

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Nguyễn Thị Thu Hương**

**NGHIÊN CỨU TINH SẠCH ENZYME LUMBROKINASE TỪ  
GIUN QUẾ LÀM NGUYÊN LIỆU TẠO THỰC PHẨM CHỨC NĂNG  
VÀ XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ NHIỄM VI SINH VẬT  
TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN SẢN PHẨM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội - 2020**

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Nguyễn Thị Thu Hương**

**NGHIÊN CỨU TINH SẠCH ENZYME LUMBROKINASE TỪ  
GIUN QUẾ LÀM NGUYÊN LIỆU TẠO THỰC PHẨM CHỨC NĂNG  
VÀ XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ NHIỄM VI SINH VẬT  
TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN SẢN PHẨM**

**Chuyên ngành: Động vật học**

**Mã số: 8420103**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC  
NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

1. TS. Đỗ Thị Tuyên
2. TS. Nguyễn Thị Trung

**Hà Nội - 2020**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận văn tốt nghiệp với đề tài “*Nghiên cứu tinh sạch enzyme lumbrokinase từ giun quế làm nguyên liệu tạo thực phẩm chức năng và xác định mức độ nhiễm vi sinh vật trong quá trình bảo quản sản phẩm*” là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả trong luận văn là trung thực và chưa được công bố trong các công trình khoa học khác. Nếu như không đúng như nêu trên tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về luận văn của mình.

**Người cam đoan**

**Nguyễn Thị Thu Hương**

## LỜI CẢM ƠN

Sau thời gian học tập và nghiên cứu, để hoàn thành luận văn này, trước tiên tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới TS. Đỗ Thị Tuyên - Trưởng phòng Công nghệ sinh học enzyme – Viện Công nghệ sinh học, người thầy đã lên ý tưởng, định hướng nghiên cứu và tận tình chỉ bảo, hướng dẫn tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn tới TS. Nguyễn Thị Trung – Trưởng phòng đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ không những đã chỉ dạy cho tôi rất nhiều kiến thức trong quá trình học tập tại Học viện và luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình tôi hoàn thiện luận văn.

Luận văn được thực hiện bằng kinh phí của dự án phát triển sản phẩm thương mại cấp viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “*Phát triển sản phẩm lumbrokinase chất lượng cao làm nguyên liệu thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị chống tắc nghẽn mạch máu*” do TS. Đỗ Thị Tuyên làm chủ nhiệm.

Xin gửi lời cảm ơn tới các quý thầy cô của Học viện Khoa học và Công nghệ đã chỉ dạy và truyền đạt cho tôi rất nhiều kiến thức trong quá trình học tập tại Học viện. Xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới tất cả các anh chị em cán bộ, học viên, sinh viên phòng Công nghệ sinh học enzyme – Viện Công nghệ sinh học đã luôn giúp đỡ, động viên và tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới các đồng nghiệp yêu quý của tôi tại Khoa Vi sinh – Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương đã luôn hỗ trợ, tạo điều kiện cho tôi trong công việc để tôi yên tâm học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè và người thân luôn ở bên động viên, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận văn này.

Do kiến thức và thời gian còn hạn chế nên luận văn còn nhiều khiếm khuyết, rất mong được sự đóng góp chỉ bảo thêm của các thầy cô, đồng nghiệp và bạn bè để luận văn của tôi được hoàn thiện hơn.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, tháng 05 năm 2020

Học viên

Nguyễn Thị Thu Hương

## DANH MỤC CÁC BẢNG

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Bảng 2. 1. Danh mục hóa chất sử dụng trong nghiên cứu .....                                                                      | 23 |
| Bảng 2. 2. Các dung dịch sử dụng trong nghiên cứu .....                                                                          | 24 |
| Bảng 2. 3. Công thức các môi trường nuôi cấy vi sinh vật.....                                                                    | 25 |
| Bảng 2. 4. Chuồng vi sinh vật làm chứng dương tính cho phép thử vi sinh.....                                                     | 27 |
| Bảng 2. 5. Các máy móc thiết bị sử dụng trong nghiên cứu .....                                                                   | 28 |
| Bảng 2. 6. Thành phần gel polyacrylamide 12,5% .....                                                                             | 35 |
| Bảng 2.7. Lượng vi khuẩn gram âm dung nạp mật có trong chế phẩm.....                                                             | 36 |
| Bảng 2. 8. Hướng dẫn đọc kết quả kit API 20 E.....                                                                               | 40 |
| Bảng 3. 1. Hàm lượng protein và hoạt tính thủy phân fibrin của mẫu enzyme thu được bằng kết tủa phân đoạn.....                   | 43 |
| Bảng 3. 2. Hàm lượng protein và hoạt tính thủy phân fibrin của mẫu enzyme tủa amonium sulphate .....                             | 45 |
| Bảng 3. 3. Hàm lượng protein và hoạt tính thủy phân fibrin của các phân đoạn enzyme sau khi qua cột sephadex G100 .....          | 48 |
| Bảng 3. 4. Tóm tắt quá trình tinh sạch enzyme lumbrakinase từ giun quế .....                                                     | 51 |
| Bảng 3. 5. Hoạt tính thủy phân casein của các mẫu trước và sau khi tinh sạch .....                                               | 51 |
| Bảng 3. 6. Hoạt tính thủy phân fibrin của sản phẩm enzyme lumbrakinase .....                                                     | 52 |
| Bảng 3. 7. Tổng số vi sinh vật hiếu khí (CFU/g) của sản phẩm sau.....                                                            | 54 |
| Bảng 3. 8. Tổng số vi nấm (CFU/g) của sản phẩm sau thời gian bảo quản.....                                                       | 55 |
| Bảng 3. 9. Kết quả thử giới hạn nhiễm khuẩn chế phẩm LK theo dược điển Việt Nam 5 dành cho thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên..... | 64 |

## DANH MỤC CÁC HÌNH

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Hình 1. 1. Cơ chế hoạt hoá plasminogen .....                                                                                                                     | 9  |
| Hình 1. 2. Vai trò của antiplasmin trong cơ chế điều hòa cục máu đông .....                                                                                      | 9  |
| Hình 1. 3. Cấu trúc bậc 3 của lumbrakinase tách chiết từ các loài giun đất .....                                                                                 | 13 |
| Hình 1. 4. Cơ chế hoạt động của lumbrakinase .....                                                                                                               | 14 |
| Hình 2. 1. Đường chuẩn plasmin .....                                                                                                                             | 32 |
| Hình 2. 2. Đường chuẩn BSA .....                                                                                                                                 | 33 |
| Hình 2. 3. Đường chuẩn tyrosine .....                                                                                                                            | 34 |
| Hình 3. 1. (A) Hình ảnh giun quế <i>Perionyx escavatus</i> sử dụng trong nghiên cứu; (B) Hoạt tính thủy phân đĩa fibrin của mẫu dịch nghiền .....                | 42 |
| Hình 3. 2. (A) Hoạt tính thủy phân fibrin của mẫu enzyme thu được bằng kết tủa phân đoạn; (B) Điện di đồ mẫu enzyme tinh sạch bằng kết tủa phân đoạn .....       | 44 |
| Hình 3. 3. (A) Điện di đồ mẫu enzyme tủa amonium sulphate ; (B) Hoạt tính thủy phân fibrin của mẫu enzyme tủa amonium sulphate pha loãng 10 lần .....            | 46 |
| Hình 3. 4. Sắc kí đồ các phân đoạn enzyme lumbrakinase sau khi qua cột sephadex G100 .....                                                                       | 47 |
| Hình 3. 5. Hoạt tính thủy phân fibrin của các phân đoạn enzyme lumbrakinase sau khi qua cột sephadex G100 .....                                                  | 47 |
| Hình 3. 6. Điện di đồ các phân đoạn enzyme lumbrakinase sau khi qua cột sephadex G100 .....                                                                      | 49 |
| Hình 3. 7. (A) Điện di đồ mẫu enzyme tinh sạch qua cột cut – off ; (B): Hình ảnh đánh giá bằng phần mềm dolphin 1D .....                                         | 50 |
| Hình 3. 8. Hoạt tính thủy phân fibrin của sản phẩm lumbrakinase mẻ 1 ở thời điểm ban đầu .....                                                                   | 53 |
| Hình 3. 9. Tổng số vi sinh vật hiếu khí trên môi trường thạch casein đậu tương ở nồng độ $10^{-3}$ của sản phẩm mẻ 2 sau bảo quản 3 tháng ở nhiệt độ phòng ..... | 54 |
| Hình 3. 10. Tổng số vi nấm trên môi trường thạch Sabouraud dextrose ở nồng độ $10^{-1}$ của sản phẩm mẻ 1 sau bảo quản 1 tháng ở $4^{\circ}\text{C}$ .....       | 55 |
| Hình 3. 11. Hình ảnh mẫu thử trong môi trường tăng sinh Enterobacteria –Mossel .....                                                                             | 56 |
| Hình 3. 12. Mẫu thử trên môi trường muối mật violet-red .....                                                                                                    | 57 |
| Hình 3. 13. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường Mac-Conkey agar .....                                                                                  | 58 |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Hình 3. 14. Hình ảnh tế bào vi sinh vật trên môi trường Mac-conkey ở .....                                 | 58 |
| Hình 3. 15. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch Levine - eosin -<br>xanh methylen .....    | 59 |
| Hình 3. 16. Hình ảnh vi sinh vật trên kit API 20E .....                                                    | 59 |
| Hình 3. 17. Kết quả kit API 20 E trên phần mềm API WEB.....                                                | 60 |
| Hình 3. 18. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch muối Manitol.....                          | 61 |
| Hình 3. 19. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch muối xylose – lysin<br>– desoxycholat..... | 62 |
| Hình 3. 20. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch xanh brilliant .....                       | 62 |
| Hình 3. 21. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường .....                                            | 63 |

Tailieu.vn

## DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

| Viết tắt  | Viết đầy đủ                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------|
| APS       | Ammonium persulfate                                       |
| BSA       | Bovine serum albumin (albumin huyết thanh bò)             |
| Cs        | Cộng sự                                                   |
| CFU       | Colony forming unit (đơn vị tạo thành khuẩn lạc)          |
| EDTA      | Ethylene diamine tetraacetic acid                         |
| kDa       | Kilo dalton                                               |
| M         | Marker (Thang chuẩn)                                      |
| OD        | Optical density (Mật độ quang học)                        |
| LK        | Lumbrokinase                                              |
| SDS       | Sodium dodecyl sulfate                                    |
| SDS- PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| TCA       | Trichloroacetic acid                                      |
| t-PA      | Tissue plasminogen activator                              |
| TEMED     | N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine                   |
| u-PA      | Urokinase plasminogen activator                           |
| WHO       | World Health Organization (Tổ chức Y tế thế giới)         |



## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| MỤC LỤC.....                                                                                      | 1  |
| MỞ ĐẦU.....                                                                                       | 3  |
| TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....                                                                          | 5  |
| 1.1. CÁC BỆNH TẮC MẠCH MÁU NÃO .....                                                              | 5  |
| 1.1.1. Sơ lược tình hình chung về bệnh tắc nghẽn mạch máu .....                                   | 5  |
| 1.1.2. Khái niệm và nguyên nhân bệnh tắc nghẽn mạch máu .....                                     | 5  |
| 1.1.3. Cơ chế đông máu và cơ chế tan huyết khối.....                                              | 7  |
| 1.1.4. Một số thuốc điều trị huyết khối.....                                                      | 10 |
| 1.2. TỔNG QUAN VỀ ENZYME LUMBROKINASE .....                                                       | 12 |
| 1.2.1. Cấu trúc, đặc tính và cơ chế hoạt động của lumbrokinase .....                              | 12 |
| 1.2.2. Tình hình nghiên cứu enzyme Lumbrokinase trên thế giới.....                                | 14 |
| 1.2.3. Tình hình nghiên cứu enzyme lumbrokinase ở Việt Nam.....                                   | 17 |
| 1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU CÁC SẢN PHẨM THUỐC VÀ THỰC PHẨM CHỨC NĂNG ĐIỀU TRỊ BỆNH HUYẾT KHỐI..... | 18 |
| CHƯƠNG 2 .....                                                                                    | 23 |
| NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....                                                   | 23 |
| 2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU .....                                                                        | 23 |
| 2.1.1. Nguyên liệu.....                                                                           | 23 |
| 2.1.2. Hóa chất .....                                                                             | 23 |
| 2.1.3. Các dung dịch và đệm.....                                                                  | 23 |
| 2.1.4. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật.....                                                       | 25 |
| 2.1.5. Chủng vi sinh vật.....                                                                     | 27 |
| 2.1.6. Máy móc và thiết bị .....                                                                  | 27 |
| 2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....                                                                  | 28 |
| 2.2.1. Lựa chọn nguồn nguyên liệu và chuẩn bị mẫu enzyme thô .....                                | 28 |

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.2. Các phương pháp tinh sạch lumbrokinase.....                                                                  | 29 |
| 2.2.3. Xác định hoạt tính thủy phân fibrin.....                                                                     | 31 |
| 2.2.4. Xác định hàm lượng protein .....                                                                             | 32 |
| 2.2.5. Xác định hoạt tính thủy phân casein.....                                                                     | 33 |
| 2.2.6. Điện di biến tính protein trên gel polyacrylamide.....                                                       | 34 |
| 2.2.7. Thử giới hạn nhiễm khuẩn.....                                                                                | 35 |
| 2.2.8. Định danh vi khuẩn bằng Kit API 20 E.....                                                                    | 39 |
| 2.2.9. Xử lý số liệu.....                                                                                           | 41 |
| CHƯƠNG 3 .....                                                                                                      | 42 |
| KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....                                                                                          | 42 |
| 3.1. LỰA CHỌN NGUỒN NGUYÊN LIỆU TỪ GIUN QUẾ <i>PERIONYX ESCAVATUS</i> .....                                         | 42 |
| 3.2. NGHIÊN CỨU CÁC PHƯƠNG PHÁP TINH SẠCH LUMBROKINASE .....                                                        | 43 |
| 3.2.1. Tủa phân đoạn bằng dung môi hữu cơ .....                                                                     | 43 |
| 3.2.2. Tủa phân đoạn bằng kết tủa muối amonium sulphate .....                                                       | 44 |
| 3.2.3. Tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel.....                                                               | 46 |
| 3.2.5. Thử hoạt tính thủy phân casein.....                                                                          | 51 |
| 3.3. KIỂM TRA SỰ NHIỄM KHUẨN TRONG SẢN PHẨM ENZYME LUMBROKINASE KHI BẢO QUẢN Ở NHIỆT ĐỘ VÀ THỜI GIAN KHÁC NHAU..... | 53 |
| 3.3.1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí và vi nấm.....                                                                  | 53 |
| 3.3.2. Tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật.....                                                                   | 56 |
| 3.3.3. Tìm vi khuẩn gây bệnh .....                                                                                  | 57 |
| KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....                                                                                          | 65 |
| KẾT LUẬN .....                                                                                                      | 65 |
| KIẾN NGHỊ.....                                                                                                      | 65 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO.....                                                                                             | 66 |
| PHỤ LỤC 1                                                                                                           |    |
| PHỤ LỤC 2                                                                                                           |    |
| PHỤ LỤC 3                                                                                                           |    |
| PHỤ LỤC 4                                                                                                           |    |
| CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ                                                                                           |    |

## MỞ ĐẦU

Rối loạn tim mạch và mạch máu dẫn đến khoảng 26 triệu ca tử vong mỗi năm trên toàn thế giới. Các rối loạn tim mạch và não không chỉ có tỷ lệ tử vong cao trên toàn cầu mà còn dẫn đến các biến chứng sau đó như tan huyết khối có thể ảnh hưởng xấu hoặc đe dọa tính mạng như nhồi máu cơ tim, huyết khối tĩnh mạch não và huyết khối tĩnh mạch [1]. Trên 80% các ca tử vong xảy ra tại các nước có thu nhập thấp và trung bình. Tại các nước đang phát triển bệnh tim mạch ngày càng gia tăng cùng với sự phát triển của xã hội [2]. Tại Việt Nam, theo thống kê của hội tim mạch, có khoảng 16% dân số mắc các bệnh tim mạch và đột quỵ. Có nhiều nguyên nhân gây ra các bệnh tim mạch như: cao huyết áp, tràn mạch máu não, xơ cứng động mạch. Trong số các bệnh nhân bị tai biến mạch máu não thì có đến 24% tử vong, 50% sống nhưng bị các di chứng nặng hoặc nhẹ, chỉ có 26% bệnh nhân sống và làm việc bình thường. Nguyên nhân chủ yếu là do cục máu đông gây tắc động mạch và cản trở lưu thông máu, do đó việc làm tan cục máu đông đóng vai trò rất quan trọng trong việc điều trị các bệnh này. Việc nghiên cứu, bào chế các thuốc để phục vụ điều trị các bệnh tim mạch là nhiệm vụ cấp thiết và vô cùng quan trọng. Các thuốc tan huyết khối hiện nay chủ yếu là nhập ngoại, một số dạng là thuốc tiêm, gây khó khăn cho người sử dụng, giá thành cao và có nhiều tác dụng phụ không mong muốn, nên việc nghiên cứu, bào chế tạo ra một sản phẩm sử dụng đường uống, an toàn, hiệu quả, giá thành rẻ là nhu cầu cấp thiết.

Mihara và cs (1991) đã nghiên cứu và thu nhận thành công một enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ giun đất *Lumbricus rubellus*, bao gồm 6 izozyme được đặt tên chung là lumbrokinase. Lumbrokinase có khả năng thủy phân rất mạnh các sợi fibrin - một loại protein có trong máu để làm tan cục máu đông. Lumbrokinase được xem là thuốc tan huyết khối đặc hiệu, sử dụng làm thuốc uống vì có thể hấp thu từ ruột vào máu và hoạt hóa hệ thống fibrin nội sinh [3], [4], [5]. Một ưu điểm lớn của lumbrokinase so với các thuốc điều trị bệnh tắc nghẽn mạch thông dụng khác là không có tác dụng phụ, không gây chảy máu hệ thống.

Lumbrokinase có tác dụng trực tiếp thủy phân fibrin, làm tan cục máu đông, trong khi các chất hoạt hóa khác vẫn đang được sử dụng như tPA (tissue plasminogen activator) để có tác dụng phải hoạt hóa plasminogen thành plasmin, sau đó plasmin mới có khả năng thủy phân fibrin, ngoài ra lumbrokinase cũng có tác dụng hoạt hóa như tPA. Nhờ có tác dụng kép như vậy nên lumbrokinase cho hiệu quả cao.

Xuất phát từ tình hình thực tiễn trên, chúng tôi thực hiện đề tài ***“Nghiên cứu tinh sạch enzyme lumbrokinase từ giun quế làm nguyên liệu tạo thực phẩm chức năng và xác định mức độ nhiễm vi sinh vật trong quá trình bảo quản sản phẩm”*** với mục tiêu tạo ra được sản phẩm lumbrokinase chất lượng cao và đánh giá độ an toàn của sản phẩm. Với đề tài trên, chúng tôi tập trung giải quyết các vấn đề sau:

- (1) Nghiên cứu phương pháp tinh sạch enzyme lumbrokinase từ giun quế làm nguyên liệu tạo thực phẩm chức năng.
- (2) Tạo nguyên liệu và xác định chỉ tiêu vi sinh vật trong sản phẩm lumbrokinase trong quá trình tạo sản phẩm

## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. HỘI CHỨNG TẮC MẠCH MÁU NÃO

##### 1.1.1. Sơ lược về hội chứng tắc nghẽn mạch máu

Hội chứng tắc nghẽn mạch máu (huyết khối) gây ra rối loạn tim mạch và tai biến mạch máu não là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới. Liên đoàn tim mạch thế giới đưa ra thống kê cứ ba người thì có một người tử vong trong đó có một người tử vong vì bệnh tim mạch. Ở Mỹ cứ 29 giây có một người bị bệnh mạch vành, và cứ 1 phút thì có một người tử vong. Tử vong do bệnh tim mạch chiếm 42% toàn bộ các ca tử vong, phí tổn do bệnh này chiếm 128 tỉ USD mỗi năm. Theo thống kê của Hội Đột quy Mỹ, cứ mỗi 45 giây trôi qua, trên thế giới có ít nhất một người bị đột quy. Và cứ 3 phút trôi qua, thế giới lại có một người tử vong do đột quy. Tại Việt Nam, mỗi năm có khoảng 200.000 người bị đột quy, khoảng 50% trong số đó tử vong. Nếu như trước đây, đột quy thường gặp ở những người tuổi từ 50 trở lên thì hiện nay, bệnh ngày càng trẻ hóa. Theo thống kê tại các bệnh viện, tỷ lệ đột quy ở người trẻ tuổi đang có xu hướng tăng lên, trung bình khoảng 2% mỗi năm.

Hiện nay trên thế giới số người chết hoặc chịu di chứng nặng nề từ các bệnh tim mạch và tai biến mạch máu não ngày càng gia tăng, nhất là các nước đang phát triển. Ngoài ra còn có rất nhiều bệnh liên quan đến tắc nghẽn mạch máu não như: tràn máu não, nhồi máu cơ tim, tắc động mạch phổi. Nguyên nhân chủ yếu của các bệnh trên là do các cục máu đông làm tắc nghẽn mạch máu. Do đó để hạn chế thấp nhất tỉ lệ tử vong và các biến chứng do bệnh tim mạch gây ra, các nhà khoa học đã đi theo hướng xử lý các huyết khối hình thành trong thành mạch. Và việc làm tan cục máu đông đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị bệnh tim mạch.

##### 1.1.2. Khái niệm và nguyên nhân của hội chứng tắc nghẽn mạch máu

Hội chứng tắc nghẽn mạch máu là một chứng bệnh cục máu đông được

tạo thành do fibrin bị đóng cục lưu giữ trong mạch gây tắc mạch và cản trở lưu thông máu. Hội chứng huyết khối tắc động lên cả hệ thống tĩnh mạch (thuyên tắc - huyết khối tĩnh mạch) và hệ thống động mạch (huyết khối động mạch do xơ vữa) [6].

#### *Thuyên tắc-huyết khối tĩnh mạch*

Thuyên tắc-huyết khối tĩnh mạch, là sự tắc nghẽn tĩnh mạch do máu cục máu đông, là bệnh tim mạch phổ biến thứ ba ở những nước phương Tây. Hàng năm có 0,1% dân số thế giới mắc bệnh này. Biểu hiện phổ biến nhất của thuyên tắc-huyết khối tĩnh mạch là huyết khối tĩnh mạch sâu, hiện tượng này xảy ra khi có một cục máu đông hình thành trong lòng các tĩnh mạch sâu của chi dưới. Đây là một bệnh lý phổ biến ở những bệnh nhân lớn tuổi nằm liệt giường, những bệnh nhân sau phẫu thuật không thể cử động trong một thời gian dài cũng như những bệnh nhân vừa trải qua một cuộc đại phẫu, hay phẫu thuật chỉnh hình. Bệnh này cũng có thể xảy ra ở những bệnh nhân có bệnh di truyền dẫn đến đông máu bất thường, xảy ra ở người già, những phụ nữ trẻ cũng không miễn nhiễm, đặc biệt trong thời kì sinh đẻ [7]. Hậu quả nghiêm trọng nhất của huyết khối tĩnh mạch sâu là thuyên tắc động mạch phổi. Tắc mạch phổi xảy ra khi cục máu đông hay một mảnh của nó bong ra và di chuyển đến phổi và gây ra tình trạng tắc nghẽn mạch máu phổi. Thuyên tắc phổi là bệnh lý rất nghiêm trọng với tỉ lệ tử vong rất cao.

#### *Huyết khối động mạch do xơ vữa*

Huyết khối động mạch do xơ vữa xảy ra khi cục máu đông hình thành trên nền của một mảng xơ vữa ở thành động mạch. Khi mảng xơ vữa bị vỡ ra, tại những chỗ đó máu sẽ bị hoạt hóa và đông cục gây tắc động mạch [6]. Đây là một bệnh rất nguy hiểm vì nếu cục máu đông này phát triển và làm tắc nghẽn hoàn toàn, động mạch bị tổn thương, thì máu qua động mạch này sẽ ngừng chảy và mô bên dưới do động mạch này cung cấp máu sẽ rơi vào nguy cơ bị thiếu máu, đôi khi dẫn đến hậu quả là đe dọa tính mạng người bệnh. Nếu huyết khối động mạch do xơ vữa xảy ra tại những động mạch cung cấp máu cho tim, hiện tượng này tạo ra hội chứng động mạch vành cấp hoặc

những cơn đau tim. Tương tự, nếu bệnh lý này xảy ra tại những động mạch cung cấp máu cho não thì những cơn đột quỵ do thiếu máu cục bộ sẽ xảy ra. Bệnh động mạch ngoại biên xảy ra khi huyết khối động mạch do xơ vữa tác động lên các động mạch chi dưới. Bệnh huyết khối động mạch do xơ vữa đang gia tăng chủ yếu do lối sống hiện đại của chúng ta.

### **1.1.3. Cơ chế đông máu và cơ chế tan huyết khối**

Sinh lý học hoàn chỉnh của sự hình thành cục máu đông fibrin là một quá trình tương đối dễ hiểu. Một cục máu đông hoặc huyết khối bao gồm các tế bào máu được chứa trong một ma trận của protein fibrin. Huyết khối hoặc tiêu sợi huyết là quá trình điều hòa enzyme để hòa tan cục máu đông. Trong tuần hoàn động vật có vú, enzyme chịu trách nhiệm cho quá trình tiêu sợi huyết là plasmin, một protease serine giống như trypsin [8].

Đông máu là một cơ chế quan trọng trong quá trình cầm máu. Khi thành mạch máu bị tổn thương, máu được cầm nhờ chỗ tổn thương được che phủ bởi cục máu đông chứa tiểu cầu và sợi huyết. Quá trình đông máu diễn ra gồm một chuỗi các phản ứng theo kiểu bậc thang bao gồm ba giai đoạn: (1) giai đoạn hình thành phức hợp prothrombinase qua hai con đường nội sinh và ngoại sinh, (2) giai đoạn hình thành thrombin từ prothrombin và (3) giai đoạn tạo thành mạng lưới fibrin từ fibrinogen tạo thành cục máu đông [9].

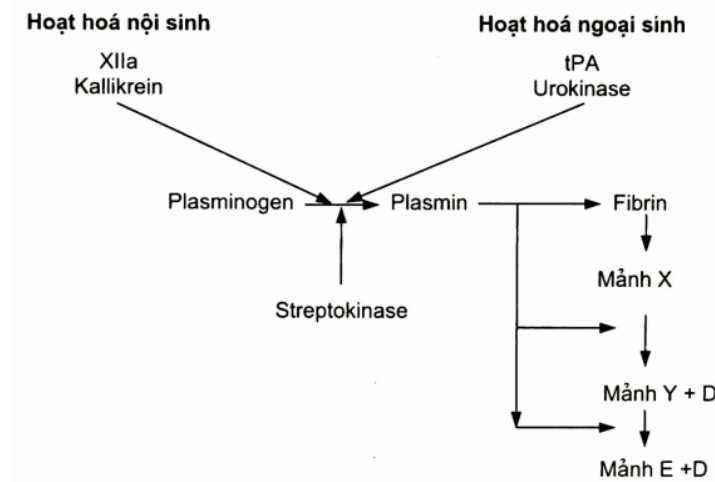
Hệ thống đông máu bao gồm hai thành phần là tế bào (tiểu cầu) và protein (các yếu tố đông máu). Khi rối loạn một trong hai yếu tố trên đều ảnh hưởng đến quá trình đông máu. Phản ứng đông máu ngay lập tức được kích hoạt khi tổn thương xảy ra làm tổn hại đến nội mạc mạch máu. Bước đầu của quá trình đông máu, tiểu cầu tạo nút chặn để cầm máu vết thương sau đó các yếu tố đông máu có trong huyết tương sẽ đáp ứng một loạt các phản ứng tạo ra sợi huyết, củng cố nút chặn tiểu cầu. Sợi huyết được tạo thành đó là do quá trình tạo fibrin từ fibrinogen hòa tan trong huyết tương. Tiểu cầu cùng với sợi huyết tạo thành cục máu đông gắn vào thành mạch máu để ngăn ngừa sự mất máu và giúp liền vết thương.

Ngược với quá trình đông máu là quá trình tan huyết khối, giúp tái lưu thông tuần hoàn máu. Có hai cơ chế tan huyết khối là: cơ chế thủy phân fibrin thông qua hoạt hóa plasminogen tạo thành plasmin và cơ chế thủy phân trực tiếp fibrin.

Với sự có mặt của chất hoạt hóa, plasmin có hoạt tính thủy phân fibrin được sản xuất từ plasminogen không hoạt động có trong hệ thống tuần hoàn. Sự chuyển đổi sinh hóa của plasminogen không hoạt động thành plasmin liên quan đến sự phân cắt protein do các chất kích hoạt plasminogen khác nhau [10].

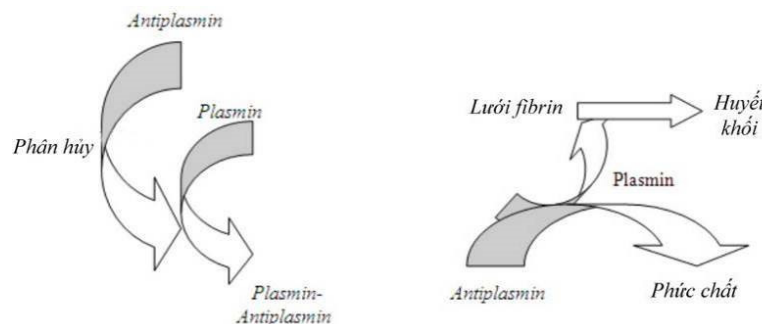
Cơ chế thủy phân fibrin thông qua hoạt hóa plasminogen chỉ xảy ra khi tuyệt đối cần thiết và theo một quy trình rất kỹ càng, lúc đầu chỉ ở khu trú ở khu vực có cục máu đông (tức là nơi có fibrin). Bình thường khi máu đang lưu thông thì không có sự xuất hiện của plasmin. Khi có cục máu đông lập tức xảy ra quá trình kích hoạt plasminogen, như vậy fibrin chính là tác nhân chủ yếu và quan trọng nhất để khởi phát cho sự hoạt hóa plasminogen và từ đó dẫn đến quá trình tiêu fibrin. Các chất hoạt hóa (t-PA, urokinase, streptokinase...) đều thực hiện việc hoạt hóa bằng cách cắt phân tử plasminogen qua mối liên kết với arginine (acid amin số 561) và valine (acid amin số 562). Plasminogen bị cắt thành hai chuỗi: chuỗi A là chuỗi nặng, trọng lượng phân tử 6.000 kDa, và chuỗi B là chuỗi nhẹ, trọng lượng phân tử là 2.600 kDa, hai chuỗi được kết nối với nhau bằng một cầu disulfua. Về mặt cấu trúc plasmin chỉ khác plasminogen ở chỗ có hai chuỗi, trình tự acid amin vẫn giống nhau, và có cầu disulfua nối hai chuỗi nên trọng lượng phân tử và tính kháng nguyên vẫn như nhau. Plasmin sau khi được tạo ra xúc tác cho quá trình cắt fibrin thành các sản phẩm tan được gọi là sản phẩm thoái giáng của fibrin (FDPs), các sản phẩm này có tác dụng cạnh tranh với thrombin làm chậm quá trình chuyển hóa fibrinogen thành fibrin nên làm chậm tạo thành cục máu đông (Hình 1.1).





Hình 1. 1. Cơ chế hoạt hoá plasminogen

Trong các chất hoạt hóa plasminogen thì t-PA có vai trò quan trọng, nó thường phát huy tác dụng sớm nhất và mạnh nhất, hiệu lực hoạt hóa tăng lên rất nhiều khi có mặt của fibrin. Trong máu người bình thường plasmin tồn tại song song với yếu tố ức chế là antiplasmin, nó có nồng độ cao gấp 30 lần so với plasmin, có tác dụng ngăn chặn việc tác động của plasmin tới việc phân hủy các protein trong huyết tương [11]. Hai yếu tố hoạt hóa plasminogen tự nhiên trong máu là urokinase (u-PA) và yếu tố hoạt hóa mô (t-PA), hoạt động tiêu sợi huyết được kiểm soát bởi các chất ức chế plasmin ( $\alpha 1$ - antiplasmin,  $\alpha 2$ - macroglobulin), các chất ức chế hoạt hóa plasminogen (PAL-I: plasminogen activator inhibitor -1, một chất ức chế nhanh tác dụng của t-PA và u-PA) [12]. Nhờ cơ chế trên mà cơ thể giữ được sự cân bằng, ổn định, không có sự đông máu hoặc chảy máu bất thường (Hình 1. 2).



Hình 1. 2. Vai trò của antiplasmin trong cơ chế điều hòa cục máu đông

Cơ chế tan huyết khối thông qua sự thủy phân trực tiếp fibrin an toàn hơn cơ chế thủy phân bằng quá trình hoạt hóa plasminogen vì plasmin liên quan đến hệ thống cầm máu của cơ thể, nếu lượng plasmin được tạo ra mất cân bằng với lượng antiplasmin thì sẽ rất nguy hiểm với các vết thương chảy máu, có thể gây ra chảy máu ồ ạt và nguy hiểm đến tính mạng. Ngoài các yếu tố lumbrokinase, t-PA, u-PA không có yếu tố nào có thể thủy phân trực tiếp fibrin mà đều phải thông qua quá trình hoạt hóa plasminogen [1].

#### **1.1.4. Một số thuốc điều trị huyết khối**

Hiện nay nhu cầu về các thuốc điều trị huyết khối ngày càng tăng cao do bệnh nhân mắc các bệnh liên quan đến tim mạch, huyết khối trên thế giới ngày càng gia tăng theo tốc độ phát triển của xã hội và lối sống hiện đại.

Việc điều trị các bệnh huyết khối chủ yếu tập trung vào việc kìm hãm sự tạo thành fibrin hoặc sử dụng các nhân tố tác động vào sự chuyển hóa plasminogen thành plasmin.

##### *1.1.4.1. Các thuốc có bản chất hóa học*

Các thuốc điều trị huyết khối có bản chất hóa học thường được sử dụng là coumarin và heparin, các thuốc này có tác dụng kìm hãm sự tạo thành cục fibrin [2]. Heparin có tác dụng tức thời nên nhanh chóng ngăn cản sự phát triển của huyết khối, nó có thể tác dụng kéo dài trong vòng 3-4 giờ trước khi bị phá hủy bởi heparinase trong máu. Khi tiêm heparin với liều 0,5-1 mg/kg trọng lượng cơ thể có thể kéo dài thời gian đông máu tới trên 30 phút. Coumarin khi được tiêm vào cơ thể sẽ cạnh tranh với vitamin K ở những vị trí hoạt động trong các phản ứng enzyme dẫn đến tạo thành bốn yếu tố II, VII, IX, X. Sau khi tiêm 12 giờ hoạt tính đông máu giảm xuống còn 50%, sau 24 giờ còn khoảng 20%, sau khoảng 3 ngày chấm dứt điều trị với coumarin thời gian đông máu sẽ trở lại trạng thái bình thường [9].

Vào đầu những năm 1950, aspirin được sử dụng trong việc ngăn ngừa nhồi máu cơ tim [13], tuy nhiên vai trò của nó trong việc điều trị cấp tính không được chứng minh. Các thuốc heparin, atropine, papaverine và nitroglycerin cũng thường xuyên được sử dụng để ngăn ngừa hoặc làm giảm

co thắt mạch vành. Như vậy, cho đến những năm 1950, các phương pháp điều trị chỉ là giảm nhẹ chứ không phải điều trị [14], [15].

#### 1.1.4.2. Các thuốc có bản chất enzyme

Hiện nay, các enzyme tiêu sợi huyết được sản xuất bởi các vi sinh vật, rắn, giun đất, côn trùng, thực vật và các sinh vật khác đang được sử dụng thành công trong việc điều trị cục máu đông, đặc biệt là phân hủy trực tiếp fibrin với chi phí thấp hơn và ít tác dụng phụ [16].

Các nghiên cứu lâm sàng đã chỉ ra cách tiếp cận tốt nhất để điều trị nghẽn mạch là tiêm trực tiếp vào tĩnh mạch 1 enzyme có khả năng chuyển hóa plasminogen thành plasmin. Các enzyme đang được sử dụng rộng rãi trong việc điều trị là streptokinase (từ vi khuẩn  $\alpha$ - haemolytic *Streptococcus*), urokinase (từ nước tiểu của người) và tPA (chất hoạt hóa plasminogen của mô) tái tổ hợp [16].

**Streptokinase:** là một protein có khối lượng phân tử 47 kDa, do liên cầu khuẩn tan huyết I nhóm A sinh ra. Nó tác động theo một cơ chế phức tạp với cả plasminogen liên kết và không liên kết với fibrin trong tuần hoàn để tạo thành một phức hợp hoạt hóa. Phức hợp này biến đổi plasminogen còn dư thành plasmin bằng cách thủy phân liên kết L-arginine-L-valine, có tác dụng tiêu fibrin và có thể làm tan các cục máu đông trong lòng mạch. Streptokinase được sử dụng để điều trị thuyên tắc mạch phổi và tĩnh mạch sâu. Bên cạnh những ưu điểm trên thì streptokinase cũng có những tác dụng phụ khi sử dụng lâu dài như đau cơ, buồn nôn, sốt, hạ huyết áp, loạn nhịp tim [17], [18].

**Nattokinase:** là một loại enzyme tự nhiên được chiết xuất từ môi trường lên men của vi khuẩn *Bacillus natto*. Nattokinase làm tan fibrin gấp 4 lần plasmin nội sinh trong cơ thể. Nattokinase giúp duy trì và tăng cường khả năng phân hủy fibrin bình thường của cơ thể nhằm hỗ trợ điều trị và phòng ngừa các bệnh liên quan đến huyết khối như nhồi máu cơ tim, thiếu máu lên não, đột quỵ [19], [20].

**t-PA:** là yếu tố hoạt hóa mô, có thể sản xuất bằng con đường tái tổ hợp nhưng giá thành cao. Đầu tiên t-PA gắn với fibrin, phức này sau đó gắn vào plasminogen tạo thành phức hợp hoạt hóa plasminogen để thủy phân fibrin

[21], [22]. Tác dụng phụ của t-PA là gây chảy máu như ở nơi tiêm, đường tiêu hóa, trong não, hạ huyết áp [6].

**Urokinase:** được tổng hợp bởi tế bào biểu mô hình ống trong thận người và thu được trong nước tiểu, do đó việc sản xuất và khai thác lâm sàng bị hạn chế (2300 lít nước tiểu mới thu được 29 mg urokinase tinh khiết) [23]. Enzyme này cũng hoạt động như một chất hoạt hóa plasminogen, thủy phân liên kết ester ở L-valine và L-arginine [18]. Nó thường được dùng để tiêu hủy huyết khối tại chỗ, điều trị tắc nghẽn phổi, huyết khối tĩnh mạch sâu. Tác dụng phụ của urokinase là giảm huyết áp, loạn nhịp, sưng quanh hố mắt, chảy máu ở nơi chấn thương xuyên da [24].

Mặc dù việc sử dụng các enzyme này trong điều trị đã thu được những kết quả tích cực, tuy nhiên vẫn tồn tại một số vấn đề phát sinh trong quá trình điều trị như giá thành cao (t-PA tái tổ hợp, urokinase), khó xác định liều phù hợp (streptokinase), sốt, tăng chảy máu, tạo kháng nguyên, không hiệu quả khi uống qua đường miệng [25].

## 1.2. TỔNG QUAN VỀ ENZYME LUMBROKINASE

### 1.2.1. Cấu trúc, đặc tính và cơ chế hoạt động của lumbrokinase

Lumbrokinase là tên gọi chung chỉ một nhóm gồm 6 isozyme có tác dụng thủy phân fibrin, làm tan cục máu đông. Khối lượng phân tử trung bình của lumbrokinase từ 25 đến 32 kDa [1]. Lumbrokinase là những chuỗi polypeptide đơn giàu asparagine hoặc aspartic acid, rất ít proline và lysin, không chứa thành phần đường. Chúng được xếp vào serine protease kiềm giống trypsin. Tuy nhiên chúng giàu asparagine và aspartic acid hơn so với các serine protease khác đã biết.

Lumbrokinase (LK) được tìm thấy trong ruột, dịch mô và dịch ruột của rất nhiều loài giun đất. Chúng có tác dụng tiêu sợi huyết mạnh, người ta giải thích sự có mặt của nó trong các loại giun là do chúng cần để tiêu hóa thức ăn là những mảnh vụn thực vật và các chất hữu cơ trong đất nên chúng sản xuất enzyme LK như một serine protease [1].