

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

MAI THỊ NGỌC LAN THANH

**ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM KHÁNG *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS KHÁNG METHICILLIN (MRSA) CỦA MỘT SỐ
DƯỢC LIỆU THU HÁI TẠI TỈNH BÌNH DƯƠNG**

Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh học
Mã số chuyên ngành: 62420201

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

TP. HỒ CHÍ MINH – NĂM 2022

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn 1: PGS. TS Trương Vũ Thanh

Người hướng dẫn 2: TS. Hoàng Anh Hoàng

Phản biện độc lập 1:

Phản biện độc lập 2:

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án họp tại

.....
.....

vào lúc giờ ngày tháng năm

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Tạp chí quốc tế

1. **Mai, T. T. N. L.**, Hoang, H. A., and Truong, T. V., “Antibacterial Activity of Tram Tron *Syzygium Glomerulatum* Extract against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*,” Chemical Engineering Transactions, vol. 78, pp. 235-240, 2020.

Tạp chí trong nước

1. **Mai, T. T. N. L.**, Phung, T. M., Nguyen, V. T., Hoang, H. A., Truong, T. V., “Hoạt tính kháng khuẩn của phân đoạn ethylacetate từ cao ethanol Trâm Tròn (*Syzygium glomerulatum*) trên chủng *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA)”, Tạp Chí Y học dự phòng, Tập 29, số 2, trang 120-128, 2019.
2. **Mai, T. T. N. L.**, Hoang, H. A., and Truong, T. V., “ Hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) của cao chiết ethanol thực vật bản địa tại Bình Dương”, Tạp Chí Công Thương, số 7, trang 324-332, 2019.

Kỹ yếu hội nghị trong nước

1. **Mai Thị Ngọc Lan Thanh**, Dương Chí Ái, Lý Hoàng Giáp, Hoàng Anh Hoàng, Trương Vũ Thanh, “Hoạt tính kháng sự hình thành Biofilm trên chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* từ cao phân đoạn Ethyl acetate Trâm Tròn (*Syzygium Glomeratum*)”, Hội Nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc, Viện Công nghệ sinh học-Đại học Huế, 2020.
2. **Mai Thị Ngọc Lan Thanh**, Huỳnh Tấn Hưng, Nguyễn Sang, Nguyễn Thảo Vy, Hoàng Anh Hoàng, Trương Vũ Thanh, “Xác định hoạt tính kháng khuẩn, kháng độc tính và kháng biofilm trên chủng *Staphylococcus aureus* của cao phân đoạn ethyl acetate cây cò ke (*Grewia asiatica* L)” , Hội Nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc, Viện Công nghệ sinh học-Đại học Huế, 2020.

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Tụ cầu vàng kháng methicillin (*Staphylococcus aureus* kháng methicillin-MRSA) là một vấn đề y tế toàn cầu, một thách thức trong điều trị [1]. MRSA có cơ chế kháng với kháng sinh nhóm β -lactam như methicillin và penicillin làm cho các bệnh nhiễm trùng do MRSA rất khó điều trị [2]. Năm 2014, cơ quan nghiên cứu y tế và chất lượng Hoa Kỳ (AHRQ) đã công bố gần 375.000 trường hợp nhiễm trùng và 23.000 trường hợp tử vong ở Hoa Kỳ có liên quan đến nhiễm MRSA. Chi phí điều trị cho một vết mổ sâu bị nhiễm MRSA, ước tính khoảng 43.970 USD cho một bệnh nhân từ 65 tuổi trở lên ở Hoa Kỳ [3] với thời gian điều trị dài, kèm theo những thương tật [3, 4]. Nghiên cứu ở 10 nước châu Á chỉ ra tỷ lệ tử vong 30 ngày liên quan viêm phổi bệnh viện dao động từ 18,7 % đến 40,8 %, MRSA chiếm 82,1 % trong tổng số các chủng *S. aureus* phân lập [5]. Năm 2017, WHO đã công bố danh sách các mầm bệnh, các kiểu hình kháng kháng sinh ưu tiên nghiên cứu và phát triển các phương pháp điều trị mới, được phân chia thành ba mức độ ưu tiên là quan trọng, cao và trung bình. Trong đó, MRSA được xếp vào nhóm quan trọng ưu tiên toàn cầu để nghiên cứu và phát triển các phương pháp điều trị mới [6].

S. aureus có nhiều yếu tố độc lực, là nguyên nhân gây ra hàng loạt các bệnh về nhiễm trùng da, nhiễm trùng máu, viêm phổi, viêm khớp. Chủng vi khuẩn này còn gây ngộ độc thực phẩm và gây hội chứng sốc độc tố do tạo siêu kháng nguyên trong máu [7]. *S. aureus* có nhiều yếu tố độc lực kháng lại phản ứng miễn dịch của vật chủ, bao gồm các protein bề mặt tế bào, các enzyme ngoại bào và ngoại độc tố.

Một đặc điểm quan trọng khác của chủng *S. aureus* là khả năng hình thành màng sinh học (biofilm). Màng sinh học được tạo bởi các vi sinh vật sống bám dính và liên kết với nhau trên bề mặt cơ chất [8]. Sự hình thành màng sinh học

có vai trò rất quan trọng trong tồn tại, kháng lại kháng sinh, trốn tránh hệ miễn dịch vật chủ của vi khuẩn [9]. Màng sinh học và các thành phần bao quanh bên ngoài màng có vai trò như một trở ngại vật lý góp phần cho cơ chế kháng thuốc và ngăn chặn xâm nhập của tế bào miễn dịch. Các độc tố được tiết ra từ màng sinh học của *S. aureus*, bao gồm cả độc tố α (Hla) và LukAB, ức chế chức năng diệt vi khuẩn của đại thực bào và gây chết tế bào [10].

Vancomycin được xem là tiêu chuẩn vàng cho điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do MRSA [11]. Tuy nhiên, các chủng MRSA kháng vancomycin (VRSA) chiếm tỉ lệ 6,1% đã được báo cáo [12]. Hơn nữa trong khoảng 30 năm trở lại đây, các nhà khoa học chưa thực sự thành công trong việc tìm ra loại kháng sinh mới, mà chủ yếu là các dạng sửa đổi (modify) dựa vào khung nguyên bản của thuốc kháng sinh thế hệ cũ.

Đứng trước các thực trạng nói trên, việc tìm kiếm các nguồn kháng sinh mới hoặc các phương pháp mới để kiểm soát vi khuẩn kháng kháng sinh, đặc biệt dạng siêu kháng thuốc là hết sức cấp bách [13].

Một trong những phương pháp có khả năng kháng vi khuẩn kháng kháng sinh là sự kết hợp các hợp chất thực vật với các kháng sinh [14]. Hoặc kết hợp các hợp chất thực vật với nhau [15].

Việt Nam có một hệ sinh thái phong phú và đa dạng, có tiềm năng về tài nguyên cây thuốc. Thực vật dùng làm thuốc trong điều trị các bệnh cấp tính và mãn tính đã và đang được sử dụng từ xa xưa theo các đơn thuốc y học cổ truyền. Trong đó, hoạt tính kháng khuẩn của các loài thực vật được chú ý [16].

Bình Dương với 698 loài cây thuốc đã được phát hiện, trong đó có 140 loài cây thuốc quý điều tra từ vốn tri thức bản địa tỉnh đã được báo cáo theo Trần Công Luận và cộng sự với đề tài “Điều tra khảo sát tình hình cây thuốc tỉnh Bình Dương” nhiều loài có tác dụng kháng khuẩn [17].

Xuất phát từ những nguyên nhân nói trên, đề tài: “Đánh giá đặc điểm kháng *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA) của một số dược liệu thu hái tại tỉnh Bình Dương” đã được tiến hành thực hiện.

2. Mục tiêu đề tài, đóng góp mới về mặt khoa học và thực tiễn

2.1. Mục tiêu đề tài

Sàng lọc cao ethanol toàn phần thực vật thu hái tại tỉnh Bình Dương kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA).

Xác định được cấu trúc phân tử của hoạt chất chính trong nhóm hoạt chất thực vật.

Xác định công thức hợp lực của nhóm hợp chất thực vật và cơ chế kháng MRSA.

2.2. Ý nghĩa khoa học và tính mới của luận án

Bốn loài thực vật ở Bình Dương gồm Trâm Tròn, Xăng Mã, Ngành Ngành Nam, Cò Ke được báo cáo hoạt tính kháng MRSA ATCC33591 lần đầu.

Tinh chất dimethyl pinocembrin được thu nhận lần đầu từ chi Trâm (*Syzygium*), tinh chất pinostrobin được thu nhận từ *Syzygium glomeratum* với hiệu suất chiết 12,5 mg pinostrobin trong 1g bột lá khô.

Xác định công thức phối hợp giữa cao phân đoạn thực vật với kháng sinh.

Trong đó, cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam hợp lực với kháng sinh cefoxitin, giảm 512 lần giá trị MIC kháng sinh.

Xác định tỉ lệ nồng độ phối hợp giữa pinostrobin với kháng sinh vancomycin là 12,8 pinostrobin:0,5 vancomycin ($\mu\text{g/mL}$).

Các cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn, Ngành Ngành Nam, Cò Ke có khả năng ức chế sự hình thành màng sinh học trên chủng MRSA.

Cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn có hoạt tính kháng MRSA với đích tác động là yếu tố tổng hợp vách.

Đích tác động của cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam trên MRSA là vách tế bào.

Cao phân đoạn ethylacetate Xăng Mã có khả năng ức chế tan huyết trên chủng MRSA.

2.3. Ý nghĩa thực tiễn

Luận án góp phần tìm ra giải pháp kháng MRSA như: Bước đầu xác định được hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết/phân đoạn/tinh chất từ ba loài thực vật ở Việt Nam. Ngoài ra, các khả năng hợp lực khác nhau: phân đoạn - kháng sinh, tinh chất - kháng sinh, phân đoạn - phân đoạn được chứng minh có hiệu quả và góp phần kiểm soát MRSA trong thực tiễn.

3. Cấu trúc luận án: Luận án gồm có 4 chương. Mở đầu. Chương 1 Tổng quan. Chương 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu. Chương 3 Kết quả và biện luận. Chương 4 Kết luận và kiến nghị.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1 Tổng quan về MRSA

1.2 Tổng quan về kháng sinh sử dụng trong điều trị các bệnh nhiễm MRSA

1.3 Cao chiết/phân đoạn/tinh chất kháng MRSA

1.3.1. Tóm lược các nghiên cứu

1.3.2. Các đích tác động của cao chiết/tinh chất

1.4. Tổng quan về thực vật

1.4.1. Ngành Ngạnh Nam

1.4.2. Xăng Mã

1.4.3. Trâm Tròn

1.4.4. Cò Ke

1.4.5. Kim Vàng

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu, hoá chất thí nghiệm

MRSA ATCC 33591, MSSA ATCC 6538. Các mẫu dược liệu gồm Ngành

Ngạnh Nam, Xăng Mã, Trâm Tròn, Cò Ke, Kim Vàng được thu mẫu tại Thành Phố Thủ Dầu Một, Tỉnh Bình Dương (định vị: 11°00'33.02'' phía bắc, 106°39'00.37'' phía đông, độ cao 11m±3m)

2.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu của luận án được chia làm 3 phần: Phần 1. Thu nhận cao chiết/phân đoạn/tinh chất. Phần 2. Đánh giá khả năng kháng khuẩn MRSA của cao chiết/phân đoạn/tinh chất. Phần 3. Cơ chế tác động kháng khuẩn của phân đoạn/tinh chất. Đồng thời, thử nghiệm khả năng gây độc tế bào của cao chiết trên hai dòng tế bào nguyên bào sợi và tế bào ung thư gan.

2.2.1 Thu nhận cao chiết/phân đoạn/tinh chất: Mục đích của phần nghiên cứu này là thu nhận cao thực vật, phân đoạn cho hoạt tính kháng MRSA. Sau đó tiến hành tách tinh chất chính từ cao thực vật cho hoạt tính kháng MRSA tốt nhất.

2.2.2 Đánh giá khả năng kháng MRSA của cao chiết/phân đoạn/tinh chất
Mục đích của phần nghiên cứu này xác định cao thực vật kháng MRSA, xác định giá trị MIC của cao phân đoạn, thử nghiệm thời gian diệt khuẩn của cao phân đoạn. Đồng thời tách tinh chất từ cao thực vật cho hoạt tính kháng MRSA tốt nhất. Sau đó tiến hành đánh giá khả năng hợp lực của phân đoạn với kháng sinh, phân đoạn với phân đoạn, tinh chất với kháng sinh.

2.2.3 Cơ chế tác động kháng khuẩn của phân đoạn/tinh chất.

Mục đích của phần nghiên cứu này nhằm chứng minh đích tác động của phân đoạn/tinh chất trên chủng MRSA

2.2.4 Phương pháp xử lý số liệu

IC50 được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism với phương pháp hồi quy không tuyến tính đa thông số và $R^2 > 0.9$. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và được xử lý bằng phần mềm STATGRAPHICS Centurion XV.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1 Thu cao ethanol toàn phần thực vật, khảo sát hoạt tính kháng MRSA của cao ethanol toàn phần thực vật, và độc tính tế bào của cao.

Bảng 3.1. Các cao ethanol toàn phần thực vật cho hoạt tính kháng MRSA

Stt	Tên Thực Vật		Bộ Phận Sử Dụng	Kích thước vòng vô khuẩn (mm)±SD
	Tên Thông Thường	Tên Khoa Học		
1	Trâm Tròn	<i>Syzygium Glomerulatum</i>	Lá và cành non	9,5±0,5
2	Cò Ke	<i>Grewia Asiatica L.</i>	Lá và cành non	7,0±0,0
3	Xăng Mã	<i>Carallia Brachiata</i>	Lá và cành non	11,5±0,5
4	Ngành Ngành Nam	<i>Cratoxylum Cochinchinense</i>	Lá và cành non	10,3±0,3

Bốn cao ethanol toàn phần từ Trâm Tròn, Xăng Mã, Ngành Ngành Nam, Cò Ke lần đầu tiên báo cáo hoạt tính kháng MRSA.

Bảng 3.2. Phần trăm gây độc tế bào của các mẫu cao trên dòng tế bào ung thư gan Hep G2 và nguyên bào sợi được xác định bằng phương pháp SRB

Dòng tế bào	Mẫu	Phần trăm gây độc tế bào (%)			
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB ± ĐLC
Hep G2	SCTTED (100µg/ml)	36.20	35.60	26.62	32.81 ± 5.36
Fibroblast cell	SCTTED (100µg/ml)	36.17	36.40	39.53	37.37 ± 1.88
Hep G2	NN ED (100µg/ml)	3,20	-0,32	-5,86	-0,99 ± 4,57
Fibroblast cell	NN ED (100µg/ml)	-1,28	-2,09	3,72	0,12 ± 3,15
Hep G2	CK ED (200µg/ml)	-8,50	-5,38	3,66	-3,41 ± 6,32
Fibroblast cell	CK ED (200µg/ml)	1,94	1,12	7,53	3,53 ± 3,49
Hep G2	XM ED (200µg/ml)	-19,50	-	-5,49	-13,46 ± 7,20
Fibroblast cell	XM ED (200µg/ml)	5,81	15,38	12,90	9,23 ± 3,55

TB, ĐLC: trung bình, độ lệch chuẩn

Các cao ethanol toàn phần Ngành Ngạnh Nam, Trâm Tròn nồng độ 0,1 mg/mL; cao ethanol toàn phần Xăng Mã, Cò Ke ở nồng độ 0,2 mg/mL khả năng gây chết trên hai dòng tế bào khảo sát dưới 50 %, chứng tỏ các cao ethanol toàn phần Ngành Ngạnh Nam, Trâm Tròn, Xăng Mã, Cò Ke có tiềm năng sử dụng trong liệu pháp kháng khuẩn vì không gây độc tế bào.

3.2 Thu cao phân đoạn và hoạt tính kháng MRSA của cao phân đoạn

a) Thu cao phân đoạn

Hiệu suất của quá trình chiết từ bốn cao ethanol thực vật được trình bày ở Bảng 3.5 Kết quả hiệu suất chiết cao nhất đối với cao ethanol Trâm Tròn, thấp nhất là quá trình chiết cao ethanol Xăng Mã. Tuy nhiên, tất cả các cao ethanol thực vật đều cho phân đoạn ethyl acetate cao hơn phân đoạn hexan.

b) Xác định hoạt tính kháng MRSA của cao phân đoạn

Các phân đoạn chiết được tiến hành khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa. Sau đó, các phân đoạn tiếp tục được xác định giá trị MIC bằng phương pháp vi pha loãng trên đĩa 96 giếng, kết quả được trình bày ở Bảng 3.6, xác định phân đoạn ethyl acetate của Trâm Tròn cho hoạt tính kháng khuẩn cao nhất với giá trị MIC thấp nhất là 0,5 mg/ml đối với chủng MSSA và 1,0 mg/ml đối với chủng MRSA.

Bảng 3.3. Giá trị MIC của phân đoạn

Tên Thực Vật	Phân Đoạn	Giá Trị MIC (mg/mL)	
		MSSA	MRSA
Ngạnh Ngạnh Nam	Hexan	-	-
	Ethylacetate	1,625	1,625
Trâm Tròn	Hexan	-	-
	Ethylacetate	0,500	1,000
Xăng Mã	Hexan	-	-
	Ethylacetate	2,500	2,500
Cò Ke	Hexan	-	-
	Ethylacetate	2,010	2,010

Sufan và cộng sự. (2013) [47] đã chỉ ra rằng chiết xuất cho thấy giá trị MIC thấp hơn 1 mg/mL được coi là đáng chú ý. Đồng thời, theo nghiên cứu Carolina Santiago và cộng sự (2015) [49] chỉ ra nồng độ 0,75 mg/ml được xem là có giá trị tiềm năng trong nghiên cứu các hoạt chất kháng khuẩn. Điều này có thể chứng minh hoạt tính kháng khuẩn kháng thuốc của các cao chiết phân đoạn từ Trâm Tròn, Xăng Mã, Ngành Ngành Nam và Cò Ke là có tiềm năng trong nghiên cứu ứng dụng điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do chủng *S. aureus* gây ra.

c) Thử nghiệm Time-Killing của hai cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam, Trâm Tròn trên hai chủng MSSA và MRSA

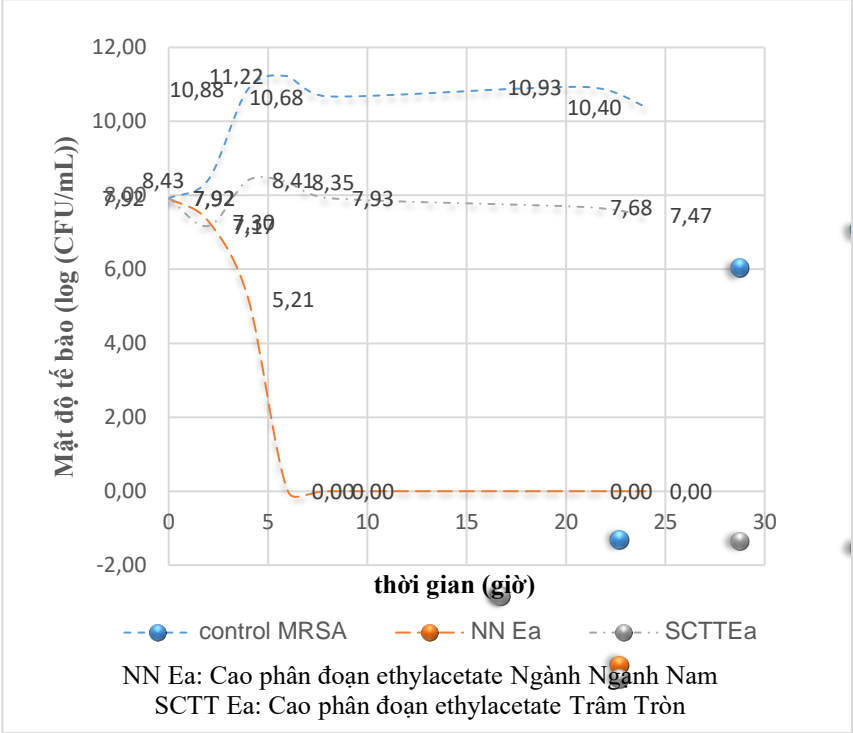
Giá trị MIC của các cao phân đoạn cho hoạt tính kháng MRSA đã được xác định. Tuy nhiên, thời gian diệt khuẩn của cao phân đoạn và đặc điểm của hoạt tính sinh học này chưa được hiểu rõ. Vì vậy, mục đích của thử nghiệm time-killing nhằm xác định thời gian tác động của cao phân đoạn trên chủng MRSA. Trong bốn cao phân đoạn Ngành Ngành Nam, Trâm Tròn, Xăng Mã và Cò Ke, hoạt tính kháng khuẩn MRSA của hai cao phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn và Ngành Ngành Nam là tốt nhất, nên được lựa chọn cho thử nghiệm này.

Kết quả được trình bày ở Hình 3.4.

Kết quả đường cong tăng trưởng đối chứng của chủng MRSA khi không xử lý với cao phân đoạn thì mật độ tế bào vi khuẩn tăng gấp đôi từ giờ thứ 2. Từ giờ thứ 2 đến giờ thứ 6, đường cong tăng trưởng của chủng MRSA tương ứng với pha log. Từ giờ thứ 6 đến giờ thứ 21 là giai đoạn pha ổn định, sau giờ thứ 24 MRSA bước vào pha suy tàn. So với chủng MSSA, thì chủng MRSA có pha ổn định kéo dài hơn.

Khi MRSA được xử lý với cao phân đoạn thì đường cong tăng trưởng có sự khác biệt so với đường cong tăng trưởng chuẩn. Sự khác biệt được thể hiện qua mật độ tế bào giảm hoặc không tăng so với đường cong tăng trưởng đối chứng. Cụ thể, sau 2 giờ nuôi cấy khi môi trường được bổ sung cao phân đoạn

ethylacetate Ngành Ngành Nam ở nồng độ bằng 1,625 mg/mL thì mật độ tế bào vi khuẩn giảm so với mật độ bổ sung ban đầu. Từ giờ thứ 6 đến giờ thứ 24 không phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn. Điều này chứng tỏ cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam là chất diệt khuẩn đối với chủng MRSA.



Hình 3.1. Đường cong tăng trưởng của MRSA trong thử nghiệm time-killing. Đối với cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn, từ giờ thứ 2 trở về sau mật độ tế bào MRSA không tăng so với mật độ tế bào MRSA bổ sung ban đầu, và quá trình ức chế tăng trưởng MRSA kéo dài đến 24 giờ khi trong môi trường TSB bổ sung cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn ở nồng độ bằng 1,000 mg/mL. Kết quả chỉ ra hoạt tính kháng MRSA của cao phân đoạn ethyl Trâm Tròn trên chủng MRSA là hoạt tính ức chế vi khuẩn MRSA, do cao phân đoạn này kéo

dài pha lag trên chủng MRSA.

d) Khảo sát hợp lực giữa cao phân đoạn với kháng sinh cefoxitin

Mối quan tâm của các nhà khoa học trong liệu pháp kháng khuẩn là rút ngắn thời gian nghiên cứu các hợp chất mới, liệu pháp mới. Thay vào đó là các nghiên cứu kết hợp với các nhóm kháng sinh thế hệ cũ đã bị kháng bởi vi khuẩn, nhằm tái sử dụng trong điều trị, giảm chi phí đầu tư cho nghiên cứu, tận dụng nguồn nguyên liệu có sẵn. Đồng thời hạn chế kiểu hình kháng thuốc của vi khuẩn bằng cách kết hợp hướng đến nhiều hơn một mục tiêu trong hoạt tính ức chế vi khuẩn [20]. Việc kết hợp sẽ giảm giá trị MIC của kháng sinh, vì vậy giảm tác dụng phụ do nồng độ sử dụng thấp hơn khi hai chất có tính hợp lực [51, 52].

Bảng 3.4. Chỉ số FIC của phân đoạn ethyl acetate thực vật với cefoxitin

Vi khuẩn	MIC (mg/ml)			FICI	
	SCTT Ea	NN Ea	cefo	SCTTEa-cefo	NN Ea-cefo
MRSA	1	1,625	1,024	0,508	0,312

Ghi chú: NN Ea: cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam; SCTT Ea: cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn; Cefo: kháng sinh cefoxitin.

Dựa vào Bảng 3.4 xác định chỉ số FIC giữa cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn với cefoxitin trên chủng MRSA bằng 0,5. Vậy, công thức hợp lực của cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn với cefoxitin là SCTT Ea ở nồng độ 0,5 mg/mL và cefoxitin ở nồng độ 0,008 mg/mL. Trong đó, nồng độ kháng sinh cefoxitin sử dụng bằng 0,008 mg/ml so với giá trị MIC của cefoxitin một mình trên MRSA bằng 1,024 mg/ml, giảm 128 lần; nồng độ cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn bằng 0,5 mg/mL giảm 2 lần so với giá trị MIC của cao phân đoạn một mình.

Khả năng hợp lực của cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam và cefoxitin được xác định mạnh hơn cả phân đoạn Trâm Tròn thông qua chỉ số FIC bằng 0,312 trình bày trong Bảng 3.4. Công thức hợp lực giữa cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam và cefoxitin là NN Ea ở nồng độ 0,812

mg/mL và cefoxitin ở nồng độ 0,002 mg/mL. Khi hai chất có khả năng hợp lực với nhau thì đích tác động của chúng được xác định là tương đồng. Vì vách tế bào vi khuẩn là đích tác động của cefoxitin, do đó có khả năng cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam có đích tác động là vách tế bào của vi khuẩn MRSA. Hoạt tính kháng MRSA và tái nhạy với kháng sinh nhóm β -lactam trên MRSA khi được xử lý với cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam lần đầu được báo cáo.

Hai cao phân đoạn ethylacetate Xăng Mã và Cò Ke có chỉ số FIC lớn hơn 1 vì vậy không có sự hợp lực giữa hai cao phân đoạn ethylacetate Xăng Mã, Cò ke với cefoxitin trong hoạt tính kháng MRSA.

Như vậy, đề tài đã xác định được hai trong bốn cao thực vật cho hoạt tính hợp lực với kháng sinh cefoxitin trên chủng MRSA ATCC33591 đó là hai cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn, Ngành Ngành Nam.

e) Khảo sát hợp lực giữa cao phân đoạn với kháng sinh vancomycin

Vancomycin được xem là tiêu chuẩn vàng trong điều trị các bệnh nhiễm do MRSA gây ra [58, 59]. Việc sử dụng vancomycin thường xuyên sẽ làm tăng nguy cơ kháng vancomycin đối với các chủng MRSA, và minh chứng là sự xuất hiện của các chủng MRSA kháng với vancomycin đã được báo cáo, đề tài đã lựa chọn hai cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn và Ngành Ngành Nam cho hoạt tính kháng MRSA tốt nhất để khảo sát khả năng hợp lực với vancomycin.

Kết quả xác định cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn có khả năng hợp lực một phần với vancomycin dựa trên chỉ số FIC bằng 0,74. Công thức hợp lực giữa cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn và vancomycin được xác định là nồng độ SCTT Ea ở nồng độ bằng 0,24 mg/mL và vancomycin ở nồng độ bằng 0,001mg/mL (1:1).

Tuy nhiên, cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam với vancomycin có chỉ số FIC bằng 2,00, dựa trên công thức Kuok và cộng sự [45] xác định không

có sự hợp lực trên khả năng ức chế vi khuẩn MRSA.

f) Thử nghiệm khả năng hợp lực của các cao phân đoạn

Các phân đoạn mất hoặc không thể hiện hoạt tính ở những phân đoạn nhỏ hơn. Điều này có thể giải thích rằng các chất chuyển hóa thứ cấp trong thể giới thực vật thường có hoạt tính kháng khuẩn thấp. Nhưng trừ khi có sự xâm nhiễm của vi khuẩn thì thực vật đáp ứng với lại trường hợp bệnh bằng chiến lược hợp lực, các chất trao đổi thứ cấp được tạo ra, tương tác với nhau để kháng lại vi khuẩn gây bệnh [61]. Vì vậy thử nghiệm hợp lực giữa các cao phân đoạn được tiến hành.

Bảng 3.5. Chỉ số FIC của các cao phân đoạn ethyl acetate thực vật trên MRSA

NN Ea	MIC (mg/ml)			FICI			
	XM Ea	CK Ea	SCTT Ea	SCTT Ea- NN Ea	SCTT Ea- XM Ea	SCTT Ea- CK Ea	NN Ea- XM Ea
1,625	2,500	2,01	1	0,2655	0,2578	0,125	0,1562

Dựa vào Bảng 3.5, xác định khả năng hợp lực mạnh của cao phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn với ba cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam, Xăng Mã và Cò Ke trên MRSA thông qua chỉ số FIC nhỏ hơn 0,5. Công thức hợp lực giữa hai cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn và Ngành Ngành Nam là SCTT Ea ở nồng độ 0,015 mg/mL và NN Ea ở nồng độ 0,406 mg/ml.

Công thức hợp lực của hai cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn và Xăng Mã là SCTT Ea ở nồng độ bằng 0,0078 mg/mL và XM Ea ở nồng độ bằng 0,625 mg/mL.

Công thức hợp lực của hai cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn và Cò Ke là SCTT Ea ở nồng độ bằng 0,062 mg/mL và CK Ea ở nồng độ bằng 0,125 mg/mL.

Cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam cho hoạt tính kháng MRSA mạnh sau cao phân đoạn Trâm Tròn, nên phân đoạn này được lựa chọn khảo sát sự hợp lực với cao phân đoạn ethylacetate Xăng Mã. Dựa vào Bảng 3.5. Chỉ số FIC được xác định bằng 0,156, chứng tỏ khả năng hợp lực của hai cao phân

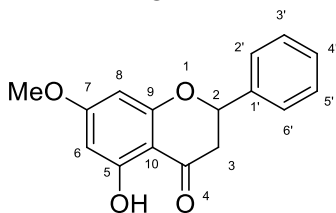
đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam và Xăng Mã. Công thức hợp lực giữa hai phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam và Xăng Mã là NN Ea ở nồng độ bằng 0,06 mg/mL và XM Ea ở nồng độ bằng 0,312 mg/mL.

Trong bốn loài thực vật cho hoạt tính kháng MSSA và MRSA thì cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn với giá trị MIC thấp nhất bằng 1 mg/ml trên chủng MRSA. Do đó, cao ethanol toàn phần Trâm Tròn được lựa chọn để xác định thành phần hóa học chính, đồng thời thu nhận các hợp chất khác hiện diện trong cao ethanol toàn phần làm cơ sở khoa học cho việc sử dụng dược liệu, góp phần nâng cao giá trị loại dược liệu này tại Việt Nam.

3.3 Thu tinh chất và khảo sát hoạt tính kháng MRSA

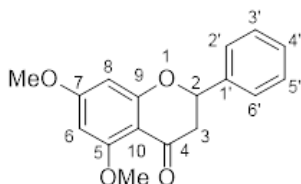
a) Thu nhận tinh chất từ Trâm Tròn

Cao phân đoạn n-hexan (0,2 g) với hệ dung môi n-hexan/EtOAc có tỉ lệ dung môi giải ly tăng 5 % EtOAc trong hexan (0-100 %). Cột silica gel có chiều cao là 9cm, rộng 3,2cm và tốc độ dòng 0,2 mL/phút. Kết quả thu được 20 phân đoạn chính đặt tên là Hex 1 đến Hex 20. Các phân đoạn được định tính khả năng kháng MRSA. Phân đoạn Hex 1 cho hoạt tính kháng MRSA nên được tiếp tục đưa lên cột sắc ký silicagel 60. Cột silica gel có chiều cao là 15,5 cm, rộng 1,6 cm và tốc độ dòng 0,4 mL/phút với hệ dung môi rửa giải n-hexan:CHCl₃ có tỉ lệ 5:5. Sau đó sử dụng phương pháp kết tinh lại bằng CHCl₃ và n-hexan thu được một chất kết tinh hình kim không màu. Dùng TLC để kiểm tra tinh sạch. Tạm gọi chất đó là H1.1 (9 mg). So sánh với dữ liệu NMR và MS có sẵn [164] có thể khẳng định tinh chất này là Pinostrobin.



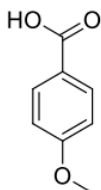
Hình 3.2. Cấu trúc của Pinostrobin

Tiến hành sắc kí cột silica gel phân đoạn Hex 7 với dung môi rửa giải là n-hexan:CHCl₃:EtOAc có tỉ lệ 4:5:1 trên cột silica gel có chiều cao là 16,7cm, rộng 1,6 cm và tốc độ dòng 0,5 mL/phút thu được chất lỏng màu vàng sáng trong dung môi rửa giải. Sử dụng phương pháp kết tinh lại bằng n-hexan và acetone. Thu được một kết tinh màu trắng. Dùng TLC kiểm tra tinh sạch. Tạm gọi chất đó là H7.1 (2mg). Tinh chất được gửi đo NMR để xác định cấu trúc. Sau đó đo khối phổ để xác nhận lại. So sánh với dữ liệu NMR và MS có sẵn có thể khẳng định là dimethyl pinocembrin.



Hình 3.3. Dimethyl pinocembrin hoặc 5,7-dimethoxyflavone

Pha ethylacetate (EtOAc) cũng được phân chia thành các phân đoạn khi cho giải ly bằng lượng dung môi tăng 25% EtOAc (0% - 100%) trong hexane, và tăng 25% MeOH trong EtOAc (0% - 100%), thu được 8 phân đoạn.



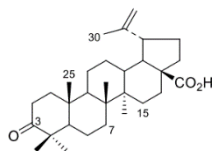
Hình 3.4. Công thức 4-methoxy-benzoic acid

E4.1: Hợp chất này là một dạng tinh thể trắng. Phân đoạn thứ tư của pha EtOAc được giải ly với hệ dung môi 25% n-hexane và 75% EtOAc, phân đoạn này sau đó được đưa lên cột silica gel và giải ly bằng hệ n-hexane:chloroform:Isopropyl alcohol (8:12:1). Cột silica gel có chiều cao là 14,0 cm, rộng 1,6 cm và tốc độ dòng 0,4 mL/phút, thu được 5 mg tinh thể. Kết quả sau đó được gửi đo NMR để xác định cấu trúc. Phổ ¹H-NMR thể hiện các

peak: δ H 8.06 (m, 2H), 6.9 (m, 2H), 3.81 (s, 3H). Và $^{13}\text{C-NMR}$ δ C 171.32, 164.04, 132.37, 132.34, 121.69, 113.78, 113.74, 55.44. Khối phổ có các kết quả 78, 152, 304, 404. Dựa trên các kết quả nhận được bước đầu xác định có nhóm OMe với peak $^1\text{H-NMR}$ ở 3.81 (s, 3H) và $^{13}\text{C-NMR}$ ở 55.44, khối phổ là 31. Ngoài ra, công thức có thể đối xứng. Dựa trên các kết quả đó, xác định hợp chất là 4-methoxy-benzoic acid.

Tinh chất pinostrobin nằm trong tất cả các pha của cao ethanol toàn phần Trâm Tròn. Hiệu suất chiết pinostrobin ở phân đoạn ethyl acetate là 0,2 g thu được 7,3 mg. Như vậy, tổng khối lượng pinostrobin thu được từ hai phân đoạn hexan và ethylacetate bằng $16,1 \pm 0,2$ mg/0,4 g cao phân đoạn.

Phân đoạn thứ bảy của pha EtOAc được giải ly với hệ dung môi 25% EtOAc và 75% MeOH, phân đoạn này sau đó được đưa lên cột silica gel và giải ly bằng hệ n-hexane : ethylacetate (9:1). Cột silica gel có chiều cao là 14,0 cm, rộng 1,6 cm và tốc độ dòng 0,4 mL/phút Thu được 1mg tinh thể, hợp chất này là một dạng tinh thể trắng. Tạm gọi chất đó là E7.1. So sánh với dữ liệu NMR và MS có sẵn có thể khẳng định là acid 3-oxobetulinic acid.



Hình 3.5. Acid 3-Oxobetulinic hoặc acid betulonic

Trong phần thu nhận tinh chất, mục tiêu của luận án là xác định tinh chất chính trong cao ethanol thực vật cho hoạt tính kháng MRSA cao nhất, kết quả đã thu nhận được tinh chất pinostrobin. Ngoài ra, kết quả của luận án còn thu nhận được ba tinh chất khác như dimethyl pinocembrin, acid 3-Oxobetulinic, 4-methoxy-benzoic acid, trong đó dimethyl pinocembrin, 4-methoxy-benzoic acid lần đầu được thu nhận từ chi Trâm.

Tinh chất chính pinostrobin sau khi được phân lập tiếp tục khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa. Tuy nhiên, tinh chất cho hoạt tính kháng MRSA yếu.

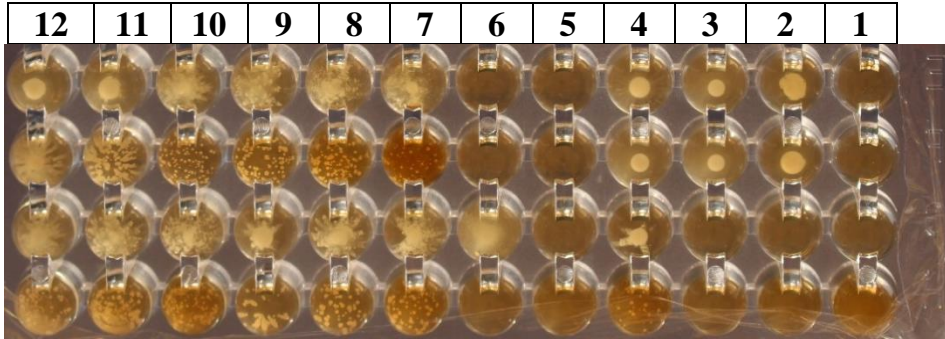
Vì vậy, pinostrobin thu nhận từ cao ethanol toàn phần Trâm Tròn được tiến hành thử nghiệm khả năng hợp lực với kháng sinh vancomycin và cefoxitin.

b) Hoạt tính kháng MRSA của tinh chất pinostrobin.

Thử nghiệm khả năng hợp lực giữa pinostrobin với cefoxitin, vancomycin trên hai chủng MSSA và MRSA được tiến hành. Kết quả xác định pinostrobin có hợp lực với vancomycin nhưng không có hợp lực với cefoxitin.

Chỉ số FIC của pinostrobin và vancomycin bằng 0,5. Công thức hợp lực của pinostrobin và vancomycin là pinostrobin ở nồng độ 12,8 µg/mL và vancomycin ở nồng độ 0,5 µg/mL.

Điều này chứng minh hoạt tính hợp lực của cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn với kháng sinh vancomycin có liên quan đến tinh chất pinostrobin



Hình 3.6 Hợp lực của pinostrobin với vancomycin

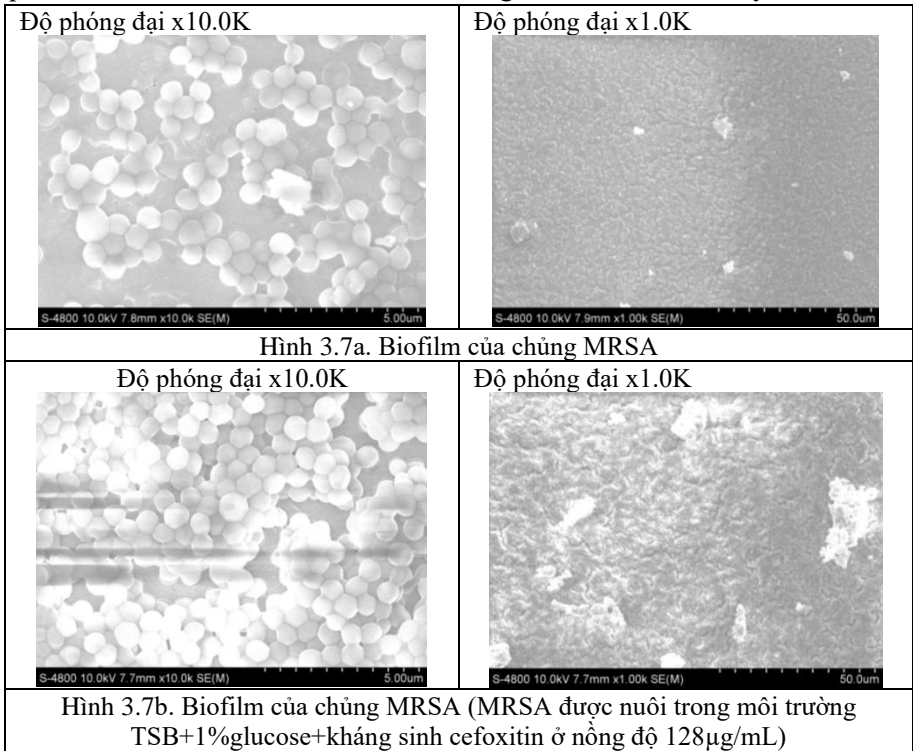
Đề tài đã thực hiện thử nghiệm hoạt tính ức chế sự hình thành biofilm, ức chế tan huyết, khả năng chịu muối và biểu hiện protein PBP2a được tiến hành lần lượt trong nội dung 3.3.

3.4 Cơ chế kháng MRSA của phân đoạn/tinh chất

3.4.1 Ức chế hình thành màng sinh học

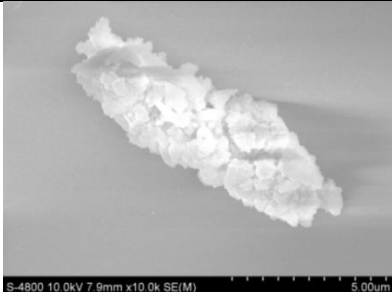

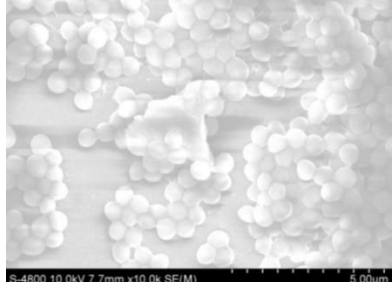
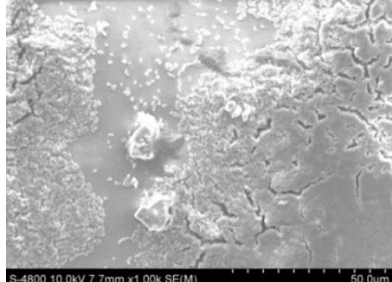
a) Hai phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn và Ngành Ngạnh Nam

Thử nghiệm khả năng ức chế sự hình thành màng sinh học được thực hiện bằng phương pháp nhuộm màu với crystal violet. Kết quả xác định cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngạnh Nam ở nồng độ bằng 0,25 mg/mL, cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn ở nồng độ bằng 0,406 mg/mL, và cao phân đoạn ethylacetate Cò Ke ở nồng độ bằng 0,251 mg/mL có khả năng ức chế sự hình thành màng sinh học trên MRSA. Dựa trên kết quả này quyết định cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn và Ngành Ngạnh Nam có hoạt tính ức chế hình thành màng sinh học và kháng MRSA tốt nhất. Nên thí nghiệm ức chế hình thành màng sinh học được tiến hành lặp lại cho chụp ảnh SEM nhằm mục đích quan sát hình thái của tế bào vi khuẩn trong biofilm sau khi xử lý.



Ở các mẫu đối chứng, Hình 3.7a. MRSA được nuôi trong môi trường TSB+1%glucose, Hình 3.7b MRSA được nuôi trong môi trường TSB+1%glucose+kháng sinh cefoxitin ở nồng độ 128 µg/mL. Các màng sinh học được hình thành có mật độ tế bào đồng đều, hình thái tế bào rõ tròn, đều. Hình 3.7a và Hình 3.7b là đối chứng màng sinh học của MRSA.

Trong các môi trường TSB và 1% glucose được bổ sung cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam, hình thái tế bào MRSA khác biệt so với đối chứng.

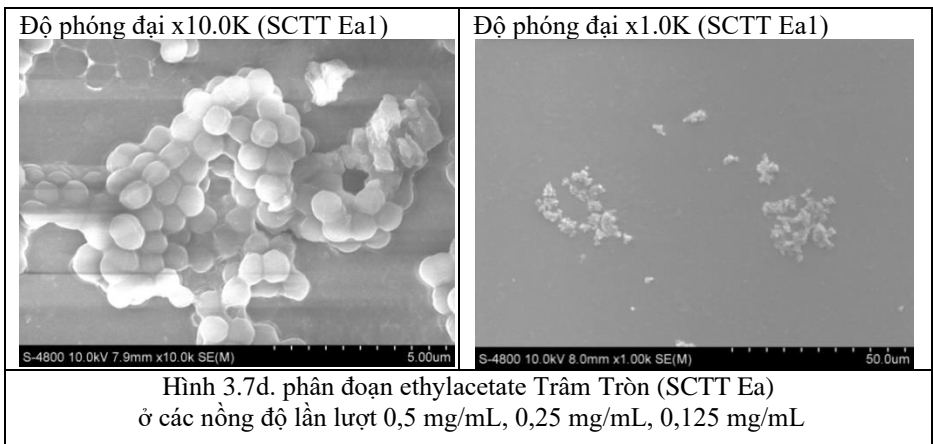
Độ phóng đại x10.0K (NN Ea1)	Độ phóng đại x1.0K (NN Ea1)
	
Độ phóng đại x10.0K (NNEa2)	Độ phóng đại x1.0K (NN Ea2)
	
<p>Hình 3.7c. Môi trường TSB+1% glucose được bổ sung phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam (NN Ea) ở các nồng độ lần lượt 0,8125 mg/mL, 0,4062 mg/mL, 0,2031mg/mL.</p>	

Cụ thể, ở Hình 3.7c. Khi môi trường TSB bổ sung NNEa1 ở nồng độ bằng 0,8125 mg/mL thì mật độ tế bào trong màng sinh học giảm. Dựa trên hình SEM (10.0kV 7.9mm x10.0K) hình thái MRSA thay đổi, vách tế bào vi khuẩn bị tổn

thương và đóng cụm.

Khi môi trường TSB bổ sung NN Ea2 ở nồng độ bằng 0,4062 mg/mL hình thái tế bào MRSA trong màng sinh học vẫn còn đóng cụm, tuy nhiên mật độ tế bào đồng đều hơn. Khi môi trường TSB bổ sung NN Ea3 ở nồng độ bằng 0,2031 mg/mL, mật độ tế bào đồng đều, và hình thái tế bào rõ tương đồng giống so với đối chứng. Như vậy, kết quả chỉ ra cao phân đoạn ethyl acetate Ngành Ngành Nam có hoạt tính ức chế sự hình thành biofilm, và vách tế bào là đích tác động của phân đoạn này.

Dựa vào ảnh chụp SEM ở Hình 3.7d. Môi trường TSB và 1 % glucose được bổ sung cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn (SCTT Ea) ở các nồng độ lần lượt là 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL. MRSA được xử lý với phân đoạn Trâm Tròn ở nồng độ trên thì mật độ tế bào trong màng sinh học giảm so với đối chứng. Hình thái tế bào MRSA trong màng sinh học bị thay đổi, các tế bào kéo dài, đóng cụm khi môi trường TSB được bổ sung cao phân đoạn ethylacetate Trâm Tròn ở nồng độ bằng 0,5 mg/mL.



Đối với pinostrobin, kết quả trình bày ở Hình 3.22e. Kết quả chỉ ra pinostrobin không ức chế hình thành biofilm ở các nồng độ khảo sát. Hình thái tế bào

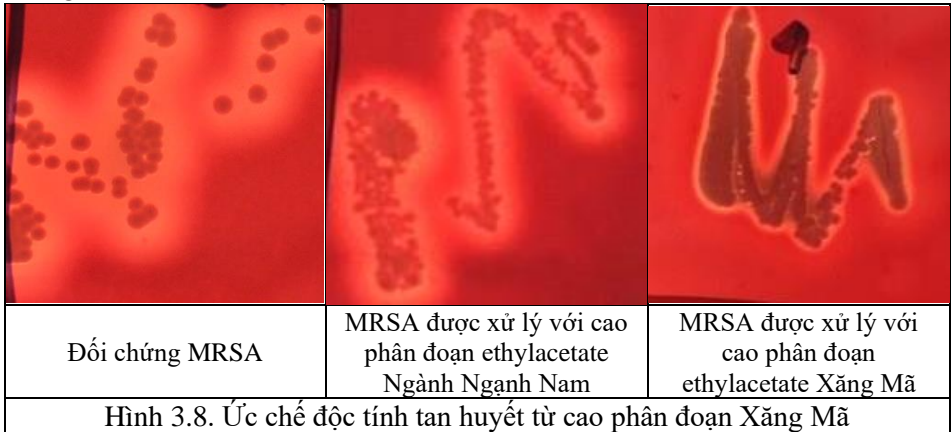
MRSA và mật độ tế bào tương đồng với đối chứng.

Trong các thử nghiệm trước, hai phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn và Ngành Ngành Nam được chứng minh hợp lực mạnh với kháng sinh cefoxitin, và hợp lực với nhau. Kết quả trong ảnh chụp SEM một lần nữa chứng minh hai phân đoạn có cùng đích tác động với kháng sinh cefoxitin là vách tế bào.

3.4.2 *Ức chế sinh độc tố tan huyết*

Những phân tử có liên quan đến sự xuất hiện các tác nhân độc tính ở vi khuẩn đang được quan tâm, vì các phân tử này sẽ hạn chế áp lực chọn lọc [169].

Hai chủng MSSA và MRSA đều có khả năng sinh độc tố tan huyết, đây là độc tố chính trong nghiên cứu tìm kiếm các chất ức chế [170]. Do đó khảo sát khả năng ức chế độc tố tan huyết được tiến hành.



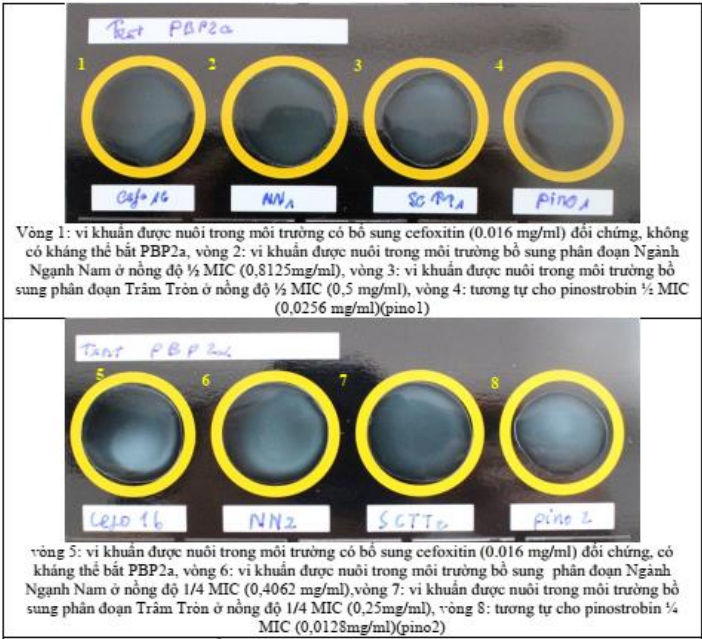
Các cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam, Trâm Tròn, Xăng Mã, Cò Ke và pinostrobin được khảo sát khả năng ức chế sinh độc tố tan huyết trên hai chủng MSSA và MRSA, Kết quả xác định hai cao phân đoạn ethylacetate Xăng Mã và Cò Ke là có hoạt tính ức chế độc tính tan huyết trên MRSA. Trong đó, cao phân đoạn ethyl acetate của Xăng Mã cho hoạt tính ức chế sinh độc tố tan huyết hoàn toàn trên chủng MRSA ở nồng độ bằng 4 mg/mL.

Kết quả được trình bày ở các Hình 3.8.

3.4.3 Ức chế biểu hiện protein PBP2a trên chủng MRSA: Cơ chế kháng Cơ chế kháng kháng sinh phổ biến trên các chủng MRSA lâm sàng là biểu hiện gen *mecA* thông qua protein PBP2a. Sử dụng Kít Latex Agglutination nhằm xác định sự hiện của protein PBP2a trên chủng MRSA khi chủng MRSA được nuôi trong môi trường có bổ sung cao phân đoạn ethylacetate Ngạnh Ngạnh Nam, Trâm Tròn, Xăng Mã, Cò Ke và pinostrobin. Kết quả xác định hai cao phân đoạn Ngạnh Ngạnh Nam, Trâm Tròn và pinostrobin có khả năng ức chế biểu hiện protein PBP2a trên MRSA.

Kết quả được trình bày trong Hình 3.9

Hai cao phân đoạn ethylacetate Xăng Mã và Cò Ke không cho hoạt tính ức chế biểu hiện protein PBP2a trên MRSA được trình bày trong Phụ lục 9.



Hình 3.9. Kiểm tra sự hiện diện PBP2a trên chủng MRSA

Protein PBP2a trên MRSA có liên quan đến quá trình tổng hợp vách tế bào ở MRSA, trong thử nghiệm ức chế biểu hiện protein PBP2a của cao phân đoạn

ethylacetate Ngành Ngành Nam, Trâm Tròn, Xăng Mã, Cò Ke và pinostrobin bằng kit latex PBP2a, bước đầu định tính được PBP2a bị ức chế biểu hiện bởi hai cao ethylacetate Ngành Ngành Nam, Trâm Tròn và pinostrobin trên MRSA. Do đó thử nghiệm khả năng chịu muối của MRSA được tiến hành nhằm chứng minh vách tế bào là đích tác động

3.4.4 Thử nghiệm khả năng chịu muối của MRSA

Khả năng chịu được nồng độ muối cao của chủng MRSA đã được xác định. Do đó, mất khả năng chịu đựng với muối chỉ ra sự tổn thương của vách tế bào trên chủng vi khuẩn. Việc xử lý tế bào vi khuẩn với cao phân đoạn/tinh chất ở nồng độ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC có thể giết chết các tế bào nhạy cảm, và cảm ứng cơ chế chống lại các tác nhân stress trong sinh lý tế bào [73]. Tuy nhiên, trong số ba nghiệm thức gồm cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam, Trâm Tròn và pinostrobin, kết quả xác định MRSA giảm khả năng chịu muối khi MRSA bị xử lý với cao phân đoạn ethyl acetate Ngành Ngành Nam trong vòng 4 giờ.

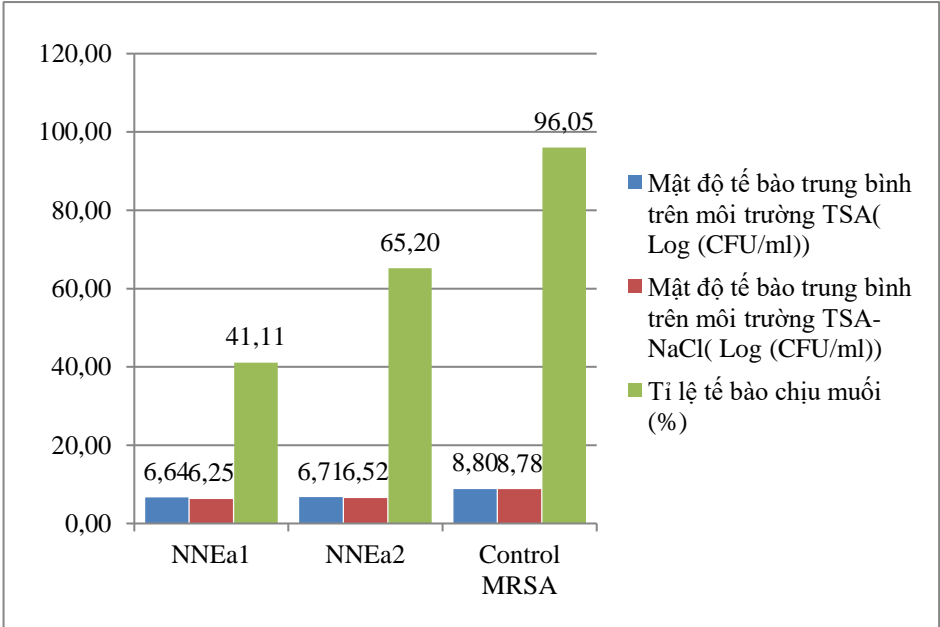
Kết quả được thể hiện ở Hình 3.10

Thử nghiệm này được thực hiện theo mô tả của Carson và cộng sự (2002) [73]. Môi trường dinh dưỡng (TSA) được bổ sung NaCl ở nồng độ 75g/l, sẽ làm giảm khả năng hình thành khuẩn lạc so với tế bào MRSA không xử lý đến 58,89 %, có sự khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Cụ thể, khi môi trường TSB không bổ sung cao phân đoạn/tinh chất, nghiệm thức này là đối chứng về khả năng hình thành khuẩn lạc trên môi trường TSA-NaCl, MRSA có khả năng hình thành khuẩn lạc trên môi trường TSA-NaCl có nồng độ muối cao đến $96,05 \pm 7,34$ (%). Ngược lại, khi môi trường TSB được bổ sung cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành Nam ở nồng độ bằng 1,625 mg/mL thì trên môi trường TSA-NaCl (NaCl ở nồng độ 75g/L), phần trăm tế bào MRSA sống sót trên môi trường TSA-NaCl bằng $41,11 \pm 7,34$ %, so với tế bào MRSA không xử lý thì giảm 58,89 %, có sự khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng.

Khi môi trường TSB có bổ sung cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngành

Nam ở nồng độ bằng 0,812 mg/mL thì phần trăm tế bào MRSA sống sót trên môi trường TSA-NaCl bằng $65,20 \pm 7,34$ %, so với tế bào MRSA không xử lý thì giảm 30,85 %, có sự khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng.

Như vậy, Thử nghiệm khả năng chịu muối của MRSA khi xử lý với cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngạnh Nam đã chứng minh được vách tế bào là đích tác động của phân đoạn này.



Hình 3.10. Phần trăm tế bào MRSA sống sót

Tổng kết lại các kết quả của cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngạnh Nam, cao phân đoạn cho khả năng hợp lực với cefoxitin, không cho khả năng hợp lực với vancomycin; cao phân đoạn định tính ức chế biểu hiện PBP2a trên MRSA; trong thử nghiệm khả năng chịu muối cao phân đoạn này làm giảm khả năng chịu muối của MRSA. Từ các kết quả chứng tỏ, vách tế bào MRSA là đích tác động của cao phân đoạn ethylacetate Ngành Ngạnh Nam.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

Sau khi thực hiện đề tài, một số kết luận quan trọng sau được rút ra. Đề tài đã xác định bốn loài thực vật tại Việt Nam cho hoạt tính kháng MRSA. Trong đó, Xăng Mã, Ngành Ngạnh Nam, Trâm Tròn lần đầu được báo cáo hoạt tính sinh học này.

Các tinh chất tách được cao phân đoạn Trâm Tròn là pinostrobin, dimethyl pinocembrin, 4-methoxy-benzoic acid. Trong đó, 4-methoxy-benzoic acid, dimethyl pinocembrin lần đầu được tách chiết từ chi Trâm.

Các công thức hợp lực giữa cao phân đoạn và kháng sinh cefoxitin, vancomycin đã được xác định. Trong đó, phân đoạn ethyl acetate Ngành Ngạnh Nam cho hoạt tính hợp lực mạnh với cefoxitin, tái nhạy với cefoxitin trên chủng MRSA.

Đề tài bước đầu xác định đích tác động của phân đoạn/tinh chất như khả năng hình thành biofilm, ức chế tan huyết, biểu hiện PBP2a. Trong đó, phân đoạn ethyl acetate Ngành Ngạnh Nam có hoạt tính ức chế con đường tổng hợp vách tế bào có liên quan PBP2a trên MRSA được xác định.

Kiểm tra tính an toàn của cao chiết trên hai loại tế bào nguyên bào sợi và tế bào ung thư gan. Kết quả xác định các cao thực vật không có độc tính tế bào trên hai dòng tế bào kiểm tra. Đề tài góp phần cung cấp minh chứng khoa học cho các phương pháp dân gian truyền miệng trong điều trị bệnh.

4.2 Kiến nghị

- Cần nghiên cứu thêm về các tinh chất có trong các cao phân đoạn Ngành Ngạnh Nam, Xăng Mã.
- Xác định cơ chế phân tử giữa độc tố tan huyết với PBP2a, từ đó làm cơ sở cho xác định cơ chế tác động của thuốc.
- Xác định hoạt tính kháng khuẩn trên các chủng MRSA lâm sàng ở Việt Nam.