrading genes through Illumina-based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite *Coptotermes gestroi* harvested in Vietnam*. Journal of Bioscience and Bioengineering., 2014, vol. 118, no. 6, pp. 665–671.

84. Phạm Công Hoạt, Phùng Thu Nguyệt và Trần Ngọc Hùng, *Metagenomics và việc khai thác tiềm năng đa dạng sinh học nguồn gen vi sinh vật của Việt Nam*. Tạp chí Khoa Học Công Nghệ Việt Nam., 2014, vol. 21, pp. 6–9.
85. M. Zeyaulah, M.R. KamLi, B. Islam, et al., *Metageneomics - An advanced approach for non-cultivable microorganisms*. Biotechnol. Mol. Biol. Rev., 2009, vol. 4, no. 3, pp. 49 – 54.
86. T. Hu, N. Chitnis, D. Monos, A. Dinh, *Next-generation sequencing technologies: An overview*. Hum. Immunol., 2021, vol. 82, no. 11, pp. 801-811.
87. S.A. Boers, R. Jansen, J.P. Hays, *Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2019, vol. 38, no. 6, pp. 1059-1070.
88. G.C. Baker, J.J. Smith, D.A. Cowan, *Review and re-analysis of domain-specific 16S primers*. J. Microbiol. Methods., 2003, vol. 55, no. 3, pp. 541–555.
89. S.K. Shahi, S.N. Freedman, A.K. Mangalam, *Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play*. Gut Microbes., 2017, vol. 8, no. 6, pp. 607-615.
90. H.S. Yong, S.L. Song, K.O. Chua, P.E. Lim, *High diversity of bacterial communities in developmental stages of Bactrocera carambolae (Insecta: Tephritidae) revealed by illumina miseq sequencing of 16S rRNA gene*. Curr. Microbiol., 2017, vol. 74, no 9, pp. 1076-1082.
91. E. Plummer and J. Twin, *A Comparison of Three Bioinformatics Pipelines for the Analysis of Preterm Gut Microbiota using 16S rRNA Gene Sequencing Data*, J. Proteomics Bioinform., 2015, vol. 8, no. 12.
92. H. Nilakanta, K. L. Drews, S. Firrell, M. A. Foulkes, and K. A. Jablonski, *A review of software for analyzing molecular Sequences*, BMC Res. Notes., 2014, vol. 7, no. 1.
93. C. Simon, R. Daniel, *Metagenomic analyses: past and future trends*. Appl. Environ. Microbiol., 2011, vol. 77, no. 4, pp. 1153-1161.
94. H.E.L. Lischer, K.K. Shimizu, *Reference-guided de novo assembly approach improves genome reconstruction for related species*. BMC Bioinformatics., 2017, vol. 18, no. 1.
95. J.S. Ghurye, V. Cepeda-Espinoza, M. Pop, *Metagenomic Assembly: Overview*,

- Challenges and Applications*. Yale J. Biol. Med., 2016, vol. 89, no. 3, pp. 353-362.
96. R. Luo, B. Liu, Y. Xie, et al., *SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler*. Gigascience., 2012, vol. 1, no. 1, pp. 1-6.
 97. S.D. Jackman, B.P. Vandervalk, H. Mohamadi, et al., *ABySS 2.0: resourceefficient assembly of large genomes using a Bloom filter*. Genome Res., 2017, vol. 27, no. 5, pp. 768-777.
 98. Y. Peng, H.C. Leung, S.M. Yiu, F.Y. Chin, *IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth*. Bioinformatics., 2012, vol. 28, no. 11, pp. 1420-1428.
 99. S. Gnerre, I. Maccallum, D. Przybylski, et al., *High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2011, vol. 108, no. 4, pp. 1513-1518.
 100. R.K. Aziz, D. Bartels, A.A. Best, et al., *The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology*. BMC Genomics., 2008, vol. 9.
 101. V.M. Markowitz, I.M. Chen, K. Palaniappan, et al., *IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system*. Nucleic Acids Res., 2012, vol. 40, no. D1.
 102. M. Rho, H. Tang, Y. Ye, *FragGeneScan: predicting genes in short and errorprone reads*. Nucleic Acids Res., 2010, vol. 38, no. 20, pp. e191.
 103. H. Noguchi, T. Taniguchi, T. Itoh, *MetaGeneAnnotator: detecting species-specific patterns of ribosomal binding site for precise gene prediction in anonymous prokaryotic and phage genomes*. DNA Res., 2008, vol. 15, no. 6, pp. 387-396.
 104. M. Kanehisa, S. Goto, S. Kawashima, et al., *The KEGG resource for deciphering the genome*. Nucleic Acids Res., 2014, vol. 32.
 105. J. Muller, D. Szklarczyk, P. Julien, et al., *eggNOG v2.0: extending the evolutionary genealogy of genes with enhanced non-supervised orthologous groups, species and functional annotations*. Nucleic Acids Res., 2010, vol. 38, no. SUPPL.1.
 106. R.L. Tatusov, N.D. Fedorova, J.D. Jackson, et al., *The COG database: an updated version includes eukaryotes*. BMC Bioinformatics., 2003, no. 9.
 107. J. Mistry, S. Chuguransky, L. Williams, et al., *Pfam: The protein families*

- database in 2021*. Nucleic Acids Res., 2021, vol. 49, no. D1, pp. D412-D419.
108. A. Wilke, J. Bischof, W. Gerlach, et al.. *The MG-RAST metagenomics database and portal in 2015*. Nucleic Acids Res., 2016, vol. 44, no. D1, pp. D590-D594.
109. V.M. Markowitz, I.M. Chen, K. Chu, et al, *IMG/M: the integrated metagenome data management and comparative analysis system*. Nucleic Acids Res., 2012, vil. 40, no. D1, pp. D123-D129.
110. J. Qin, R. Li, J. Raes, et al., *A human gut microbial gen catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature., 2010, no. 464, pp. 59–65.
111. J. Xia, E. E. Gill, R. E. Hancock, *NetworkAnalyst for statistical, visual and network-based meta-analysis of gene expression data*. Protocol., 2015, vol. 10, no. 6, pp. 823-844.
112. Z. Xu, M.A. Hansen, L.H. Hansen, S. Jacquiod and S.J. Sørensen, *Bioinformatic approaches reveal metagenomic characterization of soil microbial community*. PLoS ONE., 2014, vol. 9, no. 4.
113. A. Ahmad, et al., *Analysis of gut microbiota of obese individuals with type 2 diabetes and healthy individuals*, PLoS ONE., 2019, Vol. 14.
114. A. Jurkowski, A.H. Reid, and J.B. Labov, *Metagenomics: A call for bringing a new science into the classroom (while it's still new)*, CBE Life Sci. Educ., 2007, vol. 6, no. 4, pp. 260–265.
115. Y. Youngseob, L. Changsoo, K. Jaai, and H. Seokhwan, *Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction*, Biotechnol. Bioeng., 2005, vol. 89, no. 6, pp. 670–679.
116. T. Magoč & S.L. Salzberg, *Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies*. Bioinformatics., 2011, vol. 27, no. 21, pp. 2957-2963.
117. J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, et al., *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data*. Nature methods., 2010, vol. 7, no. 5, pp. 335-336.
118. R.C. Edgar, *UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads*. Nature methods., 2013, vol. 10, no. 10, pp. 996-998.
119. U. Kõljalg, R.H. Nilsson, K. Abarenkov, et al., *Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi*. Molecular ecology., 2013, vol. 22, no. 21, pp. 5271-5277.
120. Y. Li, X. Hu, S. Yang, et al., *Comparison between the fecal bacterial microbiota*

- of healthy and diarrheic captive musk deer*. *Frontiers in microbiology.*, 2018, vol. 9, no. MAR.
121. A. Zuur, E.N. Ieno, G.M. Smith, *Analyzing ecological data*. Springer., 2007, New York.
 122. J.S. Gordon, O. Rauprich, J. Vollmann, *Applying the Four-Principle Approach*. *Bioethics.*, 2011, vol. 25, no. 6, pp. 293-300.
 123. D.H. Huson, A.F. Auch, J. Qi, S.C. Schuster, *MEGAN analysis of metagenomic data*. *Genome research.*, 2007, vol. 17, no. 3, pp. 377-386.
 124. J.B. Hughes, J.J. Hellmann, T.H. Ricketts, B.J. Bohannan, *Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity*. *Applied and environmental microbiology.*, 2001, vol. 67, no. 10, pp. 4399-4406.
 125. L. T. B. Hoa Thi Minh Tu, Nguyen La Anh, *Identification of Lactococcus pd14 producing bacteriocin*, *Vietnam J. Sci. Technol.*, 2013, vol. 54, no. 4, pp. 417–425.
 126. T. A. Hall, *BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*, in *Nucleic Acids Symposium Series.*, 1999, vol. 41, pp. 95–98.
 127. K. Sudhir, S. Glen, L. Michael, K. Christina, and T. Koichiro, *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms*, *Mol. Biol. Evol.*, 2018, vol. 35, pp. 1547–1549.
 128. S. Mueller, et al., *Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: A cross-sectional study*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 2, pp. 1027–1033.
 129. C. Lay, et al., *Colonic microbiota signatures across five northern European countries*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, no. 7, pp. 4153–4155.
 130. M. Li, et al., *Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, vol. 105, no. 6, pp. 2117–2122.
 131. C.I. Craciun, et al., *The Relationships between Gut Microbiota and Diabetes Mellitus, and Treatments for Diabetes Mellitus*, *Biomedicines.*, 2022, vol. 10, no. 2.
 132. S.A. Winther, et al., *Gut microbiota profile and selected plasma metabolites in type 1 diabetes without and with stratification by albuminuria*, *Diabetologia.*,

- 2020, vol. 63, no. 12, pp. 2713–2724.
133. J.I.P. van Heck, et al., *The Gut Microbiome Composition Is Altered in Long-standing Type 1 Diabetes and Associates With Glycemic Control and Disease-Related Complications*, *Diabetes Care.*, 2022, vol. 45, no. 9, pp. 2084–2094.
 134. I. Polidori, et al., *Characterization of Gut Microbiota Composition in Type 2 Diabetes Patients: A Population-Based Study*, *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 2022, vol. 19, no. 23.
 135. A.P. Doumatey, et al., *Gut Microbiome Profiles Are Associated With Type 2 Diabetes in Urban Africans*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2020, vol. 10.
 136. H.M. Wexler, *Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, vol. 20, no. 4, pp. 593–621.
 137. H. Zafar and M.H. Saier, *Gut Bacteroides species in health and disease*, *Gut Microbes.*, 2021, vol. 13, no. 1, pp. 1–20.
 138. H.J. Flint and S.H. Duncan, *Bacteroides and Prevotella*, *Encycl. Food Microbiol. Second Ed.*, 2014, pp. 203–208.
 139. W. Bielka, A. Przekaz, and A. Pawlik, *The role of the gut microbiota in the pathogenesis of diabetes*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 1.
 140. F. Magne, et al., *The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients?*, *Nutrients.*, 2020, vol. 12, no. 5.
 141. K.H. Allin, T. Nielsen, and O. Pedersen, *Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus*, *Eur. J. Endocrinol.*, 2015, vol. 172, no. 4, pp. R167–R177.
 142. G.T. Macfarlane and S. Macfarlane, *Fermentation in the human large intestine: Its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics*, *J. Clin. Gastroenterol.*, 2011, vol. 45, no. SUPPL. 3.
 143. Z. Chen, et al., *Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes with Gut Microbial Diversity: A Microbiome-Wide Analysis from Population Studies*, *JAMA Netw. Open.*, 2021, vol. 4, no. 7.
 144. J.C. Pérez, *Fungi of the human gut microbiota: Roles and significance*, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2021, vol. 311, no. 3.
 145. M. Salguero, M. Al-Obaide, R. Singh, et al., *Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates*

- inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease*, *Exp. Ther. Med.*, 2019.
146. M. Blaut, *Ecology and Physiology of the Intestinal Tract*, 2011, pp. 247–272.
147. Q. Li, Y. Chang, K. Zhang, et al., *Implication of the gut microbiome composition of type 2 diabetic patients from northern China*, *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1.
148. M. Candela, et al., *Modulation of gut microbiota dysbioses in type 2 diabetic patients by macrobiotic Ma-Pi 2 diet*, *Br. J. Nutr.*, 2016, vol. 116, no. 1, pp. 80–93.
149. K. Lippert, et al., *Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults*, *Benef. Microbes.*, 2017, vol. 8, no. 4, pp. 545–556.
150. Y. Yamaguchi, et al., *Association of Intestinal Microbiota with Metabolic Markers and Dietary Habits in Patients with Type 2 Diabetes*, *Digestion.*, 2016, vol. 94, no. 2, pp. 66–72.
151. S. Cheng, et al., *Women with and without metabolic disorder differ in their gut microbiota composition*, *Obesity.*, 2012, vol. 20, no. 5, pp. 1082–1087.
152. H. Wu, et al., *Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug*, *Nat. Med.*, 2017, vol. 23, no. 7, pp. 850–858.
153. R. Murphy, P. Tsai, M. Jüllig, et al., *Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric Surgery Vary According to Diabetes Remission*, *Obes. Surg.*, 2017, vol. 27, no. 4, pp. 917–925.
154. F. Malik, et al., *Is metformin poised for a second career as an antimicrobial?*, *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, 2018, vol. 34, no. 4.
155. Y. He, et al., *Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models*, *Nat. Med.*, 2018, vol. 24, no. 10, pp. 1532–1535.
156. Y. He, et al., *Linking gut microbiota, metabolic syndrome and economic status based on a population-level analysis*, *Microbiome*, 2018, vol. 6, no. 1.
157. J.Y. Yang, et al., *Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and*

- improves insulin sensitivity in mice*, Mucosal Immunol., 2017, vol. 10, no. 1, pp. 104–116.
158. P. Gauffin Cano, A. Santacruz, Á. Moya, and Y. Sanz, *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity, PLoS One, 2012, vol. 7, no. 7, 2012.
159. G. Falony, et al., *Population-level analysis of gut microbiome variation*, Science., 2016, vol. 352, no. 6285, pp. 560–564.
160. L.A. David, et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*, Nature, 2014, vol. 505, no. 7484, pp. 559–563.
161. F. De Filippis, et al., *Distinct Genetic and Functional Traits of Human Intestinal Prevotella copri Strains Are Associated with Different Habitual Diets*, Cell Host Microbe., 2019, vol. 25, no. 3, pp. 444-453.e3.
162. C. Serena, et al., *Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota*, ISME J., 2018, vol. 12, no. 7, pp. 1642–1657.
163. M.T. Henke, E.M. Brown, C.D. Cassilly, et al., *Capsular polysaccharide correlates with immune response to the human gut microbe Ruminococcus gnavus*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2021, vol. 118, no. 20.
164. V. Singh, et al., *Butyrate producers, ‘The Sentinel of Gut’: Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics*, Front. Microbiol., 2023, vol. 13.
165. M. Murri, et al., *Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: A case-control study*, BMC Med., 2013, vol. 11, no. 1.
166. K. Kikuchi, M. Ben Othman, and K. Sakamoto, *Sterilized bifidobacteria suppressed fat accumulation and blood glucose level*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2018, vol. 501, no. 4, pp. 1041–1047.
167. R. Aoki, et al., *A proliferative probiotic Bifidobacterium strain in the gut ameliorates progression of metabolic disorders via microbiota modulation and acetate elevation*, Sci. Rep., 2017, vol. 7.
168. P. Verbrugghe, J. Brynjólfsson, X. Jing, et al., *Evaluation of hypoglycemic effect, safety and immunomodulation of Prevotella copri in mice*, Sci. Rep., 2021, vol. 11, no. 1.
169. T. Franke and U. Deppenmeier, *Physiology and central carbon metabolism of*

- the gut bacterium Prevotella copri*, Mol. Microbiol., 2018, vol. 109, no. 4, pp. 528–540.
170. O. Koren, et al., *A Guide to Enterotypes across the Human Body: Meta-Analysis of Microbial Community Structures in Human Microbiome Datasets*, PLoS Comput. Biol., 2013, vol. 9, no. 1.
 171. T. Accetto and G. Avguštin, *Polysaccharide utilization locus and CAZyme genome repertoires reveal diverse ecological adaptation of Prevotella species*, Syst. Appl. Microbiol., 2015, vol. 38, no. 7, pp. 453–461.
 172. B.K. Tripathi and A.K. Srivastava, *Diabetes mellitus: Complications and therapeutics*, Med. Sci. Monit., 2006, vol. 12, no. 7.
 173. T.P.M. Scheithauer, et al., *Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes*, Front. Immunol., 2020, vol. 11.
 174. P.D. Cani, et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*, Diabetes, 2008, vol. 57, no. 6, pp. 1470–1481.
 175. F. Del Chierico, et al., *Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach*, Hepatology, 2017, vol. 65, no. 2, pp. 451–464.
 176. F.J. Verdam, et al., *Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity*, Obesity, 2013, vol. 21, no. 12.
 177. E. Cekanaviciute, et al., *Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2017, vol. 114, no. 40, pp. 10713–10718.
 178. K. Wang, et al., *Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids*, Cell Rep., 2019, vol. 26, no. 1, pp. 222-235.e5.
 179. Z. Shan, et al., *Association between microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide and type 2 diabetes*, Am. J. Clin. Nutr., 2017, vol. 106, no. 3, pp. 888–894.
 180. E. Fabersani, et al., *Bacteroides uniformis CECT 7771 alleviates inflammation within the gut-adipose tissue axis involving TLR5 signaling in obese mice*, Sci. Rep., 2021, vol. 11, no. 1.

181. M. Lopez-Siles, et al., *Faecalibacterium prausnitzii: From microbiology to diagnostics and prognostics*, ISME J., 2017, vol. 11, no. 4, pp. 841–852.
182. R. Martín, et al., *Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model*, BMC Microbiol., 2015, vol. 15, no. 1.
183. R.D.G. Leslie, et al., *Diabetes classification: Grey zones, sound and smoke: Action LADA 1*, Diabetes. Metab. Res. Rev., 2008, vol. 24, no. 7, pp. 511–519.
184. K. A. Lê, et al., *Alterations in fecal Lactobacillus and Bifidobacterium species in type 2 diabetic patients in Southern China population*, Front. Physiol., 2013, vol. 3 JAN.
185. P.S. Hsieh, et al., *Lactobacillus salivarius AP-32 and Lactobacillus reuteri GL-104 decrease glycemic levels and attenuate diabetes-mediated liver and kidney injury in db/db mice*, BMJ Open Diabetes Res. Care, 2020, vol. 8, no. 1.
186. C.H. Wang, et al., *Adjuvant Probiotics of Lactobacillus salivarius subsp. salicinius AP-32, L. johnsonii MH-68, and Bifidobacterium animalis subsp. lactis CP-9 Attenuate Glycemic Levels and Inflammatory Cytokines in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus*, Front. Endocrinol. (Lausanne)., 2022, vol. 13.
187. F.H. Karlsson, et al., *Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control*, Nature, 2013, vol. 498, no. 7452, pp. 99–103.
188. S. J. et al., *Gut dysbiosis and detection of 'Live gut bacteria' in blood of Japanese patients with type 2 diabetes*, Diabetes Care, 2014, vol. 37, no. 8, pp. 2343–2350.
189. S. Sharma and P. Tripathi, *Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go?*, J. Nutr. Biochem., 2019, vol. 63, pp. 101–108.
190. H.S. Ejtahed, et al., *Main gut bacterial composition differs between patients with type 1 and type 2 diabetes and non-diabetic adults*, J. Diabetes Metab. Disord., 2020, vol. 19, no. 1, pp. 265–271.
191. B. Namdag, et al., *Determination Result of Colonic Lactobacillus in Healthy Adults*, 2019, vol. 5, no. 2, pp. 149–156.
192. H. Yadav, S. Jain, and P. R. Sinha, *Antidiabetic effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in high fructose*

- fed rats*, Nutrition, 2007, vol. 23, no. 1, pp. 62–68.
193. W. Zhang, J. H. Xu, T. Yu, and Q. K. Chen, *Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice*, Biomed. Pharmacother., 2019, vol. 118.
 194. L. Wang, P. Li, Z. Tang, X. Yan, and B. Feng, *Structural modulation of the gut microbiota and the relationship with body weight: Compared evaluation of liraglutide and saxagliptin treatment,*” Sci. Rep., 2016, vol. 6.
 195. Q. Zhang and N. Hu, *Effects of metformin on the gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus*, Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther., 2020, vol. 13, pp. 5003–5014.
 196. R. Nurmalya Kardina, K. Yuliani, and F. Nuriannisa, *Lactobacillus and Bifidobacterium Bacteria Profile in Healthy People and People with Type 2 Diabetes Mellitus*, J. Heal. Sci. Prev., 2021, vol. 5, no. 1, pp. 33–39.
 197. A. Koliada, et al., *Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population*, BMC Microbiol., 2017, vol. 17, no. 1.
 198. A. Riva, et al., *Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations*, Environ. Microbiol., 2017, vol. 19, no. 1, pp. 95–105.
 199. M. Duan, Y. Wang, Q. Zhang, R. Zou, M. Guo, and H. Zheng, *Characteristics of gut microbiota in people with obesity*, PLoS One, 2021, vol. 16, no. 8 August.
 200. A.I. Álvarez-Mercado, et al., *Microbial population changes and their relationship with human health and disease*, Microorganisms, 2019, vol. 7, no. 3.
 201. N.R. Shin, T.W. Whon, and J.W. Bae, *Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota*, Trends Biotechnol., 2015, vol. 33, no. 9, pp. 496–503.
 202. G. Rizzatti, et al., *Proteobacteria: A common factor in human diseases*, Biomed Res. Int., 2017, vol. 2017.
 203. . Zhu and M.O. Goodarzi, *Metabolites Linking the Gut Microbiome with Risk for Type 2 Diabetes*, Curr. Nutr. Rep., 2020, vol. 9, no. 2, pp. 83–93.
 204. E. Sepp, H. Kolk, K. Lõivukene, and M. Mikelsaar, *Higher blood glucose level associated with body mass index and gut microbiota in elderly people*, Microb.

- Ecol. Heal. Dis., 2014, vol. 25, no. 0.
205. A.K.H, et al., *Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes*, Diabetologia, 2018, vol. 61, no. 4, pp. 810–820.
206. S. Xiao, et al., *A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome*, FEMS Microbiol. Ecol., 2014, vol. 87, no. 2, pp. 357–367.
207. A. Ignacio, et al., *Correlation between body mass index and faecal microbiota from children*, Clin. Microbiol. Infect., 2016, vol. 22, no. 3, pp. 258.e1-258.e8.
208. A. Martinic, et al., *Supplementation of Lactobacillus plantarum Improves Markers of Metabolic Dysfunction Induced by a High Fat Diet*, J. Proteome Res., 2018, vol. 17, no. 8, pp. 2790–2802.
209. S.S. Behera, R.C. Ray, and N. Zdolec, *Lactobacillus plantarum with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods*, Biomed Res. Int., 2018, vol. 2018.
210. W. Alkema, J. Boekhorst, M. Wels, and S.A.F.T. Van Hijum, *Microbial bioinformatics for food safety and production*, Brief. Bioinform., 2016, vol. 17, no. 2, pp. 283–292.
211. B. Zhang, et al., *Screening of probiotic activities of lactobacilli strains isolated from traditional Tibetan Qula, a raw yak milk cheese*, Asian-Australasian J. Anim. Sci., 2016, vol. 29, no. 10, pp. 1490–1499.
212. Y.H. Shim, S.J. Lee, and J.W. Lee, *Antimicrobial activity of lactobacillus strains against uropathogens*, Pediatr. Int., 2016, vol. 58, no. 10, pp. 1009–1013.
213. Ha Thi Thu, Hoang The Hung, Tran Xuan Thach, *H₂O₂ production in Lactobacillus strains isolated from the intestinal microbiome of healthy people*, J. Biol., 2020, vol. 42, no. 1, pp. 83–92.
214. Y. Bao, et al., *Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products*, Food Control., 2010, vol. 21, no. 5, pp. 695–701.
215. M. Song, et al, *Characterization of selected lactobacillus strains for use as probiotics*, Korean J. Food Sci. Anim. Resour., 2015, vol. 35, no. 4, pp. 551–556.
216. H. Hassanzadazar, A. Ehsani, K. Mardani, and J. Hesari, *Investigation of*

- antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese*, Vet. Res. forum an Int. Q. J., 2012, vol. 3, no. 3, pp. 181–5.
217. Y.S. Lee, D. Lee, G.S. Park, et al., *Lactobacillus plantarum HAC01 ameliorates type 2 diabetes in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice in association with modulating the gut microbiota*, Food Funct., 2021, 12, pp 6363-6373.
218. K.B. Harris and D.J. McCarty, *Efficacy and tolerability of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes mellitus*, Ther. Adv. Endocrinol. Metab., 2015, vol. 6, no. 1, pp. 3–18.
219. A. Everard and P.D. Cani, *Gut microbiota and GLP-1*, Rev. Endocr. Metab. Disord., 2014, vol. 15, no. 3, pp. 189–196.
220. A. Di Cerbo, et al., *Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli*, J. Clin. Pathol., 2016, vol. 69, no. 3, pp. 187–203.
221. T. Manaer, L. Yu, Y. Zhang, X. J. Xiao, and X. H. Nabi, *Anti-diabetic effects of shubat in type 2 diabetic rats induced by combination of high-glucose-fat diet and low-dose streptozotocin*, J. Ethnopharmacol., 2015, vol. 169, pp. 269–274.
222. S. Zhao, et al., *Protective effect of Lactobacillus plantarum ATCC8014 on acrylamide-induced oxidative damage in rats*, Appl. Biol. Chem., 2020, vol. 63, no. 1.
223. M.C. Simon, et al., *Intake of lactobacillus reuteri improves incretin and insulin secretion in Glucose-Tolerant humans: A proof of concept*, Diabetes Care., 2015, vol. 38, no. 10, pp. 1827–1834.
224. H. Panwar, H.M. Rashmi, V.K. Batish, and S. Grover, *Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes - prospects and perspectives*, Diabetes. Metab. Res. Rev., 2013, vol. 29, no. 2, pp. 103–112.
225. A. Pegah, E. Abbasi-Oshaghi, I. Khodadadi, F. Mirzaei, and H. Tayebinia, *Probiotic and resveratrol normalize GLP-1 levels and oxidative stress in the intestine of diabetic rats*, Metab. Open., 2021, vol. 10, p. 100093.
226. A. Everard, P.D. Cani, *Gut microbiota and GLP-1*, Rev Endocr Metab Disord., 2014, 15(3), pp. 189-196.
227. T. Manaer, L. Yu, Y. Zhang, et al., *Anti-diabetic effects of shubat in type 2 diabetic rats induced by combination of high-glucose-fat diet and low-dose*

- streptozotocin*, J Ethnopharmacol., 2015, 169, pp. 269-274.
228. Z. Sun, X. Sun, J. Li, et al., *Using probiotics for type 2 diabetes mellitus intervention: Advances, questions, and potential*, Crit Rev Food Sci Nutr., 2020, 60(4), pp. 670-683.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Cây phân loại phức hệ vi sinh vật trong mẫu phân của nữ giới không tiểu đường

Phụ lục 2: Cây phân loại phức hệ vi sinh vật trong mẫu phân của nữ giới mắc bệnh tiểu đường type 2

Phụ lục 3: Cây phân loại phức hệ vi sinh vật trong mẫu phân của nam giới không mắc bệnh tiểu đường

Phụ lục 4: Cây phân loại phức hệ vi sinh vật trong mẫu phân của nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2

Phụ lục 5: Thành phần và độ phong phú của quần thể vi khuẩn ở mẫu shotgun metagenomic không tiểu đường

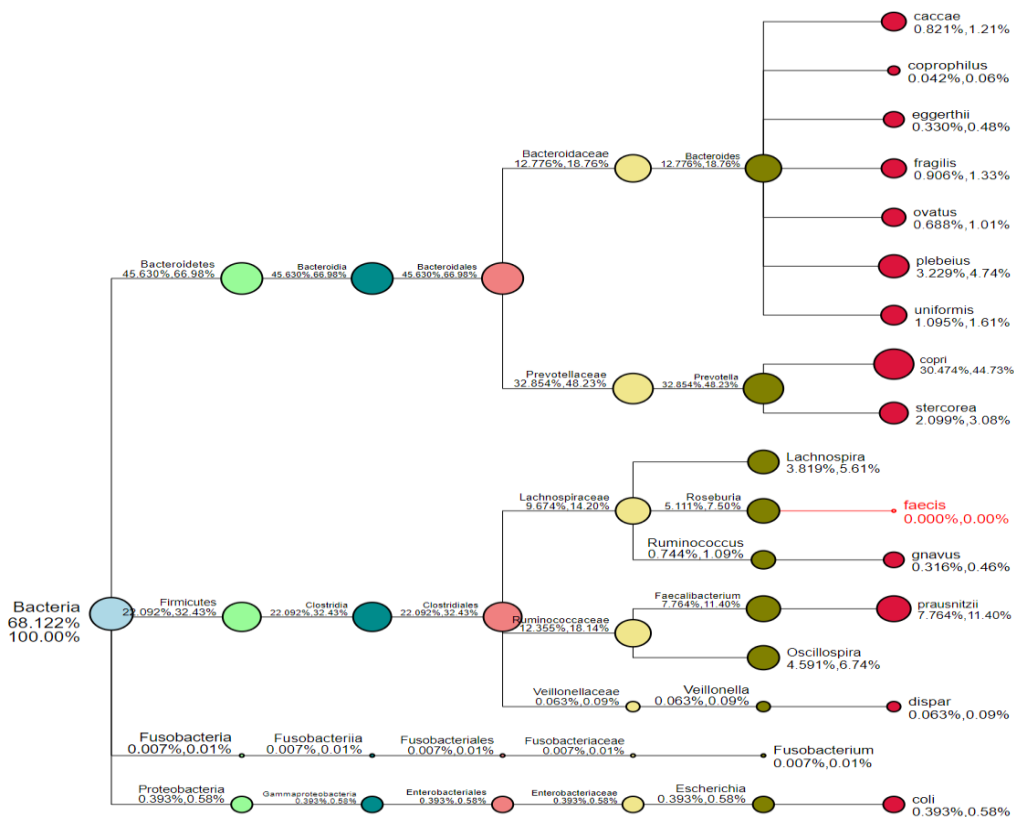
Phụ lục 6: Thành phần và độ phong phú của quần thể vi khuẩn ở mẫu shotgun metagenomic mắc bệnh tiểu đường type 2

Phụ lục 7: Trình tự cụ thể của các OUT thuộc nhóm vi sinh vật có khả năng liên quan đến bệnh tiểu đường type 2

Phụ lục 1: Cây phân loại phức hệ vi sinh vật trong mẫu phân của nữ giới không tiểu đường

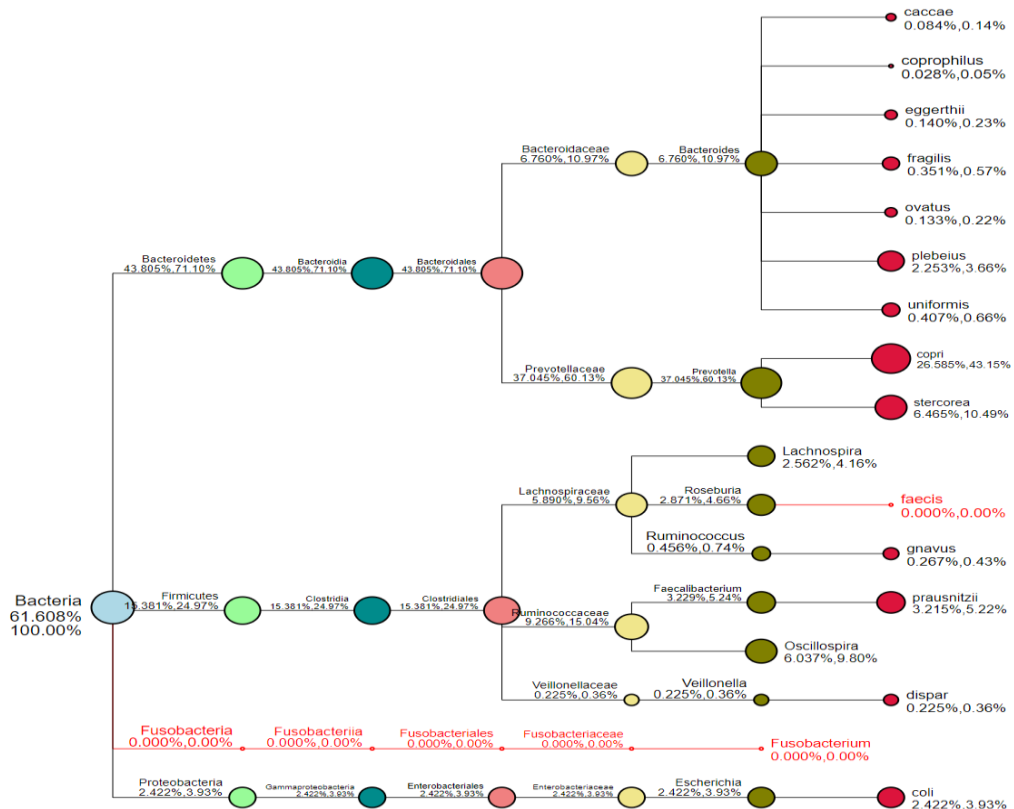
C1

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



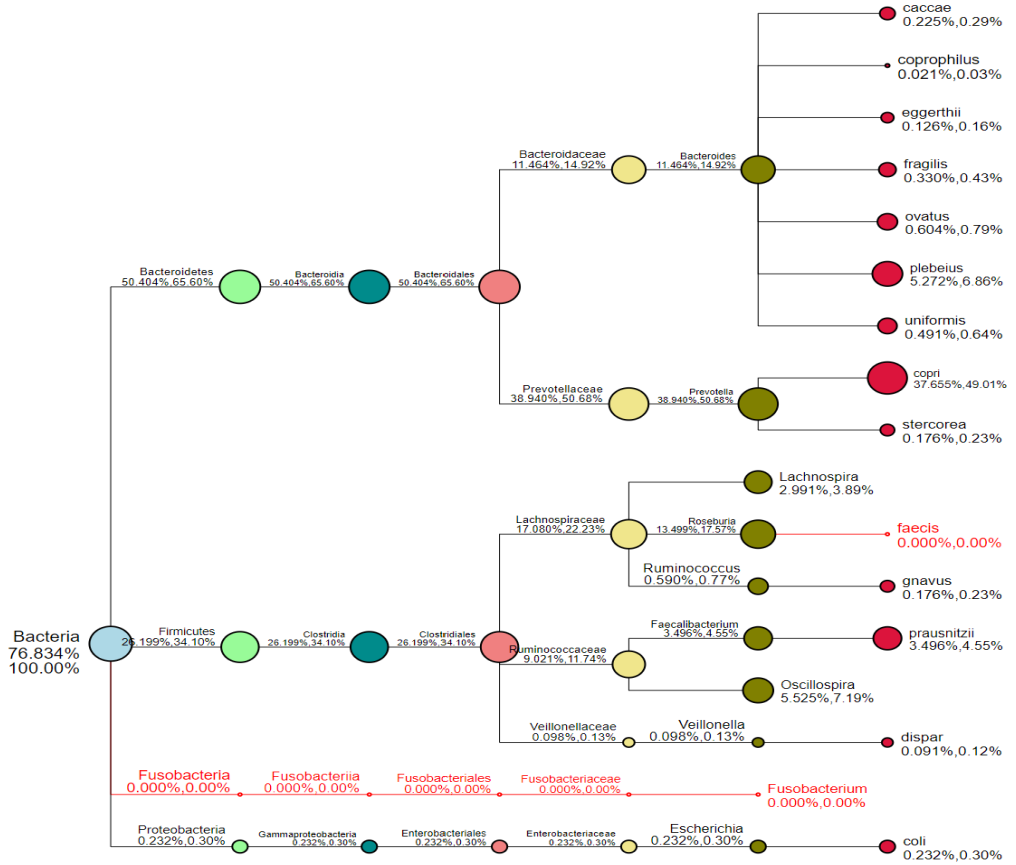
C2

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



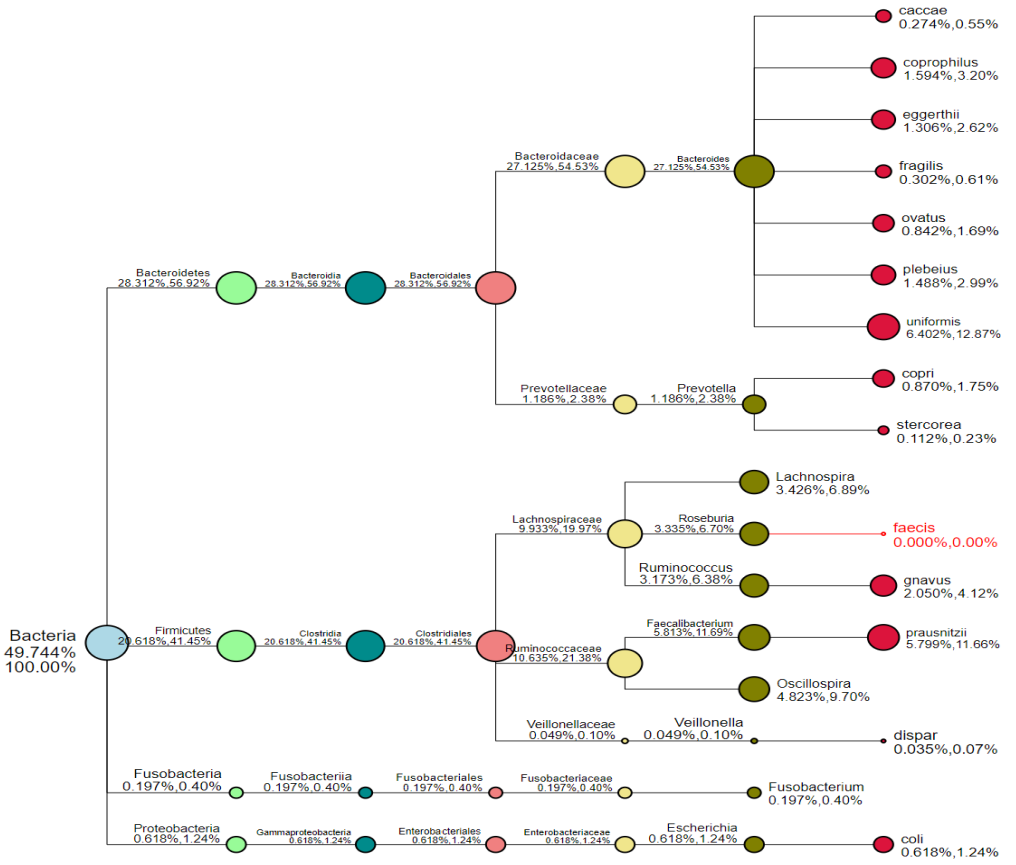
C3

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



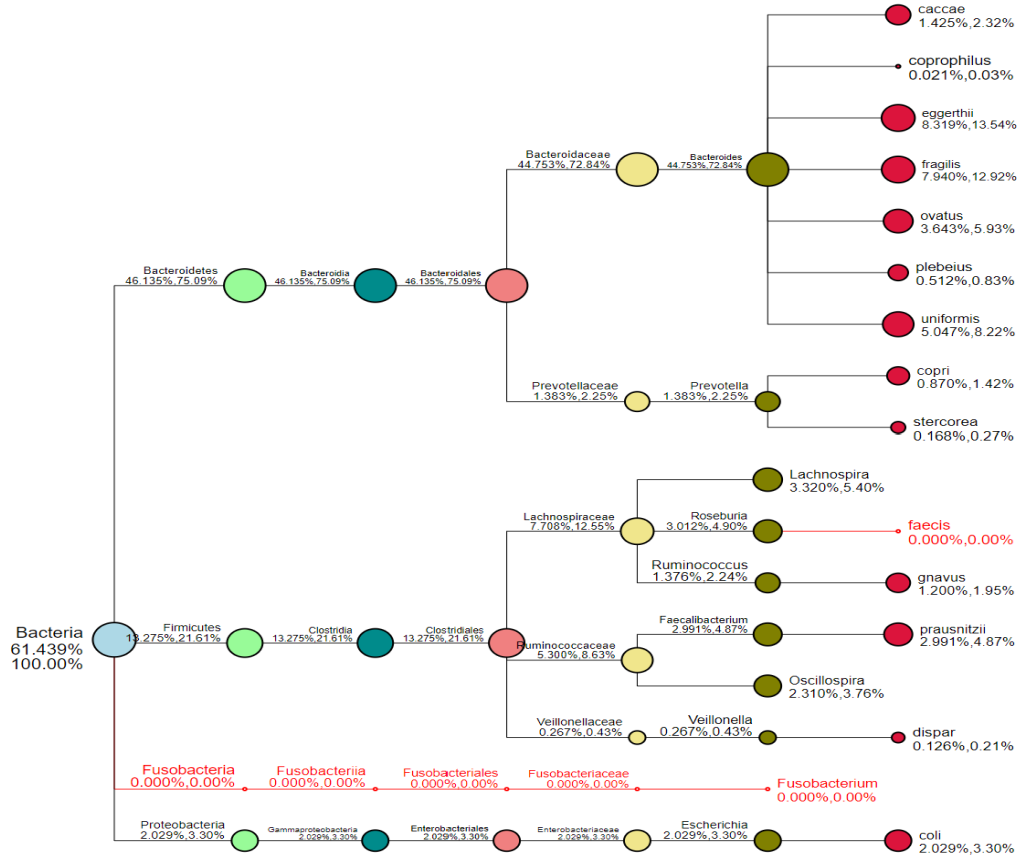
C4

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



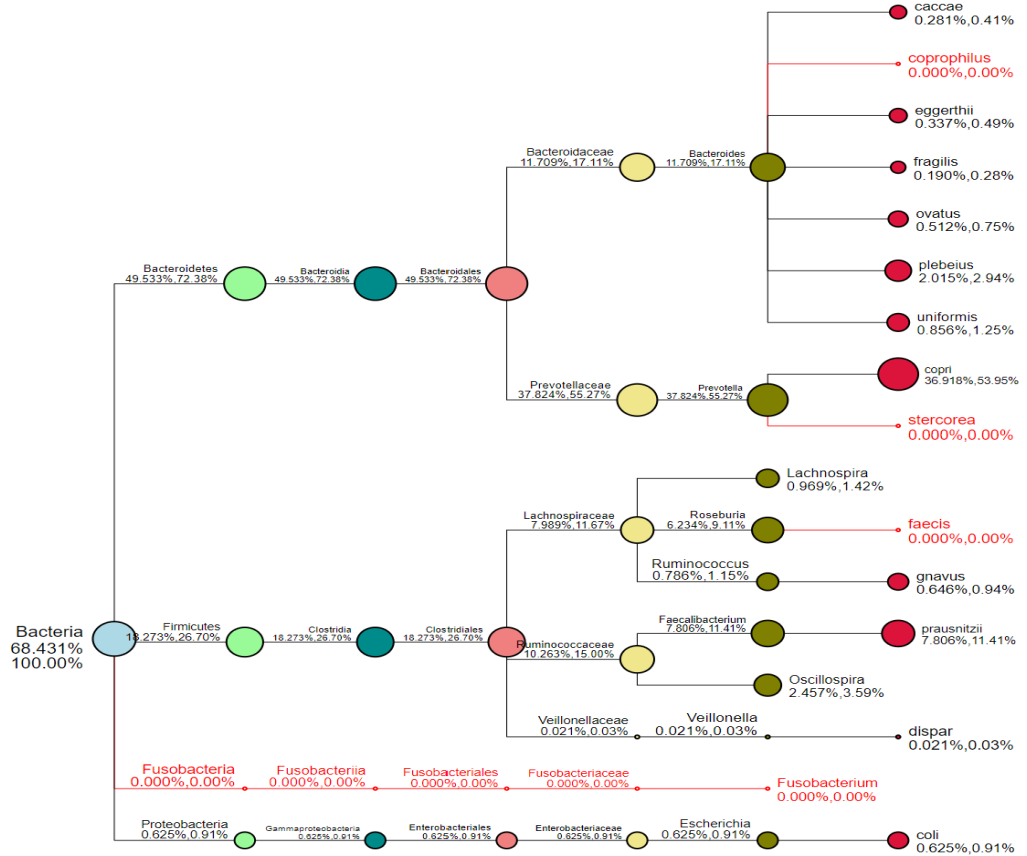
C5

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



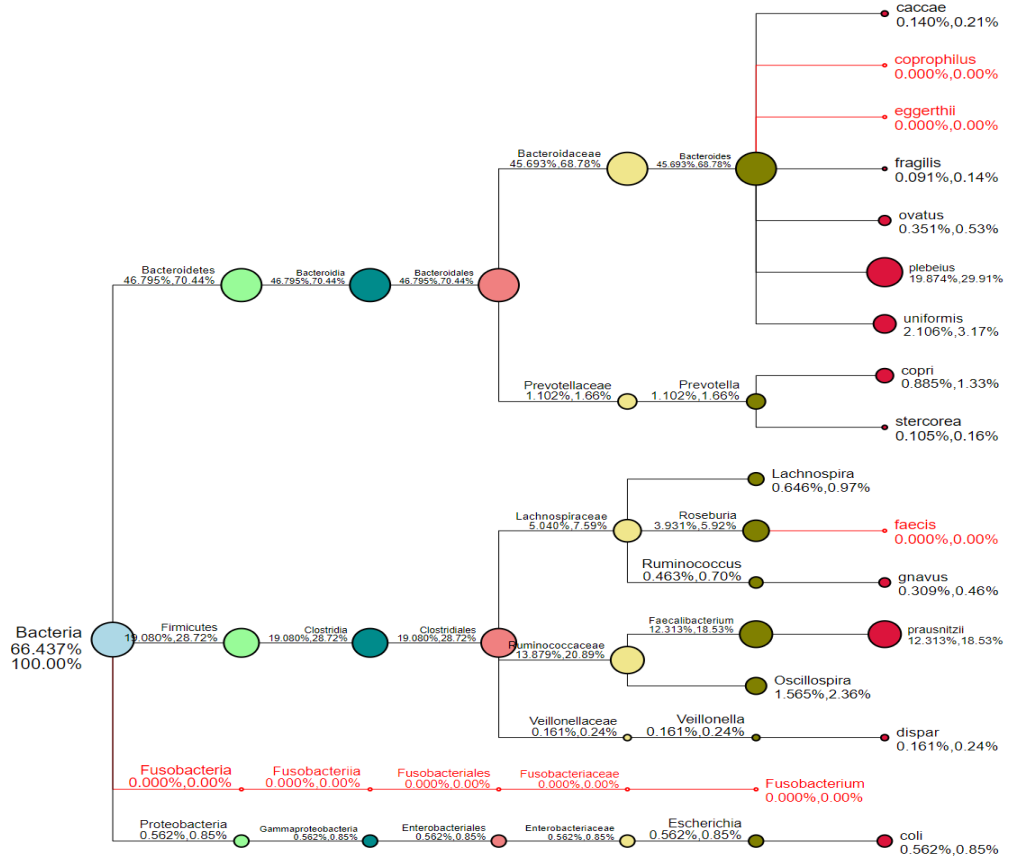
C6

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



C7

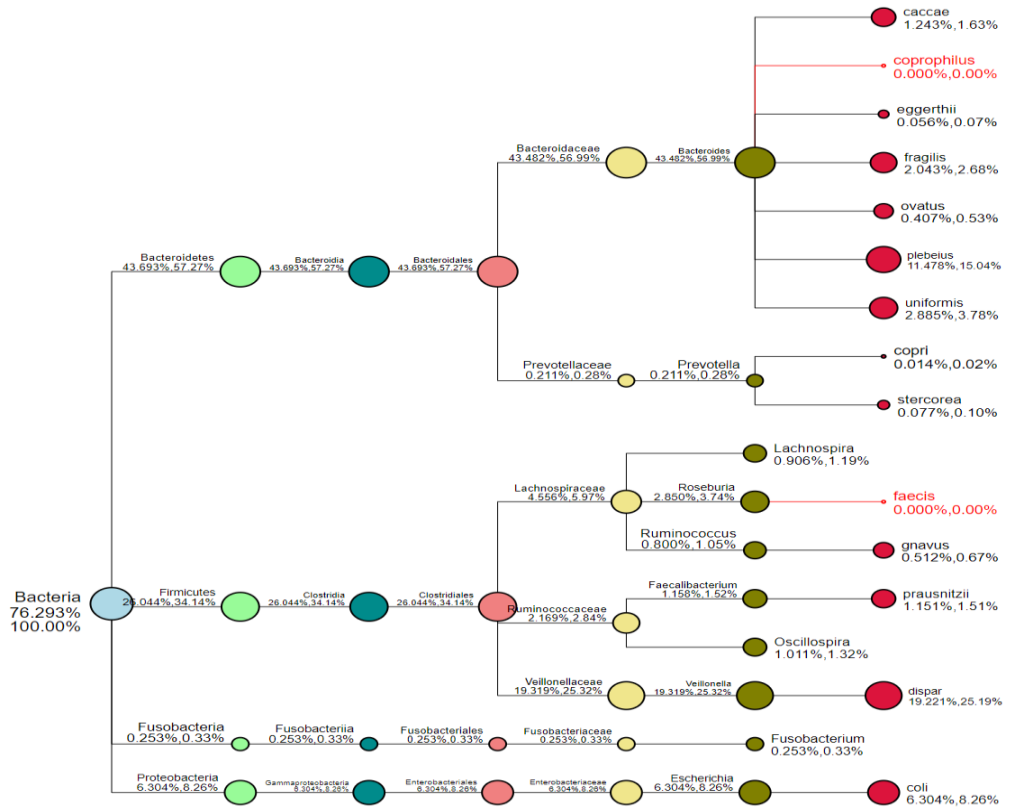
- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



Phụ lục 2: Cây phân loại phức hệ vi sinh vật trong mẫu phân của nữ giới mắc bệnh tiêu đường type 2

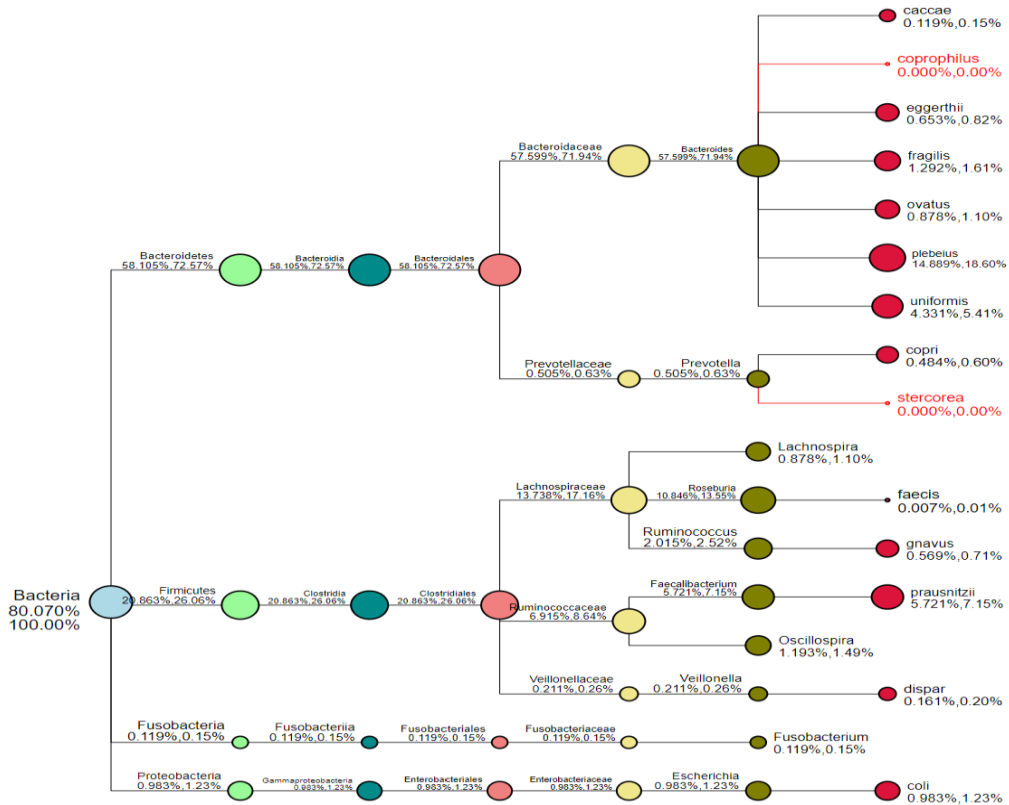
D1

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



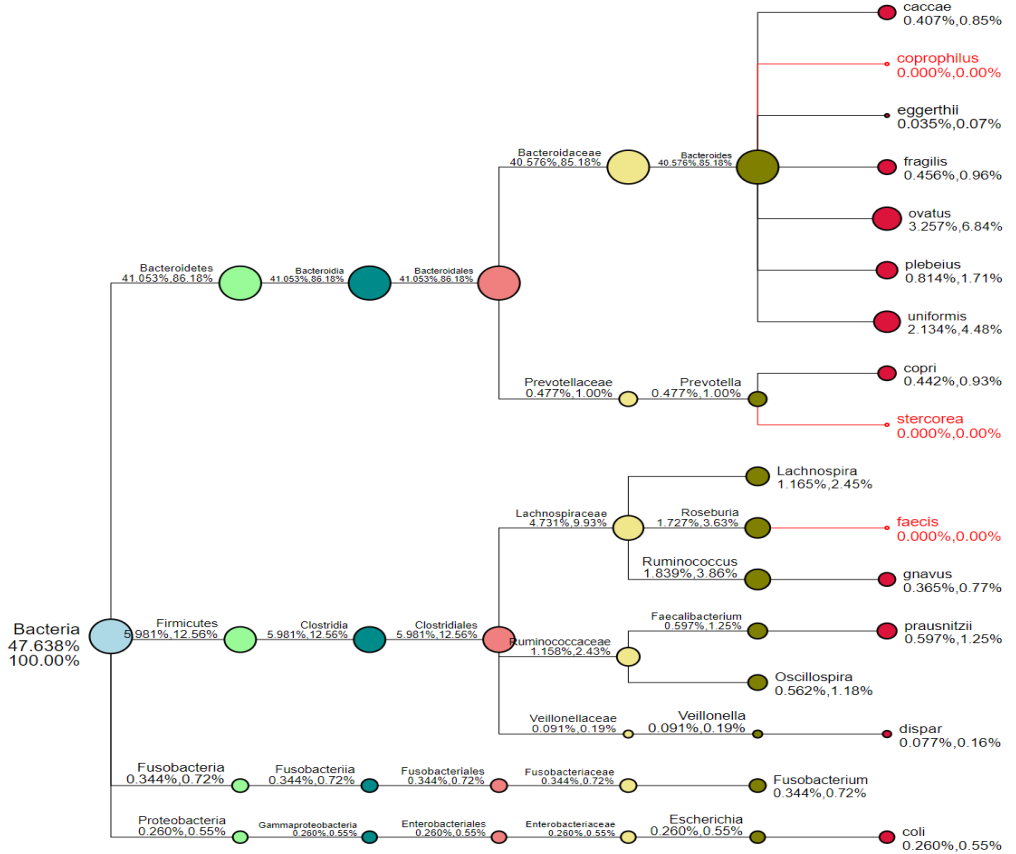
D2

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



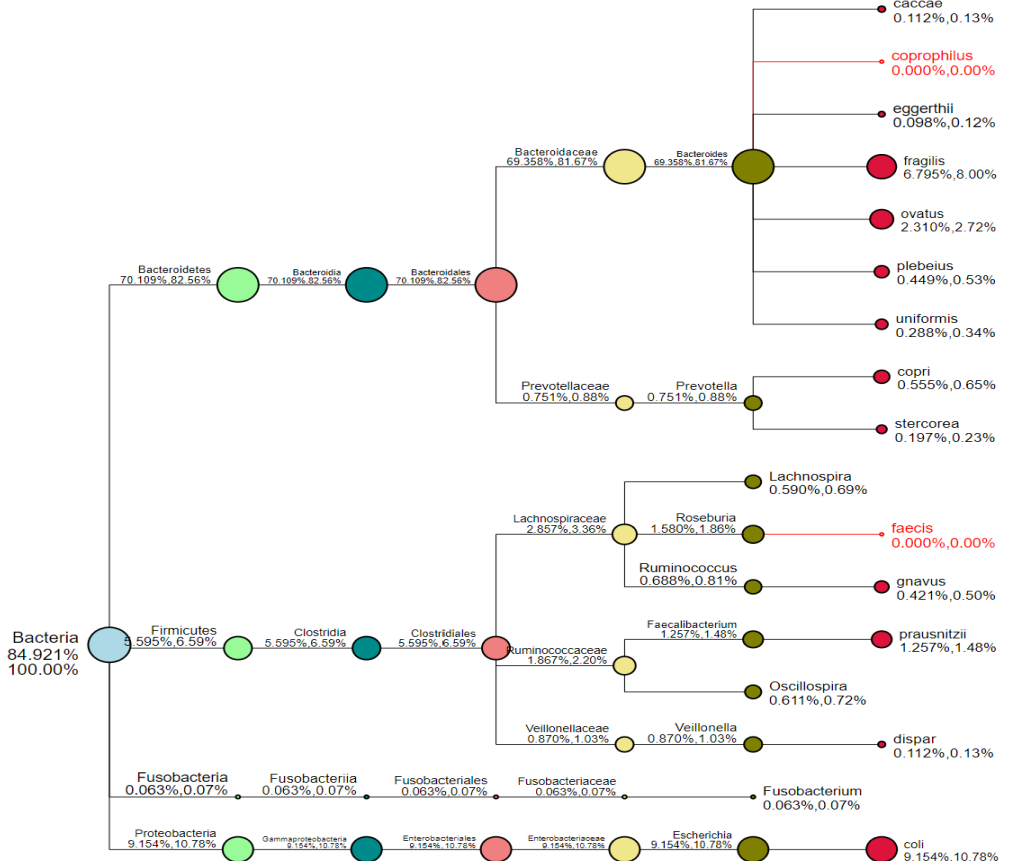
D3

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



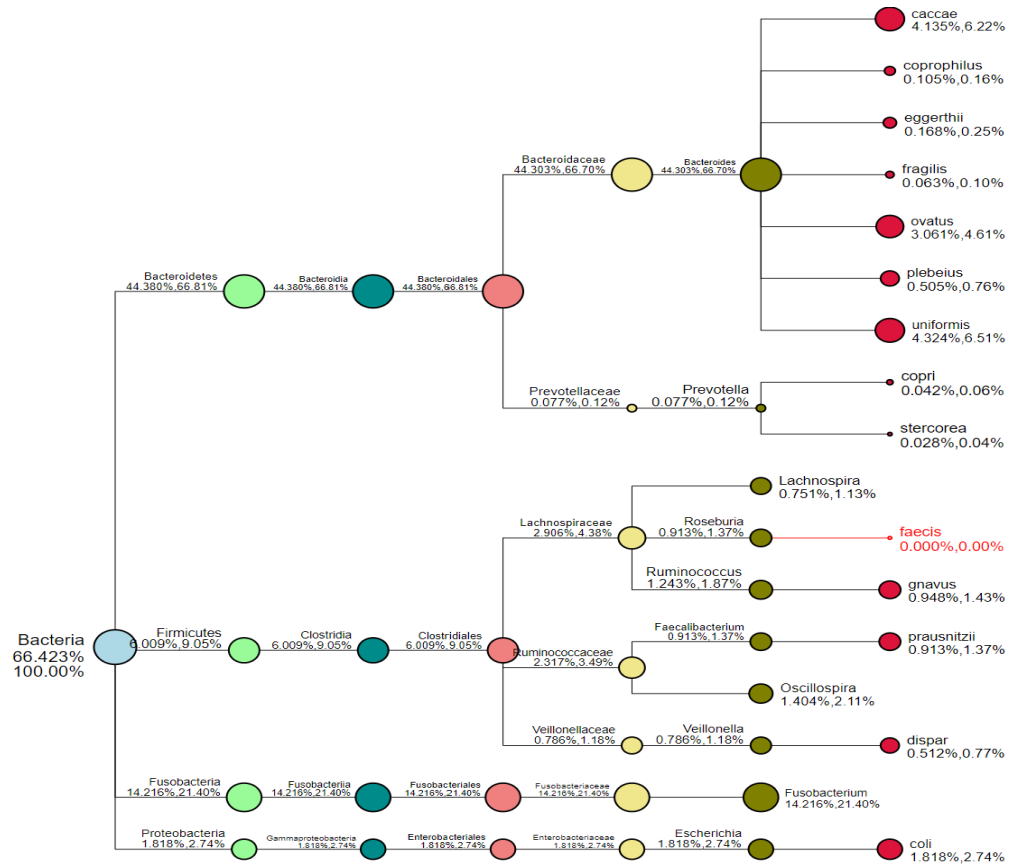
D4

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



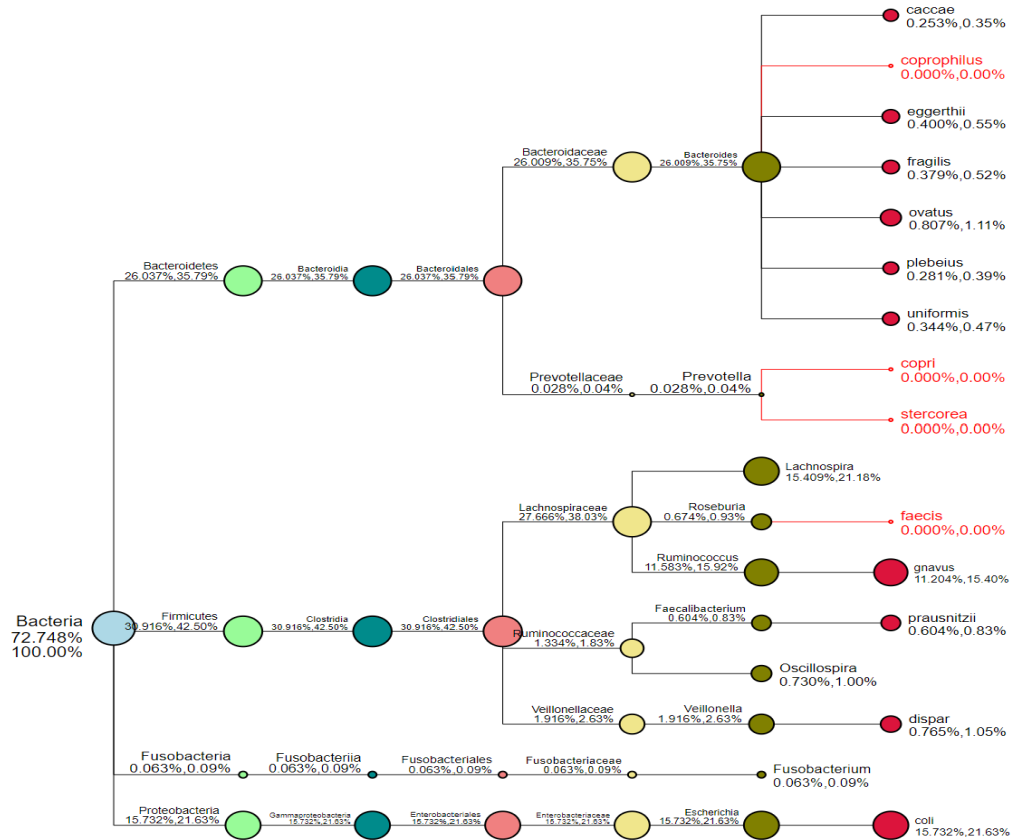
D5

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



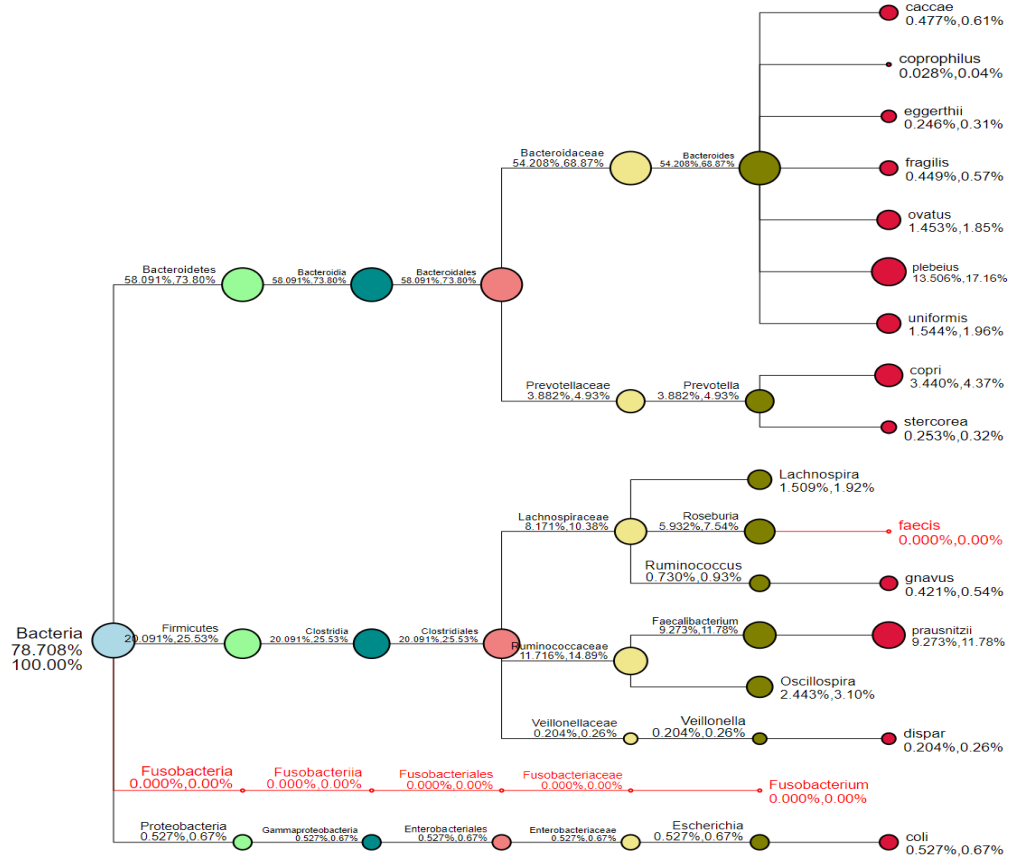
D6

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



D7

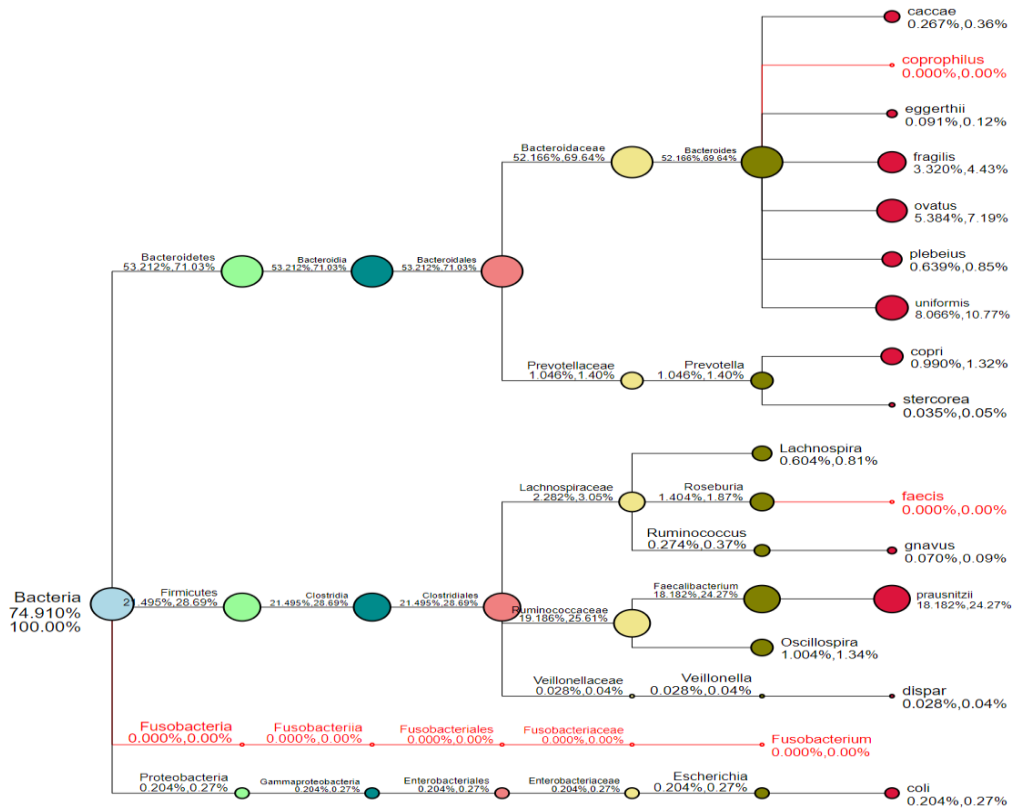
- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



Phụ lục 3: Cây phân loại phức hệ vi sinh vật trong mẫu phân của nam giới không mắc bệnh tiêu đường

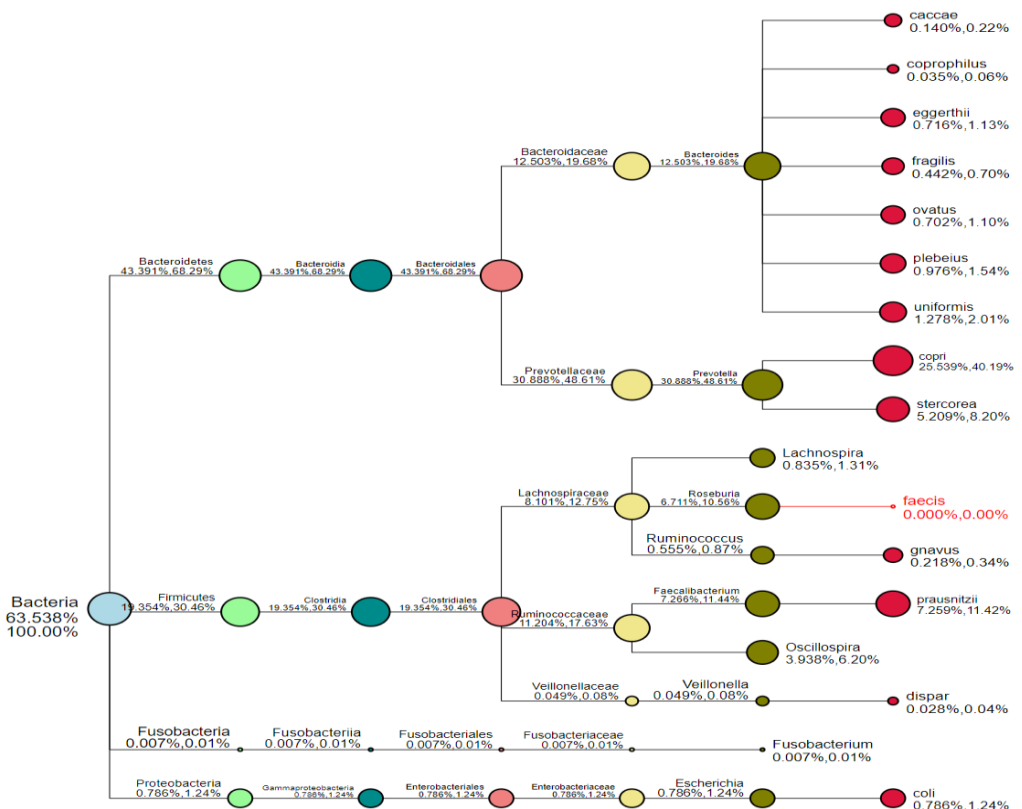
C8

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



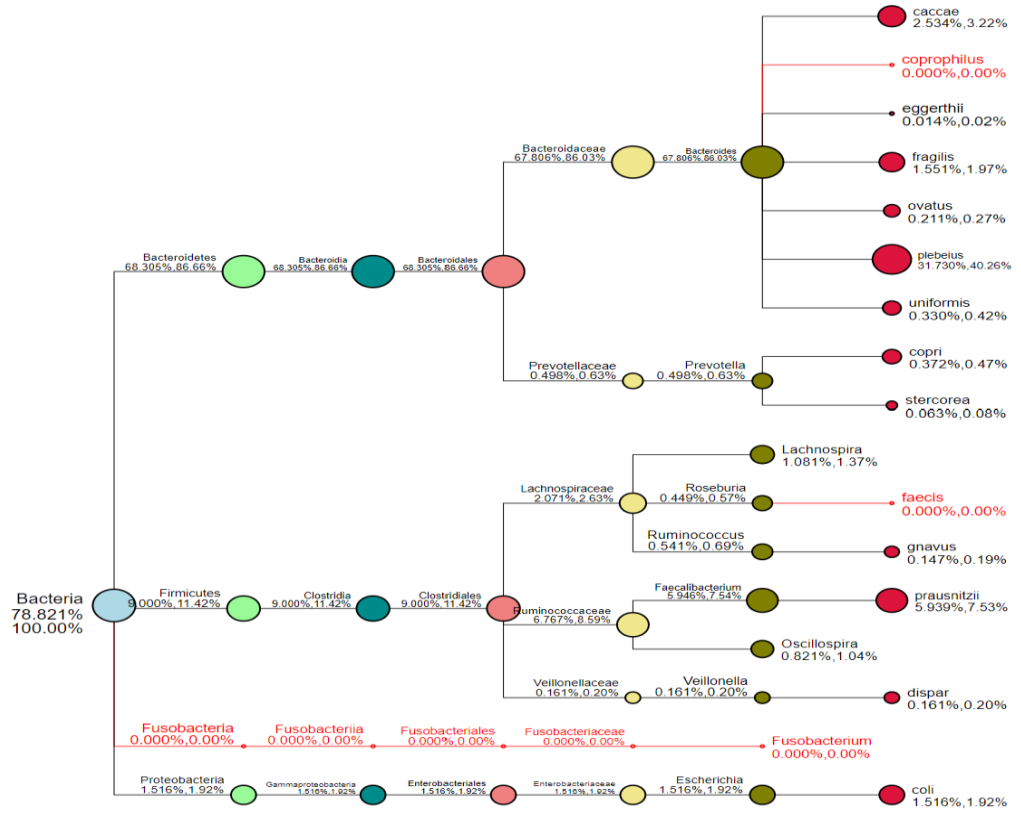
C9

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



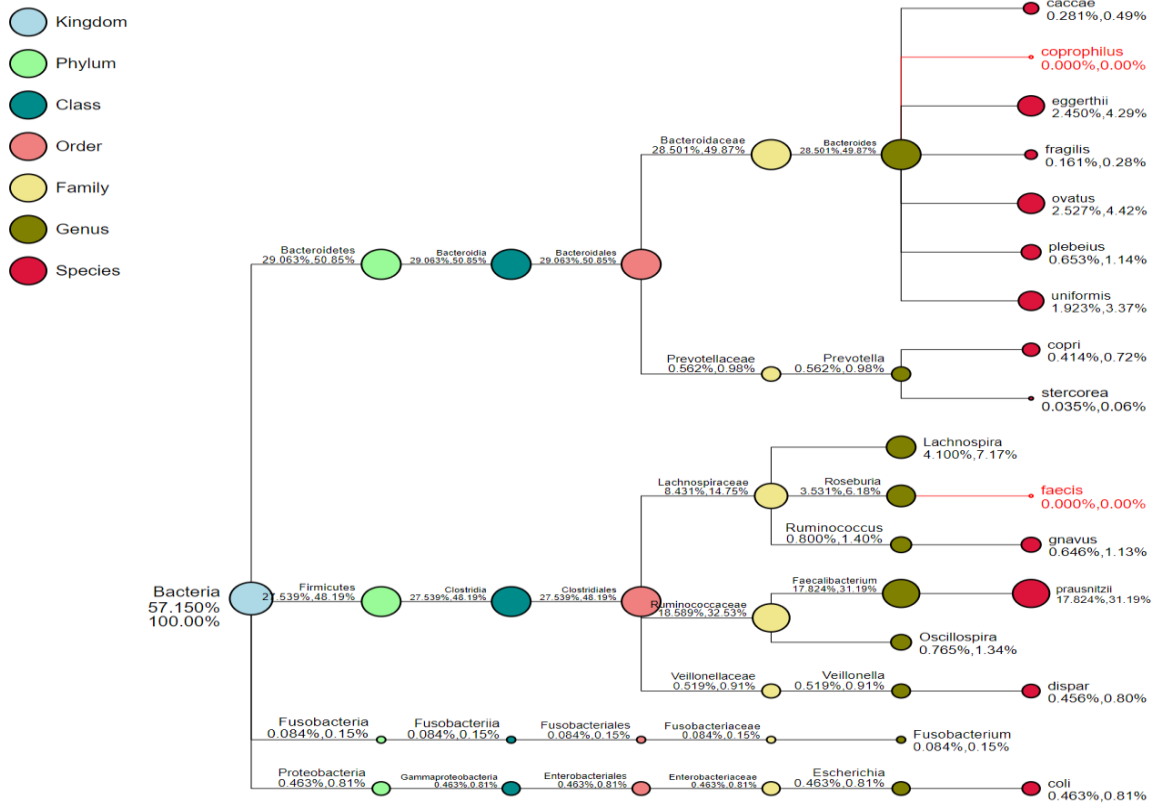
C10

- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species

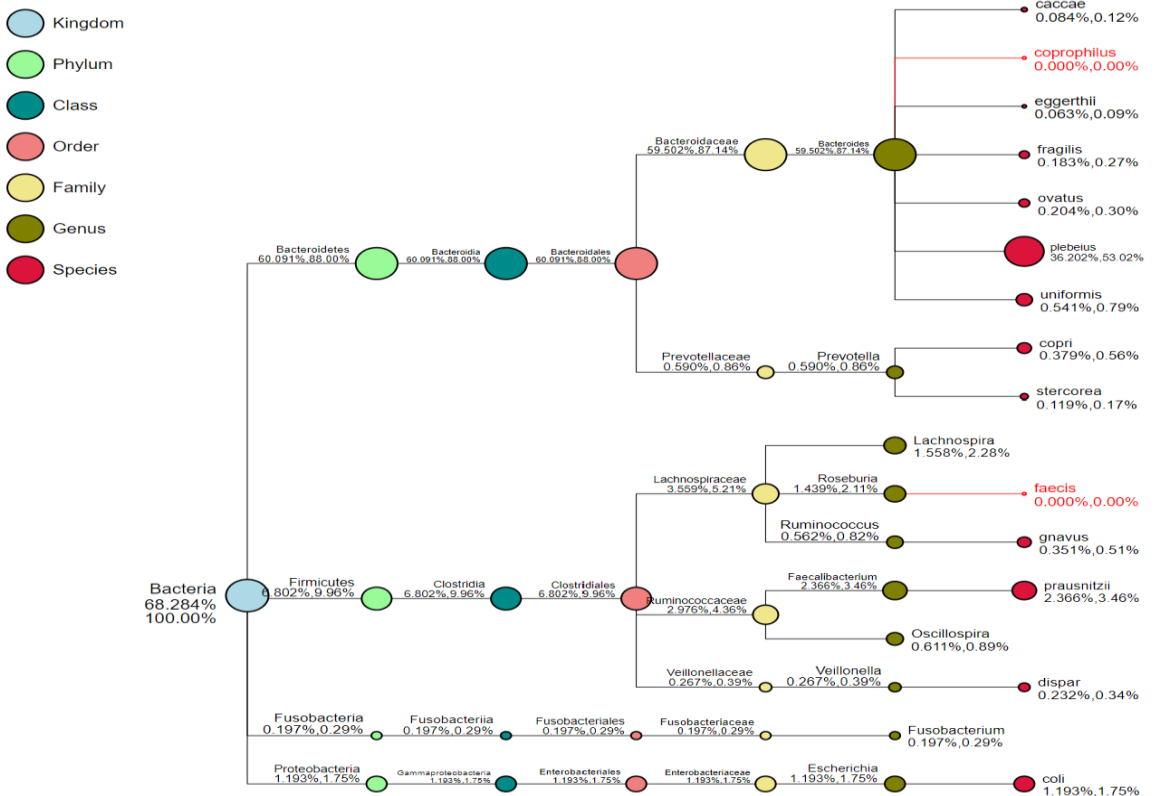


Phụ lục 4: Cây phân loại phức hệ vi sinh vật trong mẫu phân của nam giới mắc bệnh tiểu đường type 2

D8

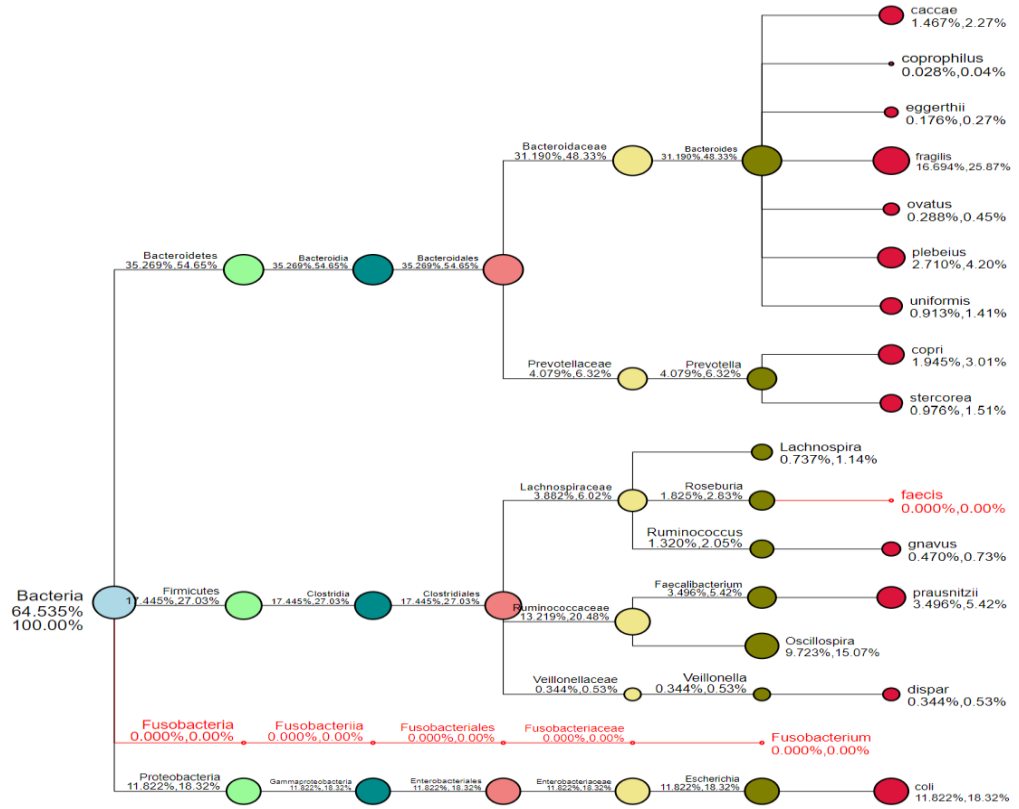


D9

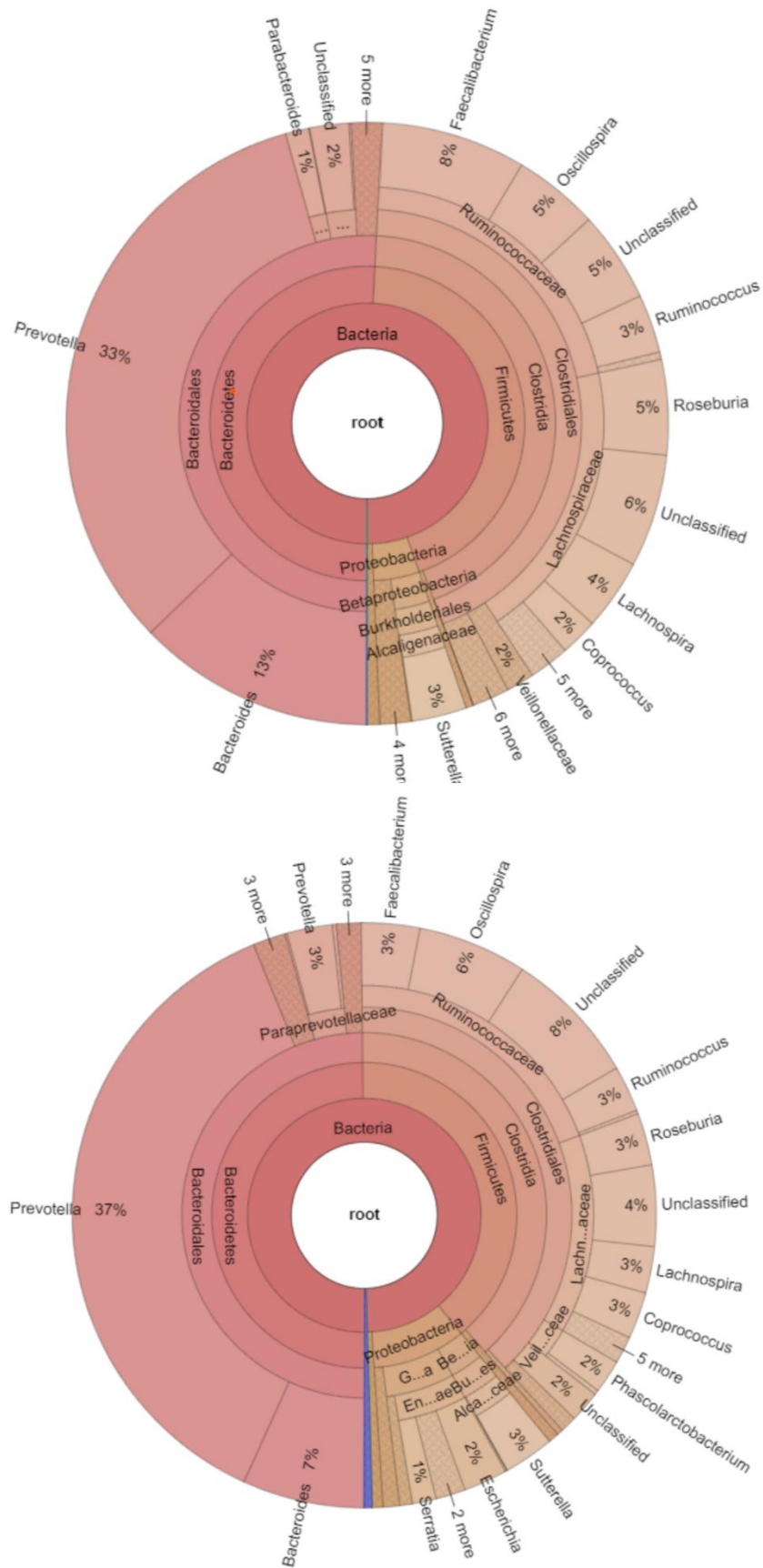


D10

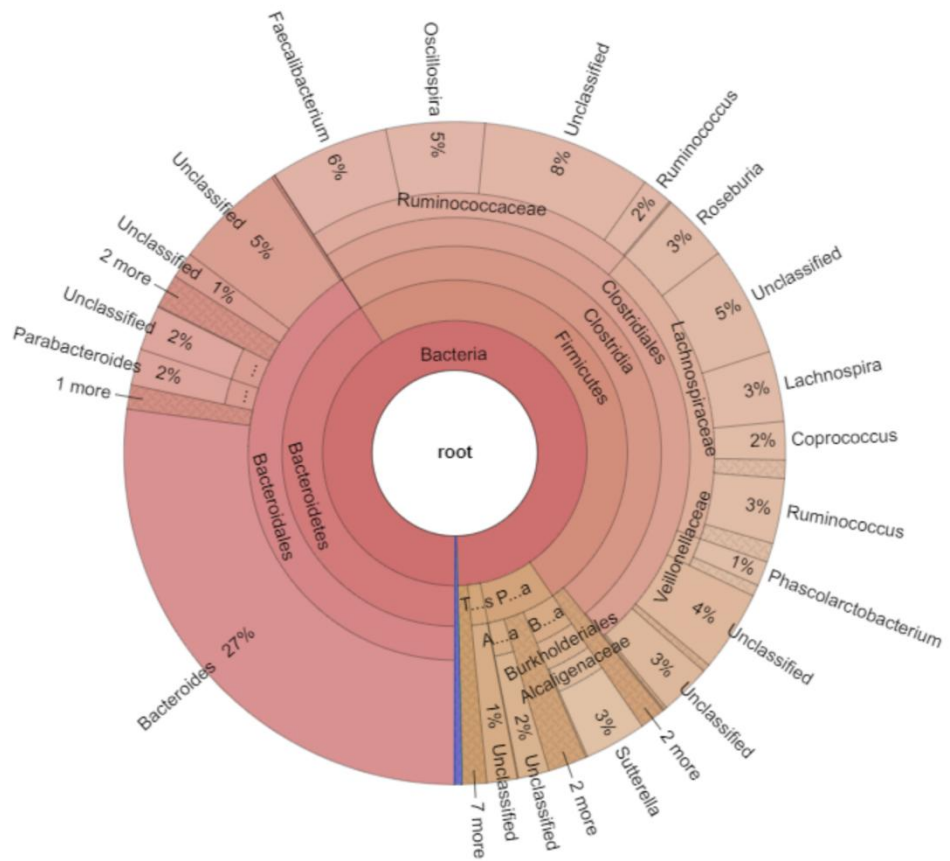
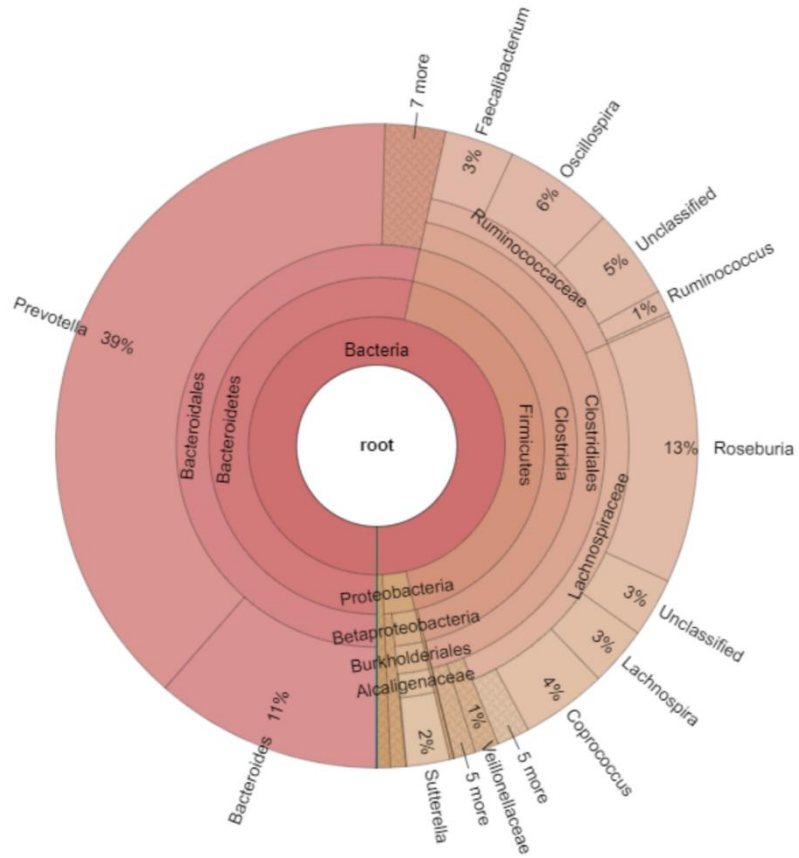
- Kingdom
- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species



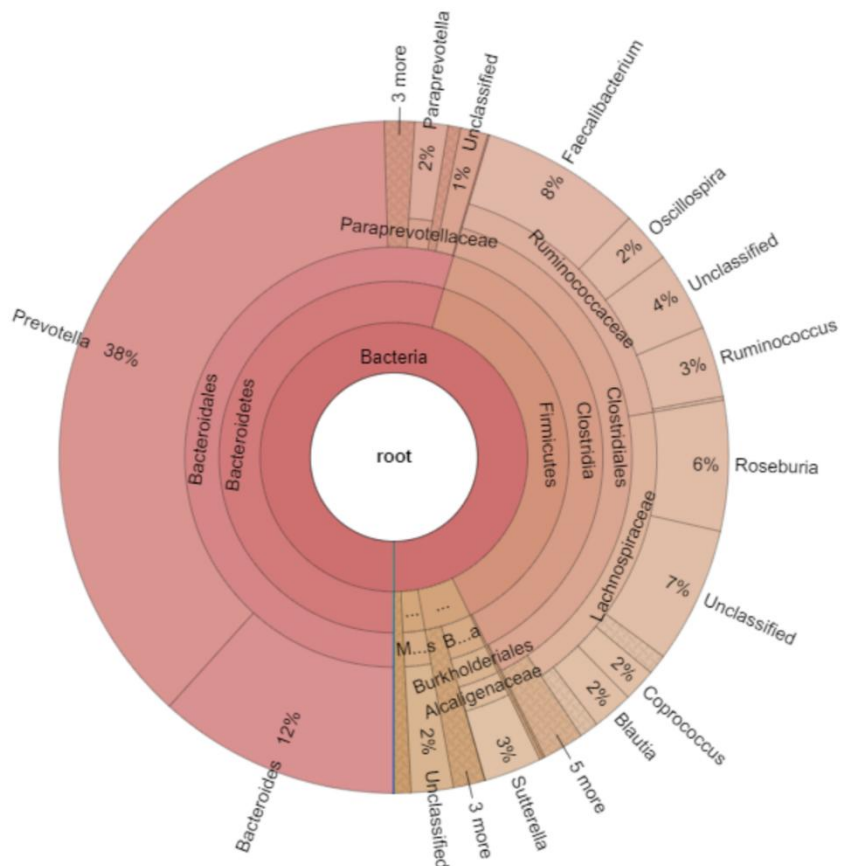
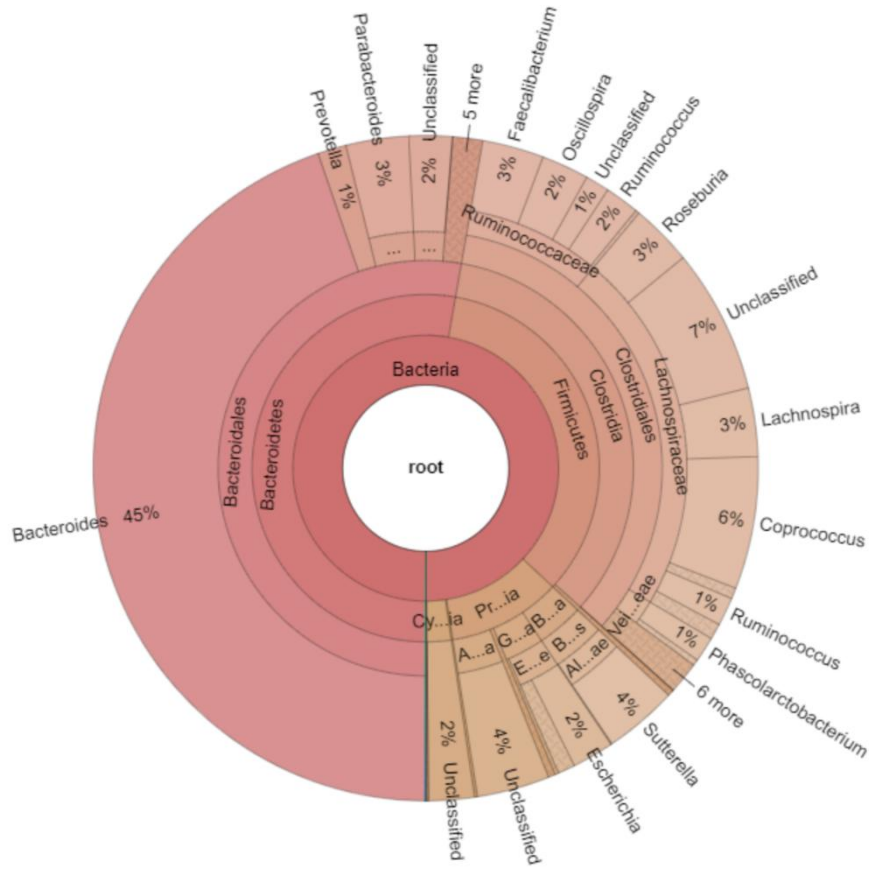
Phụ lục 5: Thành phần và độ phong phú của quần thể vi khuẩn ở mẫu shotgun metagenomic không tiêu đường C1, C2



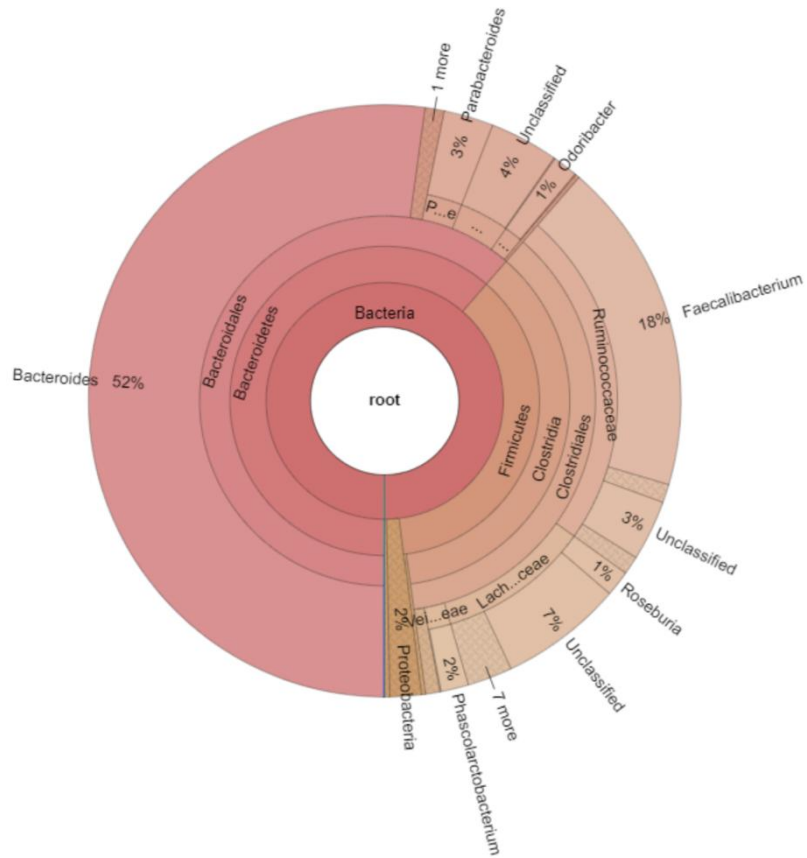
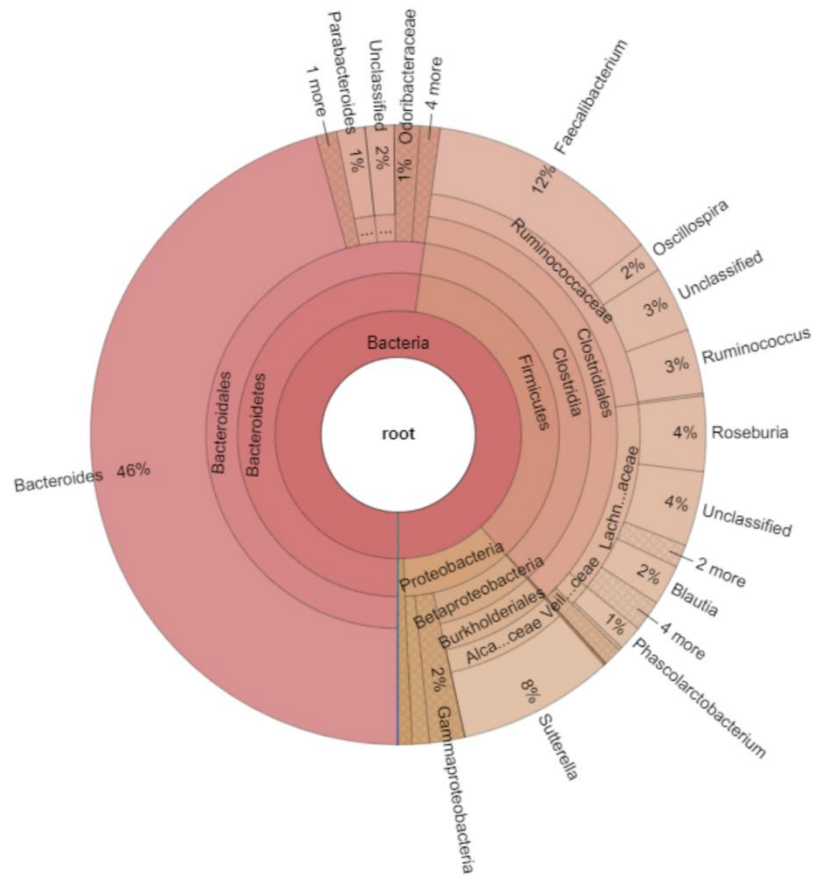
C3, C4



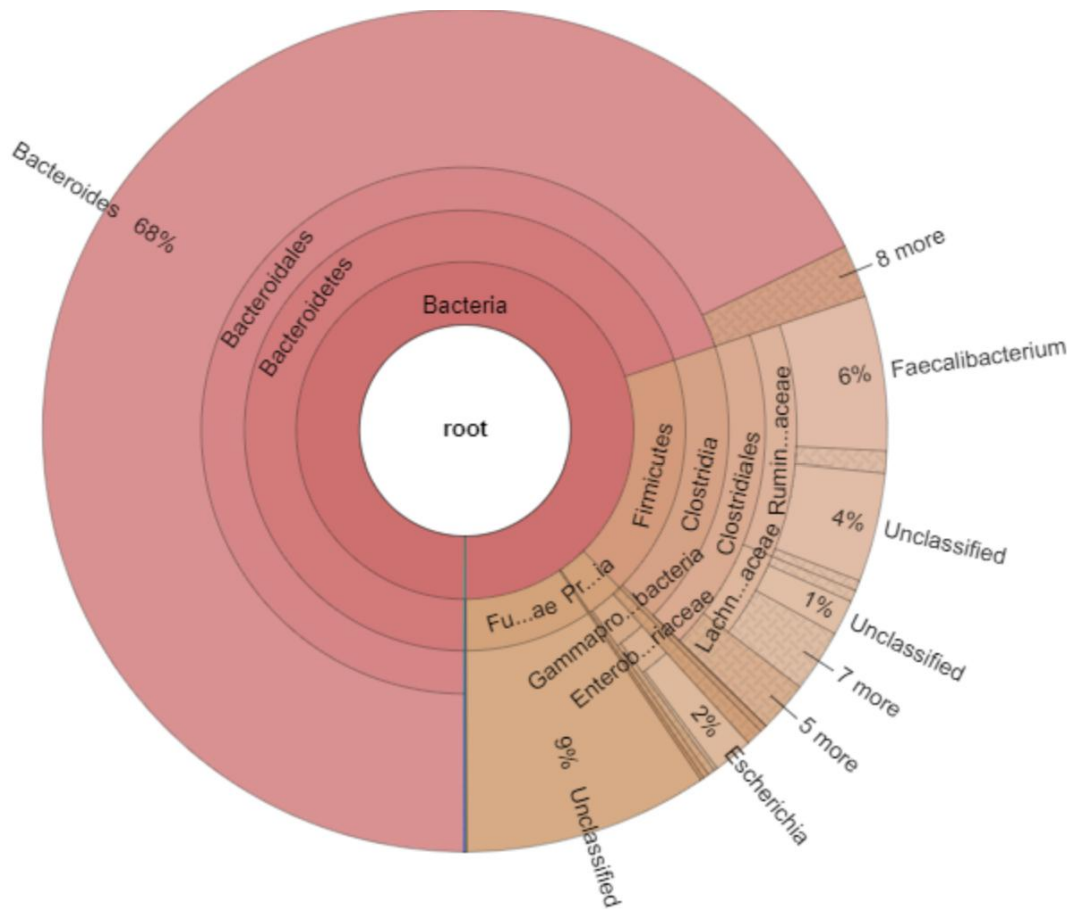
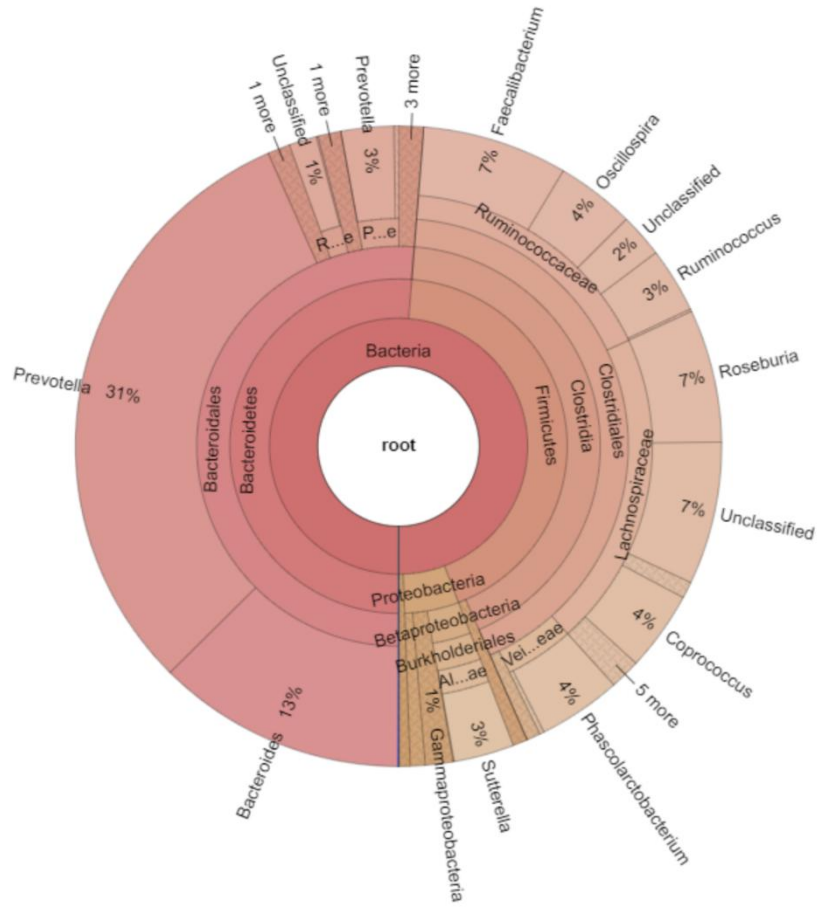
C5, C6



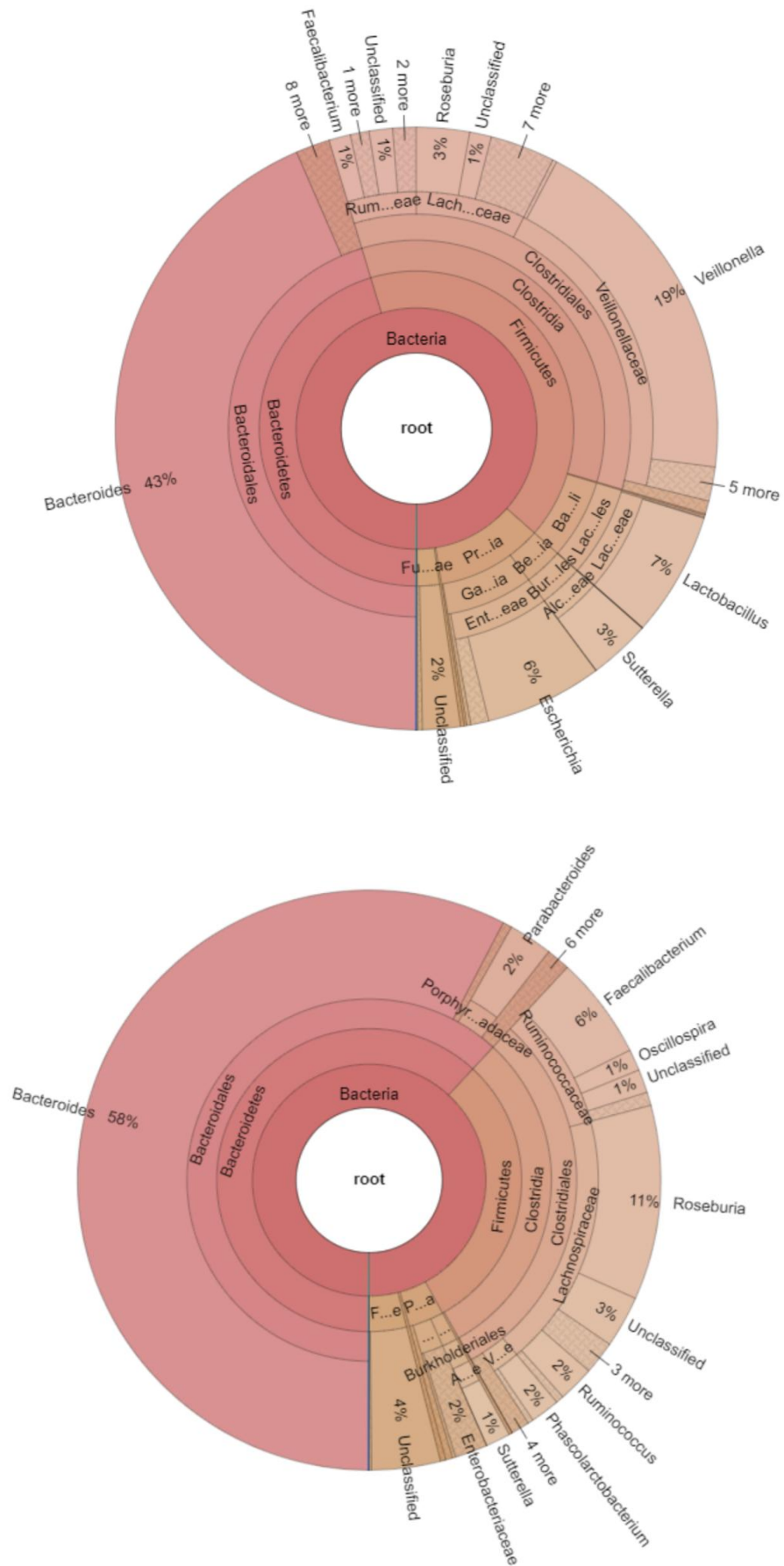
C7, C8



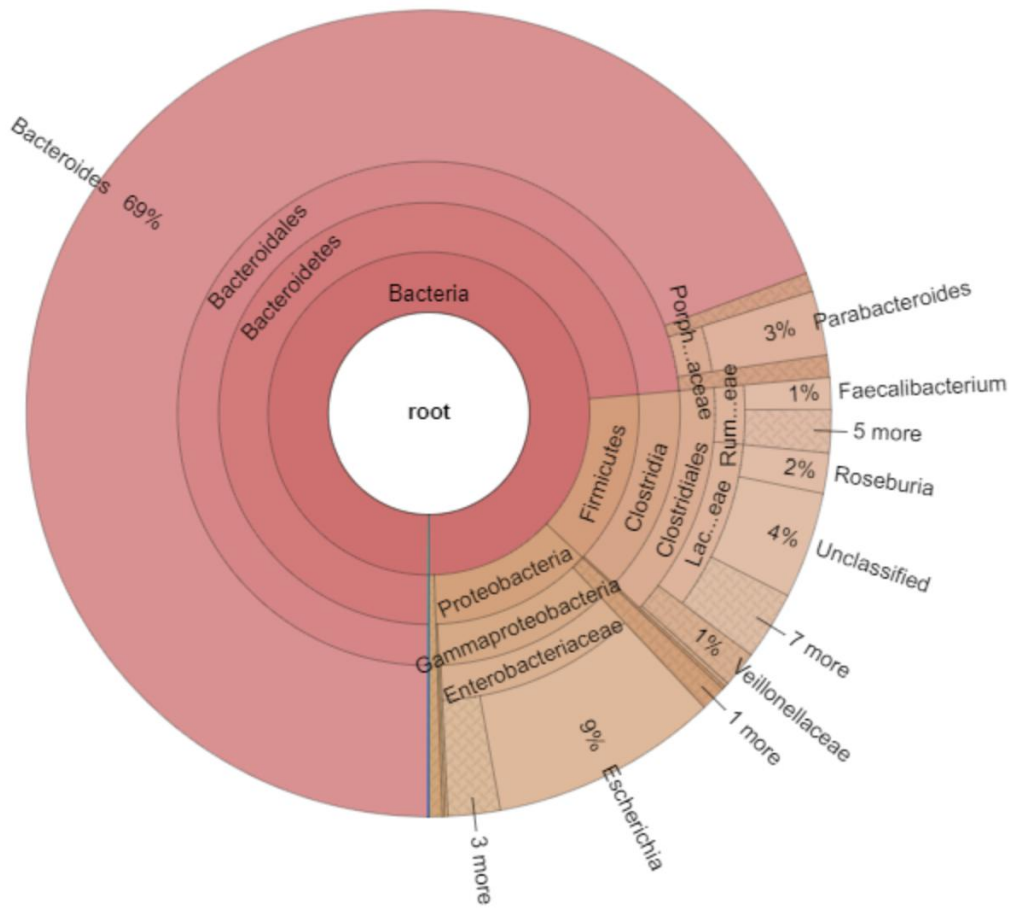
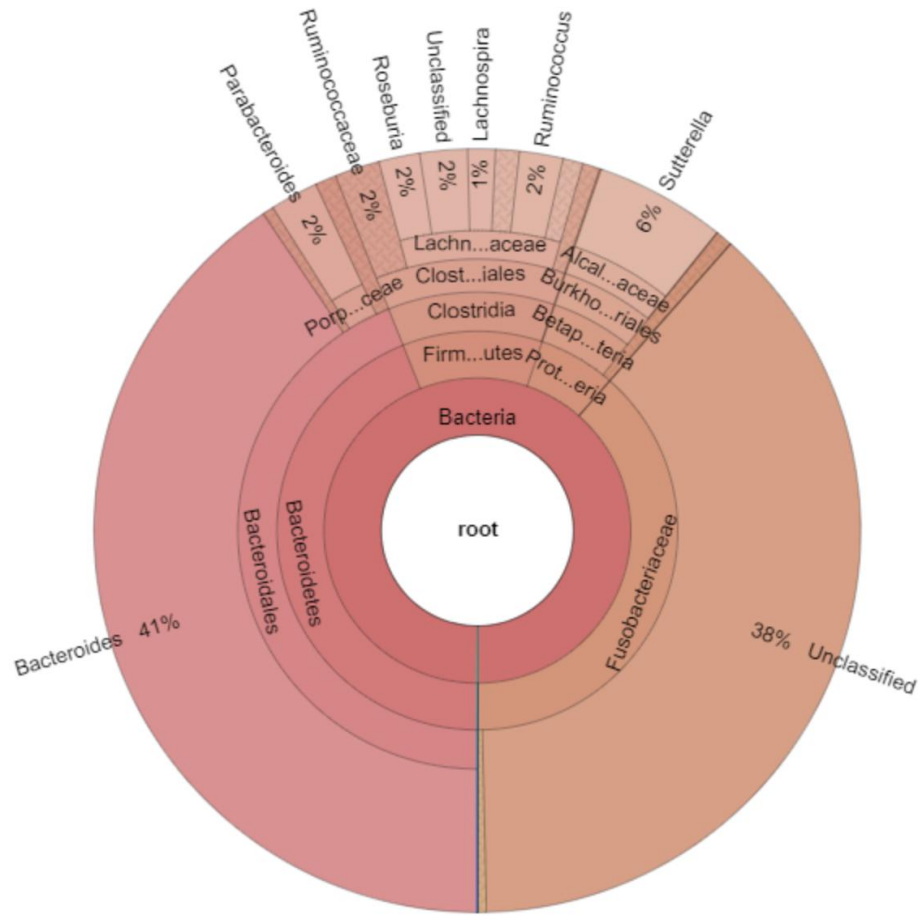
C9, C10



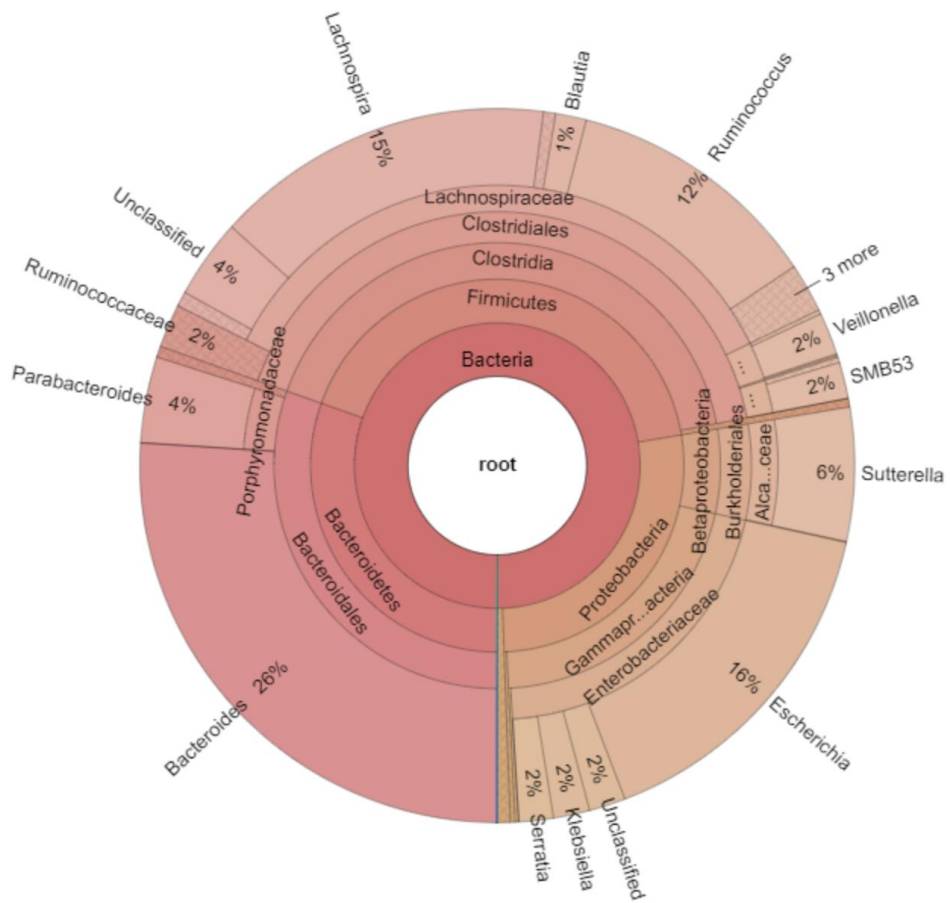
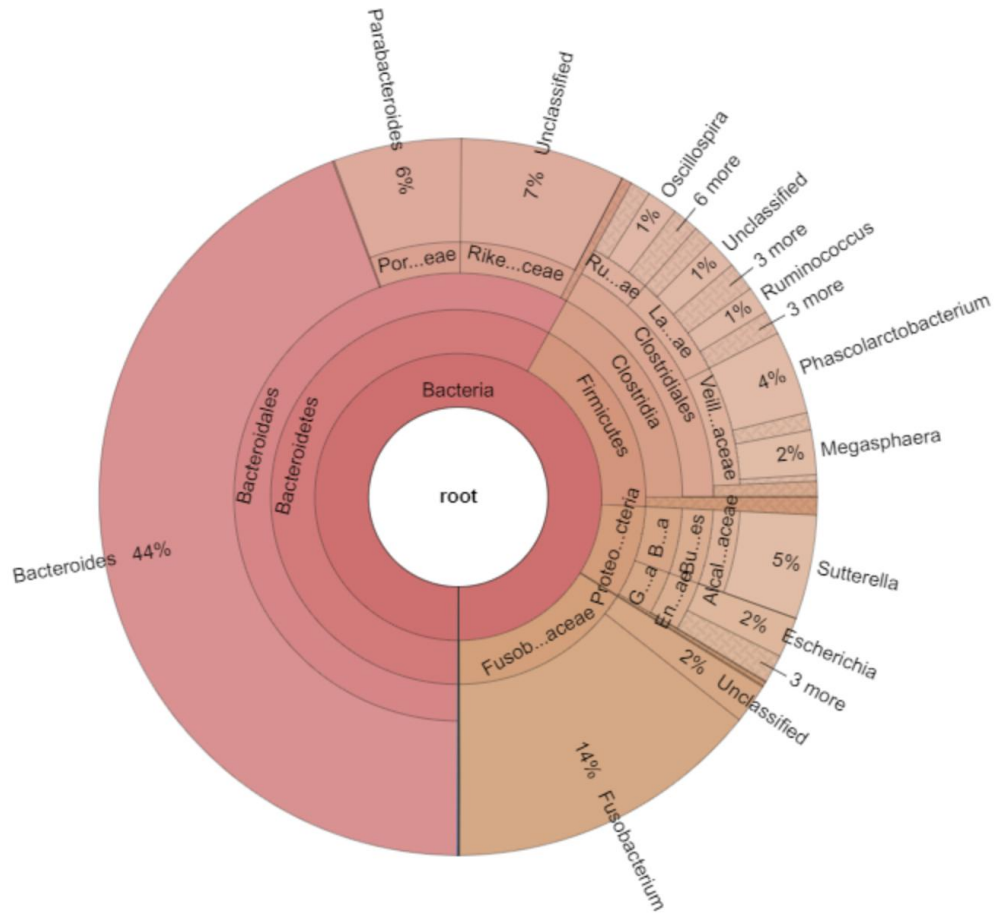
Phụ lục 6: Thành phần và độ phong phú của quần thể vi khuẩn ở mẫu shotgun metagenomic mắc bệnh tiêu đường type 2
D1, D2



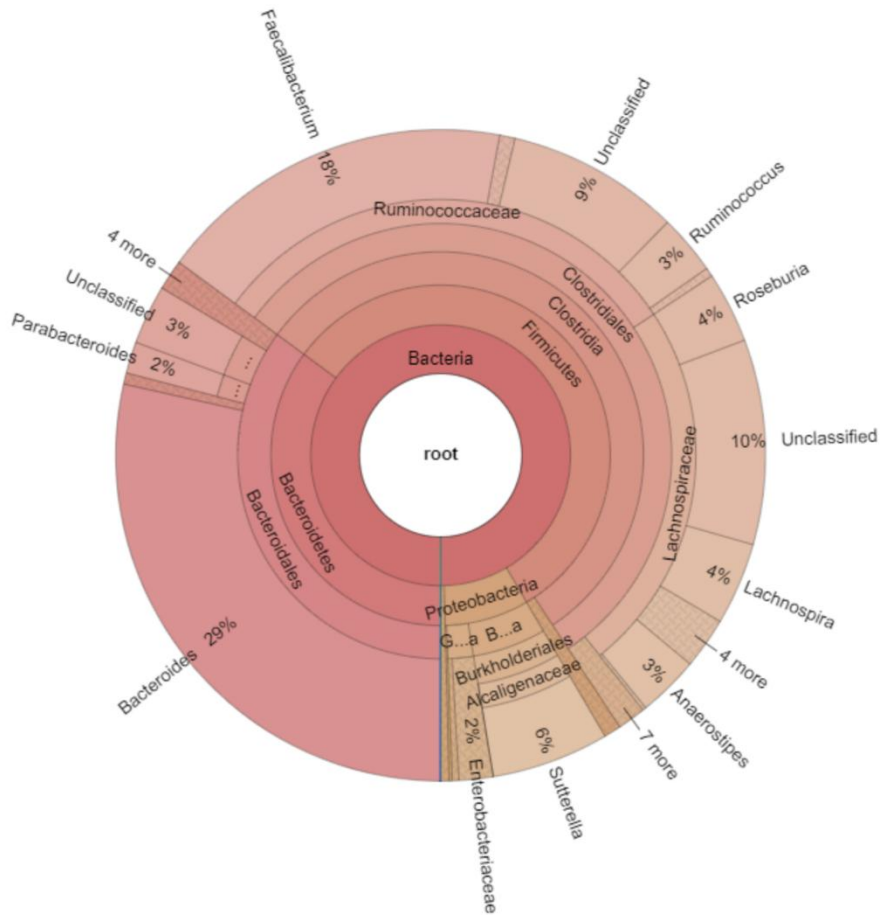
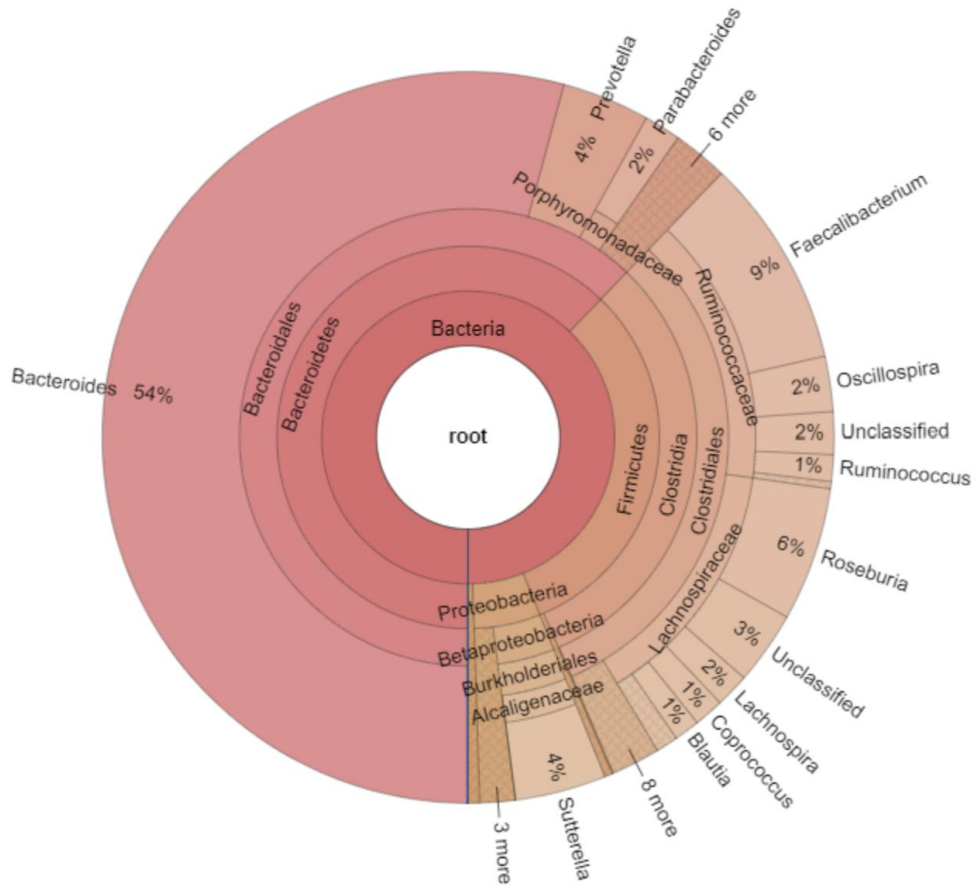
D3, D4



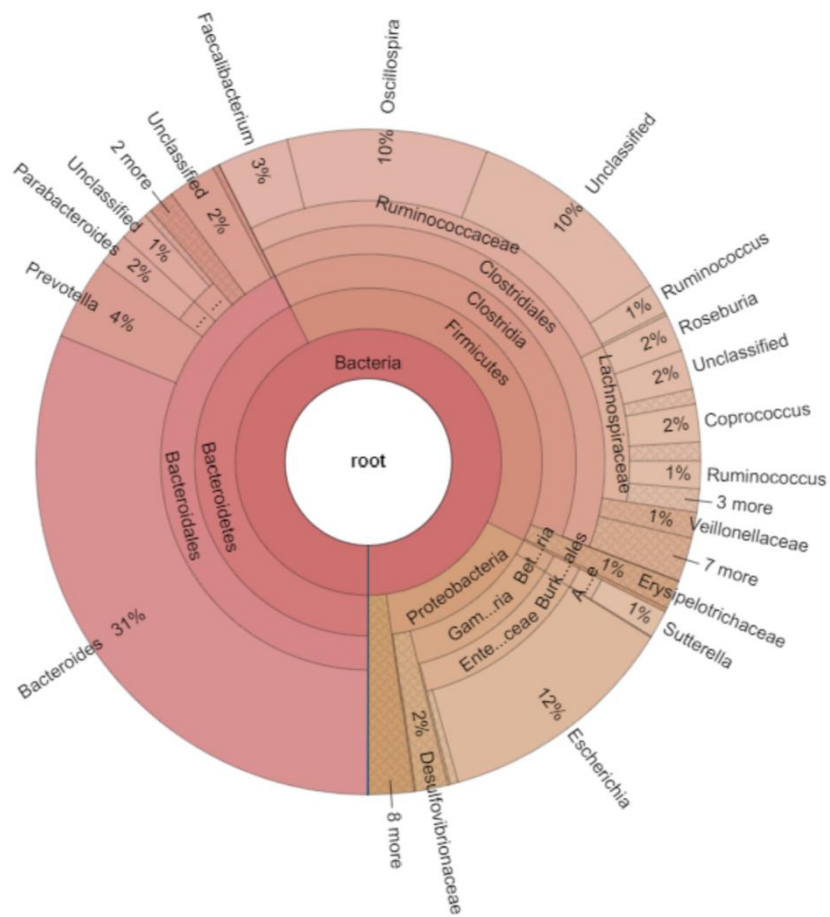
D5, D6



D7, D8



C9, C10



Phụ lục 7: Trình tự cụ thể của các OTU thuộc nhóm vi sinh vật có khả năng liên quan đến bệnh tiêu đường type 2

Các OTU thuộc *Lactobacillus*

>OTU_(k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__)

TAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGGTG
AGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACAC
GTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGagagTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATG
TGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTT
GAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGT
AGATatataGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACT
GACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG

>OTU_(k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus;s__salivarius)

TAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGGTG
AGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAC
GAGTGAGAGTAACTGTTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACTGGAAGAC
TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATatataGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTctctGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGG

>OTU_(k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus)

TAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGGTG
AGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGT
GCGTGAGAGTAACTGTTTCACGCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTACTTAAGTCTGA

TGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGTGAC
 TTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGC
 GTAGATatGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAA
 CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG

>OTU_(k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillae;g__Lactobacillus;s__agilis)

TAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
 AGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAT
 GCAGGAGAGTAACTGTTCTTGTATTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG
 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGA
 TGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAATTGCATTGGAAACTGGAGGAC
 TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC
 GTAGATatGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTctctGGTCTGTAAC
 TACTGACGCTGAGGTTTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGG

>OTU_(k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillae;g__Lactobacillus;s__zeae)

TAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
 AGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGG
 TCGGCAGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA
 TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTttttAAGTCTGATG
 TGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACT
 TGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
 TAGATatGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC
 TACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG

>OTU_(k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillae;g__Lactobacillus;s__brevis)

TAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTG
 AGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACAC
 CTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG

TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTttttAAGTCTGATG
 TGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTT
 GAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGT
 AGATatataGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTA
 ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG

Các OTU thuộc *Bifidobacterium*

>OTU_(k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__
 Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium;s__)

TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
 GCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTGATCGGGAGCAAGC
 CTTCGGGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
 TAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCT
 TAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAGTGCGGTAGGGG
 AGACTGGAATCCCGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGA
 ACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGC
 GAAAGCGTGGG
 GAGCGAACAGG

>OTU_(k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__
 Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium;s__longum)

TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
 GAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTATCGGGGAGCAAGC
 GAGAGTGAGTTTACCCGTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA
 AAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTA
 ACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGCGGTAGGGGAG
 ACTGGAATCCCGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACA
 CCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGA
 AAGCGTGGGGAGCGAACAGG

>OTU_(k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Bifidobacteriales;f__
 Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium;s__)

TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
 GCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTGATCGGGAGCAAGC
 CTCGGGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
 TAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCT
 TAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAGTGCGGTAGGGG
 AGACTGGAATTCGCGGTGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGA
 ACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGC
 GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG

Các OTU thuộc *Faecalibacterium*

>OTU_(k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococ
 aceae;g__Faecalibacterium)

TGGGGAATATTGCACAATGGgggAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
 GAGGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAACTCCTGTCGTTGAGGACGATAAT
 GACGGTACTCAACAAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
 GGTA AACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGG
 GAGCGCAGGCGGAAGCGCAAGTTGGATGTGAAACCCATGGGCTCAACC
 CATGGCCTGCATCCAAA ACTGTGTTTCTTGAGTAGTGCAGAGGTAGGCG
 GAATTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCA
 GTGGCGAAGGCGGCCTACTGGGCACCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAG
 CATGGGTAGCAAACAGG

>OTU_(k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococ
 aceae;g__Faecalibacterium;s__prausnitzii)

TGGGGAATATTGCACAATGGgggAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
 GAGGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAAT
 GACGGTACTCAACAAGGAAGTGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
 GGTA AACGTAGGTCACAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGG
 AGCGCAGGCGGGAGAACAAGTTGGAAGTGAAATCCATGGGCTCAACCC
 ATGAACTGCTTTCAA AACTGTTtttCTTGAGTAGTGCAGAGGTAGGCGGAA
 TTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGG
 CGAAGGCGGCCTACTGGGCACCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTGTG
 GG TAGCAAACAGGA