

KHẢO SÁT HIỆU QUẢ CỦA CHẾ PHẨM PROBIOTIC *ENTEROCOCCUS FAECIUM* L3 TRÊN NGƯỜI TÌNH NGUYỆN KHỎE MẠNH

NGÔ THANH NAM ⁽¹⁾, BÙI THỊ LAN ANH ⁽¹⁾, PHẠM NGỌC AN ⁽¹⁾,
ERMOLENKO E.I. ⁽²⁾, SUVOROV N.A. ⁽²⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Probiotic là những vi sinh vật sống khi đưa vào cơ thể với liều thích hợp sẽ mang lại những hiệu quả tích cực đối với sức khỏe [3]. Có tới hàng trăm chủng vi khuẩn khác nhau được sử dụng làm lợi khuẩn điều chế probiotic, chủ yếu thuộc các *Lactobacillus* và *Bifidobacteria*. Trong cơ thể vật chủ probiotic có tác dụng chủ yếu là đối kháng với vi sinh vật (VSV) có hại, điều hòa chuyển hóa và miễn dịch. Trong những năm gần đây, một số dòng vi khuẩn *Enterococcus faecium* đã được phát hiện có nhiều tác dụng nổi bật như khả năng tạo vitamin cao, khả năng đối kháng với VSV mạnh, có phổ kháng kháng sinh rộng nên có thể tồn tại trong nhiều ca bệnh đang dùng kháng sinh. Đã có những probiotic đã được sản xuất trên cơ sở các chủng này như *E. faecium* SF68, *E. faecium* M74, *E. faecium* L3 [2]. Tại Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, đã tiến hành điều chế một số sản phẩm dạng sữa chứa lợi khuẩn *E. faecium* L3 theo công nghệ của Viện Y học thực nghiệm (Liên bang Nga) và đưa vào sử dụng nhằm bước đầu đánh giá tác dụng tác dụng của chế phẩm trên người khỏe mạnh và xây dựng cơ sở dữ liệu tham chiếu cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 24 nam giới tuổi từ 25÷54 (trung bình 33,37±9,65) đang làm việc và sinh sống tại Hà Nội, tình nguyện tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Người không có bệnh cấp tính và bệnh mạn tính tiến triển, tiền sử không mắc bệnh tiêu hóa mạn tính.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Các vi khuẩn *E. faecium* được phân lập nuôi cấy và xác định các đặc tính sinh học theo công nghệ hướng dẫn đối với *E. faecium* L3 của Liên bang Nga [7]. Chuẩn bị dung dịch sữa lên men bao gồm: Sữa bột đậu nành Soymilk gói 25 gram (Công ty Super coffeemix) pha trong nước lọc tinh khiết tỷ lệ 10%; lên men dung dịch bởi *E. Faecium* L3 đạt nồng độ 10^7 - 10^8 CFU/ml, không có tạp khuẩn khi đưa vào sử dụng.

Xây dựng phiếu quan sát lâm sàng có nội dung theo dõi các triệu chứng toàn thân và tiêu hóa. Phân tích các chỉ số máu ngoại vi với máy phân tích công thức máu Sysmex KX-21 (Sysmex Corporation, Japan); máy phân tích sinh hóa Evolution 3000 (Biochemical System, Italia) với kit của hãng Chema; hệ máy Realtime-PCR với kit Kolonaflor-16 (Alpha lab, Nga), máy sắc ký miễn dịch và các thiết bị nuôi cấy vi khuẩn để phân tích thành phần và số lượng VSV trong các mẫu phân.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thử nghiệm lâm sàng không nhóm chứng

Phác đồ sử dụng: Dung dịch sữa đậu nành lên men *E. faecium* L3 100 ml x 2 lần/ngày uống sau bữa ăn sáng và tối 1 giờ x 10 ngày.

Đánh giá sự biến đổi trạng thái cơ thể bao gồm: sức đề kháng miễn dịch qua các chỉ số bạch cầu máu ngoại vi; sự chuyển hóa qua các hoạt độ enzym chuyển amine ALT, AST, GGT và ALP; chuyển hóa lipid máu với các chỉ số triglyceride, cholesterol, HDL, LDL huyết thanh; thành phần và số lượng VSV đường ruột qua xét nghiệm phân; theo dõi các triệu chứng tiêu hóa và đo lường nồng độ ure, creatinin huyết thanh để đánh giá tác dụng phụ và tính an toàn của sản phẩm. Các chỉ tiêu nghiên cứu được đánh giá trước và sau liệu trình 01 ngày.

Nghiên cứu được tiến hành trong năm 2015-2016 tại Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.

2.3.2. Phương pháp thống kê

Các số liệu được so sánh trước, sau điều trị trên chương trình SPSS 20.0. Sử dụng t-test cho 2 biến phụ thuộc đối với các biến định lượng và Z test với biến định tính.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Sự biến đổi các chỉ số bạch cầu, chỉ số sinh hóa máu sau khi sử dụng probiotic được tổng hợp qua các bảng 1, 2 và hình 1.

Bảng 1. Các chỉ số bạch cầu máu ngoại vi

Chỉ số bạch cầu	Thời điểm đánh giá (n=23)	
	Trước sử dụng ($\bar{x} \pm SD$)	Sau sử dụng ($\bar{x} \pm SD$)
Số lượng bạch cầu (G/L)	6,84 $\pm$ 1,73	6,05 $\pm$ 1,03 ^{**}
Số lượng BC lympho (G/L)	2,33 $\pm$ 0,45	2,15 $\pm$ 0,45 [*]
Tỷ lệ lympho (%)	34,48 $\pm$ 4,93	35,66 $\pm$ 5,53
Số lượng BC trung tính (G/L)	3,83 $\pm$ 1,29	3,23 $\pm$ 0,81 [*]
Tỷ lệ BC trung tính (%)	55,40 $\pm$ 6,50	53,13 $\pm$ 8,43
MXD (G/L)	0,68 $\pm$ 0,23	0,68 $\pm$ 0,24
MXD (%)	10,12 $\pm$ 2,75	11,17 $\pm$ 4,47

Ghi chú: ^{*}: $p < 0,05$; ^{**}: $p < 0,01$.

Kết quả nghiên cứu trong bảng 1 cho thấy sau liệu trình sử dụng probiotic số lượng bạch cầu, bạch cầu lympho và bạch cầu trung tính giảm có ý nghĩa thống kê đồng thời có xu hướng bình thường hóa (hình 1a) với sự phân bố của chúng tập trung hơn, không xuất hiện các trường hợp ngoại lệ. Điều này có lẽ thể hiện sự giảm viêm trong cơ thể. Các *E. faecium* L3 tiết các chất đối kháng VSV gây bệnh, kích thích tế bào tiết nhầy (mucus) tăng hoạt động và điều biến đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu [3].

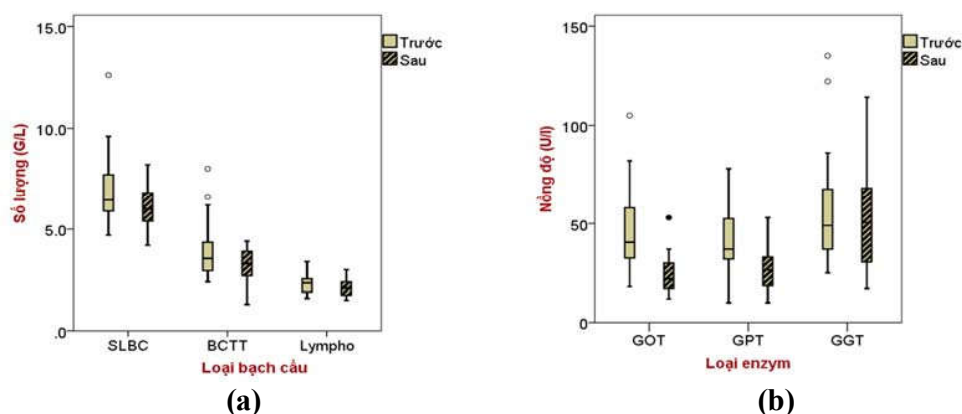
Các chỉ số enzyme chuyển amin thường được chỉ định xét nghiệm bao gồm GOT (AST), GPT (ALT) có trong tế bào gan, gia tăng hoạt độ trong máu khi gan bị viêm hoặc bị tổn thương; ALP có trong màng tế bào gan còn GGT có trong thành của tế bào ống mật, hoạt độ của chúng gia tăng khi có các tổn thương liên quan với các cấu trúc này. Những enzyme nói trên còn gia tăng hoạt độ trong các trạng thái viêm hoặc nhiễm độc ngoài gan. Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả cho thấy sau sử dụng probiotic hoạt độ GOT và GPT đã giảm có ý nghĩa thống kê, đối với GGT thì không còn các trường hợp có chỉ số này cao ngoại lệ (bảng 2 và hình 1b). Điều này thể hiện tình trạng viêm, nhiễm độc gan của các đối tượng nghiên cứu đã giảm đáng kể sau sử dụng probiotic.

Bảng 2. Hoạt độ enzyme chuyển amin và nồng độ lipid huyết thanh

Chỉ số sinh hóa	Thời điểm đánh giá (n=24)	
	Trước sử dụng ($\bar{X} \pm SD$)	Sau sử dụng ($\bar{X} \pm SD$)
GOT (U/L)	46,67 $\pm$ 21,20	24,46 $\pm$ 9,79***
GPT (U/L)	41,00 $\pm$ 16,67	26,75 $\pm$ 11,97***
GGT (U/L)	55,67 $\pm$ 28,19	52,58 $\pm$ 25,81
ALP (U/L)	73,25 $\pm$ 24,65	71,11 $\pm$ 22,95
Triglycerid (mmol/L)	2,01 $\pm$ 1,20	1,95 $\pm$ 0,60
Cholesterol (mmol/L)	4,59 $\pm$ 0,49	4,83 $\pm$ 0,64
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1,20 $\pm$ 0,20	1,20 $\pm$ 0,25
LDL-Cholesterol (mmol/L)	2,50 $\pm$ 0,42	2,69 $\pm$ 0,42

Ghi chú: ***: $p < 0,001$.

Như vậy, sau sử dụng probiotic hoạt độ GOT và GGT giảm có ý nghĩa thống kê, các thành phần lipid huyết thanh thay đổi không rõ rệt.



Hình 1. Biến đổi các chỉ số bạch cầu và các enzyme chuyển amin

Các giá trị thể hiện trong khung boxplot gồm 25, 50, 75 quantiles, minimum và maximum; Các trường hợp outlier (ngoại lệ) là những chấm tròn: a) Số lượng các dòng bạch cầu giảm xuống đồng thời không còn các trường hợp cao ngoại lệ; b) Hoạt độ GOT và GPT giảm rõ rệt, không còn các trường hợp có GGT cao ngoại lệ.

Về chuyển hóa lipid, báo cáo của các nghiên cứu ở Liên bang Nga cho thấy các chế phẩm probiotic chứa *E. faecium* L3 có tác dụng làm tăng phần chống xơ vữa (antiatherogenic) và HDL, tăng hoạt độ của các enzym superoxide dismutase và catalase [4, 5]. Kết quả thống kê trong bảng 2 cho thấy sau khi sử dụng probiotic thì nồng độ các thành phần lipid máu thay đổi không rõ rệt, do vậy, nhóm tác giả cho rằng những biến đổi chuyển hóa lipid có lẽ nên được đánh giá trong các trường hợp có rối loạn (bảng 2).

Biến đổi thành phần và số lượng vi sinh vật đường ruột: Kết quả chính về sự biến đổi các chỉ số này được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm bất thường của vi sinh vật đường ruột

Thời điểm nghiên cứu	Đặc điểm bất thường (n=20)				
	Mật độ thấp VSV có lợi (SL, %)		Phát hiện vi khuẩn có hại (SL, %)		
	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
Trước sử dụng	3(15)	5(25)	6(30)	7(35)	3(15)
Sau sử dụng	0	1(5)	0*	1(5)*	1(5)

Ghi chú: *: $p < 0,05$

Bảng 3 cho thấy sau sử dụng probiotic tỷ lệ các trường hợp có các dấu hiệu bất thường về VSV đường ruột thấp hơn so với trước sử dụng chế phẩm. Cơ sở của việc sử dụng probiotic là điều chỉnh thành phần hệ VSV ở vật chủ theo hướng có lợi. So với hệ vi khuẩn đường ruột của người Nga nhóm tác giả nhận thấy ở người Việt Nam mật độ các vi khuẩn đường ruột có hại (*Klebsiella* spp., *E. coli*, *E. coli* enteropathogenic) có xu hướng cao hơn, đồng thời mật độ các vi khuẩn thân thiện (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.) có xu hướng thấp hơn [6]. Điều này có lẽ do người Nga có thói quen sử dụng thường xuyên các thực phẩm lên men hơn so với người Việt Nam. Trong nghiên cứu này sau khi sử dụng probiotic thành phần VSV đường ruột đã có biến đổi rất rõ rệt theo hướng tích cực (bảng 3): giảm hoặc hết những người có mật độ thấp các lợi khuẩn *Lactobacillus* spp. và *Bifidobacter* spp., hoặc những người có vi khuẩn có hại *E. faecalis*, *S. aureus*, *Klebsiella* spp. Như vậy *E. faecium* L3 đã tạo môi trường thuận lợi cho các lợi khuẩn và ức chế với các vi khuẩn có hại. Kết quả nghiên cứu trên invitro cho thấy vi khuẩn này cũng như dịch nổi của chúng có khả năng ức chế hầu hết các vi khuẩn gram (-) và gram (+) ở mức độ tương đương với *L. plantarum* L4 [1]. Tổng hợp các dấu hiệu bất thường được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Các dấu hiệu bất thường trong quá trình sử dụng probiotic

Đặc điểm bất thường	Số người	Số ngày
Đại tiện phân nhão	01	3
Không đại tiện trong ngày	2	4
Các triệu chứng khác	0	0
Nồng độ creatinin máu cao	0	-
Nồng độ ure máu cao	0	-

Như vậy, có 01 trường hợp đi ngoài phân lỏng trong 3 ngày (1,25%), 02 trường hợp có 4 ngày không đại tiện (1,67%). Những người tham gia nghiên cứu trong điều kiện ngoại trú, vì vậy, chế độ ăn uống không hợp vệ sinh có thể gây ra các triệu chứng này. Các bệnh nhân không cần điều trị và tự hết các triệu chứng. Không ghi nhận trường hợp nào có nồng độ creatinin và ure huyết thanh ngoài mức bình thường. Cho đến nay các báo cáo nghiên cứu chưa phát hiện tác dụng phụ của các chế phẩm chứa *E. faecium* L3.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng probiotic *E. faecium* L3 được điều chế theo công nghệ của Viện Y học thực nghiệm có tác dụng bình thường hóa các chỉ số bạch cầu máu ngoại vi và hoạt độ các enzym chuyển amin trong huyết thanh, các chỉ số lipid huyết thanh thay đổi không rõ rệt. Tỷ lệ số người có dấu hiệu bất thường về thành phần và số lượng vi sinh vật đường ruột giảm xuống. Không xuất hiện các tác dụng phụ trong quá trình sử dụng chế phẩm.

Hạn chế của nghiên cứu: những kết quả có thể chưa phản ánh hết các tác dụng khách quan của chế phẩm được sử dụng trong nghiên cứu do chưa có nhóm chứng, các số liệu mang tính chất tham khảo để thiết kế các nghiên cứu tiếp theo hoàn chỉnh hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blazenka Kos, Jagoda Suskovic, Jasna Beganovic, Kresimir Gjuracic, Jadranka Frece, Carlo Iannaccone, Francesco Canganella, *Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry*, World J Microbiol Biotechnol, 2008, **24**:699-707.
2. Suvorov, A.N., Zakharenko S.M., Alekhine, *Enterococci as probiotics choice*, the Wedge, nutrition, 2003, **1**:26-29.
3. World Gastroenterology Organization, *Probiotics and prebiotics*, Guidelines. [Internet]. 2008 [cited 2008].

4. В.М. Льявиной. avena.ru/wp-content/uploads/Атеросклероз.pdf. [Internet]. 2009 [cited 2016 Aug 18].
5. Гунина Л.М., Алехина Г.Г., *Двиги параметров гомеостаза организма и функционального состояния сердечно-сосудистой системы спортсменов под влиянием пробиотической терапии*, Вісник Запорізького національного університету, **2012**:217-224.
6. Ермоленко Е.И., Котылева М.П., Буй Тхи Лан Ань, Чан Тхи Ньай, Буй Тхи Тхань Нга, Нго Тхань Нам, Краева Л.А., Карасева А.Б, Гончаров А.Е., Киреева А.Г., Суворов А.Н., *Исследование микробиоты кишечника жителей Вьетнама и России*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới, **2016**:24-34.
7. Суворов А.Н., *Способ получения аутопробиотика на основе enterococcus faecium, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина*, 2012 Oct 9, RU 2460778 C1.

SUMMARY

EVALUATING EFFECTIVENESS OF PROBIOTICS BASED ON *STREPTOCOCCUS FAECIUM* L3 IN HEALTHY VOLUNTEERS

The results showed that usage of this probiotic can lead to decrease of white blood cells, lymphocytes, neutrophils contents in blood, to decline of serum glutaminoxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) concentrations, not to demonstrate effects on serumal lipid profile. The number of participants with low concentrations of beneficial bacteria *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. and the amount possessing opportunistic bacteria *E. faecalis*, *S. aureus* and *Klebsiella* spp. decreased. It is suggested that probiotics of *E. faecium* L3 has anti-inflammatory effects and improve balance of gut microbiota, without causing statistically significant changes in lipid metabolism.

Từ khóa: Bạch cầu, GOT, GPT, hệ vi sinh vật đường ruột; probiotics, Enterococcus faecium L3, white blood cells gut microbiota.

Nhận bài ngày 16 tháng 6 năm 2017

Hoàn thiện ngày 23 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ *Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*

⁽²⁾ *Viện Y học thực nghiệm Saint Petersburg, Liên bang Nga*