

ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA CAO CHIẾT TỪ VI KHUẨN NỘI SINH *Bacillus* sp. DO-R5 TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT

Trần Chí Linh^{1,2}, Nguyễn Trọng Tuấn¹, Đại Thị Xuân Trang^{1*}

¹ Trường Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam

² Trường Đại học Nam Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Đại Thị Xuân Trang <dtxtrang@ctu.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 18-09-2025; Hoàn thành phản biện: 15-01-2026; Ngày chấp nhận đăng: 06-02-2026)

Tóm tắt. Vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây dược liệu đang được xem là nguồn hợp chất sinh học tiềm năng trong y học hiện đại. Nghiên cứu này nhằm đánh giá độc tính bán trường diễn của cao chiết ethyl acetate từ vi khuẩn *Bacillus* sp. DO-R5 (BaDO-R5) (số hiệu ngân hàng gen PQ533190) – một dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây Sốt trai (*Dillenia ovata*). Chuột thí nghiệm được cho uống cao chiết với liều cố định 400 mg/kg/ngày liên tục trong 45 và 90 ngày. Trong suốt quá trình nghiên cứu, các chỉ số hành vi, sinh lý được theo dõi chặt chẽ; sau thời gian thử nghiệm, các chỉ số tăng trưởng, tỷ lệ khối lượng cơ quan, huyết học, sinh hóa (men gan, chức năng thận, glucose, lipid máu) và hình thái đại thể gan, thận, lách được đánh giá. Kết quả cho thấy cao BaDO-R5 không gây biểu hiện bất thường về hành vi, không gây chết chuột và không làm thay đổi có ý nghĩa các chỉ số sinh học. Các chỉ số chức năng gan (SGOT, SGPT), thận (urea, creatinine) và các chỉ số nguy cơ tim mạch (AIP, AC, CRR) đều nằm trong giới hạn bình thường. Kết quả cho thấy cao BaDO-R5 không gây độc tính rõ rệt trong thử nghiệm bán trường diễn, góp phần bổ sung dữ liệu an toàn tiền lâm sàng và gợi ý tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: *Bacillus* sp. DO-R5, độc tính, độc tính bán trường diễn, sốt trai, vi khuẩn nội sinh

Subchronic toxicity evaluation of the extract from endophytic *Bacillus* sp. DO-R5 in a mice model

Tran Chi Linh^{1,2}, Nguyen Trong Tuan¹, Dai Thi Xuan Trang^{1*}

¹ Can Tho University, Cantho, Vietnam

² Nam Can Tho University, Cantho, Vietnam

* Correspondence to Dai Thi Xuan Trang <dtxtrang@ctu.edu.vn>

(Received: 18 September 2025; Revised: 15 January 2026; Accepted: 06 February 2026)

Abstract. Endophytic bacteria isolated from medicinal plants are emerging as a valuable source of bioactive compounds with therapeutic potential. In this study, we evaluated the sub-chronic toxicity of the ethyl acetate extract from *Bacillus* sp. DO-R5 (BaDO-R5) (gene bank accession number PQ533190), an endophytic strain isolated from the root of *Dillenia ovata*, a native medicinal plant. The extract was administered orally to mice at a daily dose of 400 mg/kg/day for 45 and 90 consecutive days. Throughout the study, behavioral and physiological parameters were closely monitored. At the end of the treatment periods, the body weight gain, organ-to-body weight ratios, hematological indices, biochemical markers (including liver enzymes, kidney function, glucose, and lipid profiles), and gross

morphology of the liver, kidneys, and spleen were assessed. Results indicated that BaDO-R5 did not induce abnormal behaviors or mortality. Organ morphology remained normal, and no significant changes were observed in hematological or biochemical parameters. Liver and kidney function markers, including SGOT, SGPT, urea, and creatinine, stayed within normal ranges. Importantly, cardiovascular risk indicators such as AIP, AC, and CRR were not adversely affected. The results showed that the BaDO-R5 extract did not cause significant toxicity in the sub-chronic toxicity study, contributing to the preclinical safety data and suggesting potential for further studies.

Keywords: *Bacillus* sp. DO-R5, *Dillenia ovata*, endophytic bacteria, subchronic toxicity, toxicity

1 Mở đầu

Thử nghiệm độc tính là một bước không thể thiếu trong quá trình phát triển các dược liệu mới nhằm đánh giá mức độ an toàn trước khi tiến hành các nghiên cứu sâu hơn trên người [1]. Trong đó, thử nghiệm độc tính bán trường diễn đóng vai trò đặc biệt quan trọng đối với các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên, giúp sàng lọc các ứng viên tiềm năng và loại trừ những chất có nguy cơ gây độc khi sử dụng kéo dài. Khác với thử nghiệm độc tính cấp – chỉ đánh giá ảnh hưởng sau một lần hoặc trong thời gian rất ngắn, thử nghiệm độc tính bán trường diễn cho phép theo dõi các tác động tiềm ẩn của chất thử khi được sử dụng liên tục trong thời gian trung hạn, thường từ 28 đến 90 ngày. Thông qua đó, các rối loạn về huyết học, sinh hóa, chức năng gan – thận cũng như các biến đổi mô học ở các cơ quan đích có thể được phát hiện, cung cấp cơ sở khoa học quan trọng để xác định liều không gây độc và ước tính liều dùng an toàn trên người [1,2]. Đối với các sản phẩm có nguồn gốc từ vi sinh vật hoặc dược liệu tự nhiên – vốn có đặc tính đa thành phần và khả năng tích lũy sinh học – việc đánh giá độc tính bán trường diễn càng trở nên cần thiết nhằm đảm bảo tính an toàn khi sử dụng lâu dài [3,4].

Trong bối cảnh tỷ lệ mắc các bệnh mạn tính, ung thư và các rối loạn liên quan đến stress oxy hóa ngày càng gia tăng, nhu cầu sử dụng các hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên để hỗ trợ điều trị và phòng ngừa bệnh đang ngày càng được quan tâm [5]. Tuy nhiên, việc khai thác quá mức nguồn dược liệu từ thực vật đã dẫn đến nguy cơ cạn kiệt

tài nguyên, ảnh hưởng nghiêm trọng đến đa dạng sinh học và tính bền vững. Do đó, việc tìm kiếm các nguồn nguyên liệu thay thế có khả năng sản xuất chủ động, ổn định và thân thiện với môi trường đang trở thành một trong những hướng nghiên cứu ưu tiên hiện nay.

Trong những năm gần đây, vi khuẩn nội sinh – nhóm vi sinh vật sống cộng sinh trong mô thực vật mà không gây hại cho vật chủ – đã nổi lên như một nguồn sinh học đầy tiềm năng [6,7]. Các vi khuẩn này không chỉ có khả năng tổng hợp các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học tương tự hoặc thậm chí vượt trội so với cây chủ, mà còn dễ nuôi cấy và có thể sản xuất hoạt chất ở quy mô lớn trong điều kiện phòng thí nghiệm [8,9]. Nhờ những ưu điểm này, vi khuẩn nội sinh được xem là một “nhà máy sinh học” triển vọng trong công nghệ sản xuất dược liệu hiện đại.

Trong số các vi khuẩn nội sinh đã được nghiên cứu, chi *Bacillus* nhận được sự quan tâm đặc biệt nhờ khả năng tổng hợp đa dạng các hợp chất có hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, chống oxy hóa, kháng viêm và chống ung thư [7,10]. Nhiều loài như *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* và *Bacillus velezensis* đã được ghi nhận có khả năng sản xuất các lipopeptid, polyketid và enzyme sinh học có giá trị dược lý cao [11–14]. Bên cạnh đó, nhiều chủng thuộc chi *Bacillus* được đánh giá có độ an toàn cao và đã được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm. Do đó, việc khai thác các hoạt chất từ vi khuẩn nội sinh thuộc chi *Bacillus*, kết hợp với đánh giá độc tính bán trường diễn, là

cần thiết nhằm cung cấp thêm bằng chứng khoa học về tính an toàn, phục vụ cho định hướng phát triển và ứng dụng trong dược học.

Trong các nghiên cứu trước đây, cao chiết ethyl acetate từ vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp. DO-R5 (BaDO-R5) đã được chứng minh sở hữu nhiều hoạt tính sinh học nổi bật, bao gồm khả năng chống oxy hóa mạnh, ức chế các enzyme liên quan đến đái tháo đường và cải thiện tình trạng tăng đường huyết trên mô hình động vật [15]. Bên cạnh đó, thử nghiệm độc tính cấp đường uống cho thấy cao BaDO-R5 có độ an toàn cao với LD₅₀ (Lethal Dose 50%) lớn hơn 5000 mg/kg thể trọng [16]. Tuy nhiên, các dữ liệu về hoạt tính sinh học và độc tính cấp tính vẫn chưa đủ để khẳng định mức độ an toàn khi sử dụng kéo dài. Vì vậy, việc đánh giá độc tính bán trường diễn của cao BaDO-R5 ở liều có hiệu quả sinh học là bước cần thiết nhằm hoàn thiện hồ sơ an toàn tiền lâm sàng và làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu phát triển tiếp theo.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. DO-R5 được sử dụng để tạo ra cao chiết phục vụ đánh giá độc tính bán trường diễn. Đây là một dòng vi khuẩn nội sinh đã được nhóm nghiên cứu phân lập trước đó từ phần rễ của cây Sở trai (*Dillenia ovata*). Dòng vi khuẩn này hiện đang được bảo quản và lưu giữ tại Khoa Y, Trường Đại học Nam Cần Thơ. Thông tin định danh của *Bacillus* sp. DO-R5 đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu GenBank của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI), với mã số PQ533190 được cấp vào ngày 30 tháng 10 năm 2024.

Khi được cấy trên môi trường potato dextrose agar (PDA) trong 24 giờ, dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. DO-R5 hình thành khuẩn lạc có đường kính khoảng 5 mm, màu trắng ngà, bìa răng cưa,

không tròn và bề mặt phẳng. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy tế bào vi khuẩn có hình dạng que với kích thước khoảng 0,45 μm \times 1,12 μm và thuộc nhóm Gram dương [15].

Nghiên cứu sử dụng chuột nhắt trắng (*Mus musculus*) đực khỏe mạnh, có khối lượng cơ thể dao động từ 18–22 g. Chuột được cung cấp bởi Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh và được nuôi dưỡng tại Phòng thí nghiệm Động vật, Khoa môn Sinh học, Trường Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ. Sau giai đoạn thích nghi, chuột thí nghiệm được đánh số và phân nhóm ngẫu nhiên vào các nghiệm thức, mỗi nhóm gồm 7 cá thể, nhằm đảm bảo tính khách quan và hạn chế sai lệch trong bố trí thí nghiệm. Các nhóm chuột được nuôi trong chuồng thủy tinh có kích thước 25 \times 20 \times 15 cm, đặt ở nhiệt độ phòng với chế độ chiếu sáng luân phiên 12 giờ sáng – 12 giờ tối. Chuột được cho ăn theo khẩu phần tiêu chuẩn dành cho động vật thí nghiệm và được cung cấp nước uống tự do trong suốt thời gian nghiên cứu.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy và điều chế cao chiết từ vi khuẩn *Bacillus* sp. DO-R5

Dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. DO-R5 được nuôi cấy sơ cấp trong môi trường lỏng potato dextrose broth (PDB) ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ, với pH khởi đầu là 7 và tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau thời gian này, dịch nuôi tăng sinh được điều chỉnh đến mật độ quang học OD₆₀₀=0,5 nhằm chuẩn hóa sinh khối vi khuẩn. Từ dịch này, một thể tích tương đương 2% được cấy vào bình tam giác chứa 250 mL môi trường PDB có pH ban đầu 7,5 và tiếp tục nuôi ở 38°C trong 70,5 giờ, lắc đều ở tốc độ 200 vòng/phút [15].

Khi đạt thời gian nuôi cấy tối ưu (70,5 giờ, đây là thời gian nuôi cấy tối ưu để dòng vi khuẩn sản sinh polyphenol và flavonoid đã được công bố trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi), được xác định dựa trên kết quả tối ưu hóa điều

kiện nuôi cấy [15] nhằm thu nhận hàm lượng hợp chất có hoạt tính sinh học cao nhất và ổn định, dịch nuôi được thu nhận và ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút để tách bỏ tế bào vi khuẩn, thu được phần dịch ngoại bào. Dịch ngoại bào sau đó được chiết xuất bằng phương pháp lỏng-lỏng với dung môi ethyl acetate theo tỷ lệ thể tích 1:1. Sau quá trình chiết, lớp dung môi được cô quay để thu nhận cao ethyl acetate của chủng *Bacillus* sp. DO-R5, được gọi tắt là cao BaDO-R5. Cao chiết này được bảo quản trong lọ thủy tinh kín ở nhiệt độ 4°C để sử dụng trong các thử nghiệm tiếp theo.

Đánh giá độc tính bán trường diễn của cao BaDO-R5

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn của cao BaDO-R5 được tiến hành theo hướng dẫn của Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT năm 2015 về tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu” do Cục trưởng Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo ban hành [17], kết hợp với hướng dẫn OECD 408 (Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents) [18].

Cao BaDO-R5 được cho chuột uống với liều cố định 400 mg/kg thể trọng/ngày. Liều 400 mg/kg thể trọng/ngày được lựa chọn cho thử nghiệm độc tính bán trường diễn dựa trên các kết quả đã công bố trước đó của nhóm tác giả. Cụ thể, trong thử nghiệm độc tính cấp đường uống, cao chiết BaDO-R5 không ghi nhận tử vong hoặc biểu hiện độc tính rõ rệt ở liều 5000 mg/kg thể trọng, cho thấy cao chiết có độ an toàn cấp tính cao [16]. Đồng thời, trong các nghiên cứu đánh giá hoạt tính hỗ trợ điều trị đái tháo đường, liều 400 mg/kg cho thấy hiệu quả sinh học rõ rệt [15]. Do đó, liều 400 mg/kg được lựa chọn nhằm đánh giá nguy cơ độc tính tích lũy khi sử dụng lặp lại trong thời gian dài, trên cơ sở vừa có hiệu quả sinh học vừa bảo đảm an toàn. Thời gian thử nghiệm kéo dài 90 ngày liên tục, trong đó mốc 45 ngày được sử dụng

như thời điểm đánh giá trung gian, nhằm theo dõi sớm các biến đổi sinh lý và sinh hóa, còn 90 ngày là điểm kết thúc chính của thử nghiệm độc tính bán trường diễn. Việc đánh giá tại hai mốc thời gian 45 ngày và 90 ngày được thực hiện trên hai nhóm chuột độc lập. Do các xét nghiệm sinh hóa và huyết học yêu cầu lấy máu tim, chuột được gây mê và giải phẫu tại từng thời điểm thu mẫu, nên không thể theo dõi lặp lại trên cùng một cá thể.

Trong suốt quá trình thí nghiệm, các chỉ tiêu về trạng thái sinh lý (lông và da, mắt, nước bọt, hô hấp, đi tiểu, phân, hoạt động, ngủ, co giật, run, hôn mê và tử vong) của chuột được theo dõi và ghi nhận định kỳ. Tại các thời điểm 45 và 90 ngày, khối lượng cơ thể và khối lượng các cơ quan (gan, thận, lách) được xác định để tính tỷ lệ gia tăng khối lượng cơ thể (%) và tỷ lệ khối lượng cơ quan so với khối lượng cơ thể (%).

Ngoài ra, mẫu máu tim được thu nhận để phân tích các chỉ tiêu sinh hóa bao gồm glucose huyết, chức năng gan (SGOT (Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase), SGPT (Serum Glutamic Pyruvic Transaminase)), chức năng thận (urea, creatinine), lipid huyết (TC, TG, LDL-C, HDL-C) và các chỉ tiêu huyết học bằng máy sinh hóa tự động TOYOBO TYB-18 (Furuno Electric Co., Ltd., Nhật Bản) và máy phân tích huyết học tự động BC-20s (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Trung Quốc), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các chỉ số VLDL-C, AIP, AC, CRR và CPI được tính toán theo công thức đã công bố của Friedewald và cộng sự [19] và Oršolic và cộng sự [20].

Xử lý và phân tích dữ liệu

Các số liệu trong nghiên cứu được lưu trữ và xử lý sơ bộ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016, sau đó phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình (Mean) ± độ lệch chuẩn (SD).

Phân tích phương sai một nhân tố (one-way ANOVA), kết hợp với phép thử hậu nghiệm Tukey, được sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa các nhóm. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Nuôi cấy, điều chế cao BaDO-R5

Dòng vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp. DO-R5 được nuôi cấy trong điều kiện đã thiết lập trước đó (xem mục 2.2) với tổng thể tích môi trường lên tới 50 L. Sau giai đoạn nuôi cấy, dịch nuôi được xử lý bằng cách ly tâm để loại bỏ sinh khối tế bào, thu lấy phần dịch ngoại bào. Dịch này sau đó được tiến hành chiết xuất theo phương pháp lỏng–lỏng với dung môi ethyl acetate để tách các hợp chất hoạt tính thứ cấp.

Dung môi ethyl acetate chứa các hợp chất chiết được đem đi cô quay chân không nhằm loại bỏ hoàn toàn dung môi, từ đó thu được cao chiết ethyl acetate, gọi tắt là BaDO-R5. Khối lượng cao

thu được là 16,09 gram, có trạng thái đặc, màu vàng ánh đồng và tỏa mùi thơm đặc trưng. Cao chiết này được bảo quản trong điều kiện lạnh (4°C) cho các bước phân tích và đánh giá độc tính.

3.2 Độc tính bán trường diễn của cao BaDO-R5

Đánh giá độc tính là một bước thiết yếu trong tiến trình phát triển các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học. Trong khi thử nghiệm độc tính cấp thường được sử dụng ở giai đoạn sàng lọc ban đầu, thì nghiên cứu độc tính bán trường diễn đóng vai trò đánh giá nguy cơ ảnh hưởng khi sản phẩm được sử dụng lặp lại và kéo dài ở liều có hiệu quả sinh học. Cao BaDO-R5 được khảo sát độc tính bán trường diễn trên mô hình động vật. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn giúp xác định chế độ liều lượng thích hợp cho các nghiên cứu trong thời gian dài. Trong nghiên cứu này, độc tính bán trường diễn của cao BaDO-R5 được đánh giá ở chuột với liều 400 mg/kg/ngày trong 45 và 90 ngày.

Bảng 1. Mô hình hành vi của chuột được đánh giá khi sử dụng cao BaDO-R5 liều 400 mg/kg khối lượng chuột ở thời điểm 45 và 90 ngày

Chi tiêu	Độc tính bán trường diễn (45 ngày)		Độc tính bán trường diễn (90 ngày)	
	Bình thường	BaDO-R5, 400	Bình thường	BaDO-R5, 400
Lông và da	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Đôi mắt	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Nước bọt	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Hô hấp	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Đi tiểu (màu)	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu	Vàng nâu
Phân	Nâu đen	Nâu đen	Nâu đen	Nâu đen
Hoạt động	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Ngủ	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Co giật và run	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện
Ngứa	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện
Hôn mê	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện
Tử vong	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện	Chưa phát hiện

Kết quả trình bày trong Bảng 1 cho thấy rằng, trong suốt quá trình thử nghiệm kéo dài 45 và 90 ngày, việc sử dụng cao ethyl acetate từ vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp. DO-R5 (cao BaDO-R5) không gây ra bất kỳ biểu hiện bất thường nào về hành vi hay sinh lý bên ngoài ở chuột thí nghiệm.

Tất cả các chỉ tiêu như tình trạng lông và da, mắt, hô hấp, hoạt động, ngủ, và bài tiết đều được ghi nhận là bình thường, không có dấu hiệu bất thường như rụng lông, thay đổi màu da, chảy nước mắt, rối loạn hô hấp hoặc thay đổi tính khí. Ngoài ra, phân và nước tiểu có màu sắc bình thường (nâu đen và vàng nâu tương ứng), không ghi nhận biểu hiện của rối loạn tiêu hóa hay suy giảm chức năng bài tiết.

Đặc biệt, không xuất hiện các triệu chứng nguy hiểm như co giật, run, ngứa, hôn mê hay tử vong ở bất kỳ nhóm chuột nào sau thời gian phơi nhiễm dài ngày. Điều này là minh chứng quan trọng cho thấy cao BaDO-R5 không gây độc tính cấp diễn hay bán trường diễn rõ rệt đến hệ thần kinh hoặc hệ điều hòa sinh lý cơ bản khi sử dụng bằng đường uống ở liều lượng khảo sát. Những kết quả này cũng gợi ý rằng liều 400 mg/kg/ngày là tương đối an toàn trong điều kiện thử nghiệm tiền lâm sàng kéo dài và có thể là cơ sở để đề xuất liều sử dụng cho các nghiên cứu sâu hơn.

Hình 1 trình bày ảnh chụp lách (A), thận (B) và gan (C) của chuột thí nghiệm sau khi được uống cao BaDO-R5 liều 400 mg/kg/ngày trong thời gian 90 ngày, so sánh với nhóm chuột đối chứng không xử lý. Quan sát bằng mắt thường cho thấy không có sự khác biệt rõ rệt về màu sắc, hình dạng, thể tích hay độ chắc của các cơ quan giữa nhóm chuột dùng cao BaDO-R5 và nhóm chuột đối chứng sinh lý (bình thường). Cụ thể: Lách (Hình 1A): Không ghi nhận dấu hiệu sưng, xuất huyết dưới vỏ hay thay đổi màu sắc bất thường. Hình thái lách đều, kích thước cân đối, bề mặt trơn láng, cho thấy không có phản ứng viêm

hay quá trình tăng sinh bất thường xảy ra tại cơ quan lympho này; Thận (Hình 1B): Cả hai quả thận đều giữ nguyên hình dạng hạt đậu đặc trưng, màu đỏ nâu đồng đều, không xuất hiện điểm xuất huyết, phù hay teo nhỏ. Điều này cho thấy chức năng lọc thải và cấu trúc mô thận không bị ảnh hưởng rõ rệt bởi việc sử dụng cao BaDO-R5 trong thời gian dài; Gan (Hình 1C): Gan chuột ở cả hai nhóm có màu nâu đỏ đặc trưng, ranh giới các thùy rõ ràng, không có dấu hiệu hoại tử, xơ hóa hay xuất huyết. Đây là một chỉ báo quan trọng cho thấy gan không bị nhiễm độc hoặc chịu áp lực quá tải từ chuyển hóa chất lạ trong quá trình xử lý cao chiết.

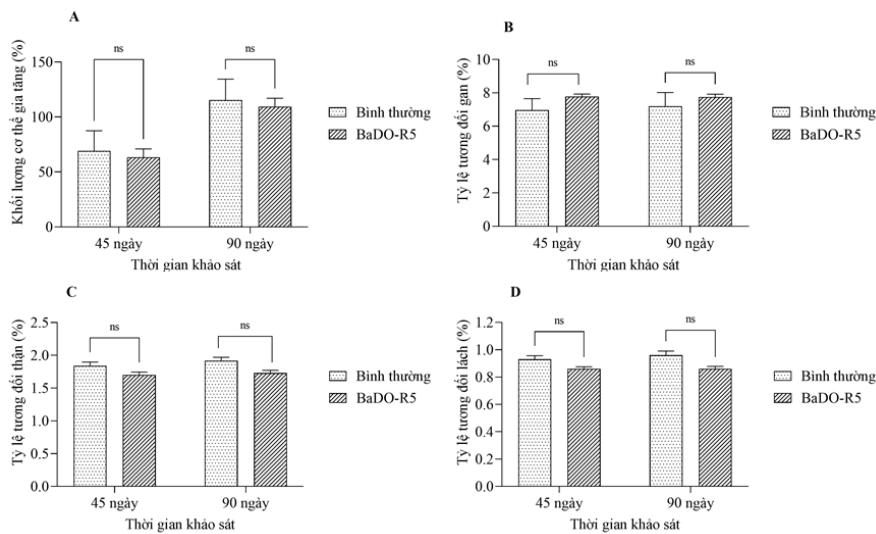


Hình 1. Hình thái lách (A), thận (B) và gan (C) chuột thử nghiệm

Ghi chú: (1') là chuột bình thường; (2') là chuột uống cao BaDO-R5 liều 400 mg/kg khối lượng chuột 90 ngày

Tổng thể, kết quả quan sát đại thể không ghi nhận tổn thương thực thể đáng chú ý nào trên ba cơ quan đích chính (gan, thận, và lách) sau khi sử dụng cao BaDO-R5 trong thời gian dài. Kết quả này củng cố cho các số liệu sinh lý và hành vi đã trình bày ở Bảng 1, góp phần khẳng định tính an toàn về mặt đại thể của cao BaDO-R5 trong điều kiện thử nghiệm bán trường diễn.

Tuy nhiên, đánh giá đại thể chỉ mang tính gợi ý ban đầu. Để khẳng định chắc chắn không có tổn thương hoặc rối loạn chức năng, cần kết hợp với phân tích các chỉ số sinh hóa chuyên sâu, được trình bày chi tiết ở các phần tiếp theo.



Hình 2. Tỷ lệ gia tăng khối lượng cơ thể và tỷ lệ khối lượng cơ quan (gan, thận, lách) so với khối lượng cơ thể chuột sau 45 và 90 ngày sử dụng cao BaDO-R5 liều 400 mg/kg/ngày (n=7)

Các chỉ tiêu sinh lý bao gồm tỷ lệ tăng khối lượng cơ thể (Hình 2A), tỷ lệ khối lượng gan/cơ thể (Hình 2B), thận/cơ thể (Hình 2C) và lách/cơ thể (Hình 2D) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm chuột bình thường và nhóm sử dụng cao BaDO-R5 trong cả hai giai đoạn 45 và 90 ngày. Tỷ lệ tăng khối lượng cơ thể ổn định cho thấy cao chiết không ảnh hưởng đến quá trình hấp thu, chuyển hóa hoặc tăng trưởng của chuột. Tỷ lệ khối lượng gan và thận so với cơ thể duy trì trong giới hạn sinh lý bình thường, gợi ý rằng hai cơ quan chuyển hóa và bài tiết chính không bị phì đại hoặc teo nhỏ bất thường do tác động độc tính. Tương tự, tỷ lệ khối lượng lách/cơ thể không thay đổi đáng kể, phản ánh rằng cao chiết không gây kích hoạt miễn dịch quá mức hoặc tăng sinh mô lympho. Những kết quả này cho thấy cao BaDO-R5 không ảnh hưởng bất lợi đến sự phát triển và chức năng cơ quan của chuột khi sử dụng kéo dài, góp phần củng cố tính an toàn của cao chiết trong điều kiện thử nghiệm bán trường diễn.

Chỉ số glucose huyết phản ánh khả năng duy trì cân bằng nội môi glucose và là chỉ dấu quan trọng trong đánh giá nguy cơ rối loạn chuyển hóa. Kết quả trình bày trong Bảng 2 cho

thấy, sau 45 ngày sử dụng cao BaDO-R5, mức glucose huyết của nhóm chuột uống cao BaDO-R5 là $113,66 \pm 4,08$ mg/dL, cao hơn nhẹ so với nhóm chuột bình thường (đối chứng sinh lý) ($104,14 \pm 5,92$ mg/dL). Tuy nhiên, giá trị vẫn nằm trong giới hạn sinh lý bình thường của chuột thí nghiệm, không vượt ngưỡng nguy cơ tăng đường huyết. Tương tự, sau 90 ngày, hàm lượng glucose huyết ở nhóm sử dụng cao BaDO-R5 là $117 \pm 5,4$ mg/dL so với $112,11 \pm 6,55$ mg/dL ở nhóm chuột bình thường, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Những số liệu này cho thấy mặc dù có sự dao động nhỏ, cao BaDO-R5 không gây tăng đường huyết kéo dài hay rối loạn chuyển hóa glucose khi sử dụng liên tục trong thời gian dài. Điều này chứng tỏ cao chiết không ảnh hưởng tiêu cực đến chức năng điều hòa glucose, từ đó góp phần khẳng định tính an toàn chuyển hóa của cao BaDO-R5 trong điều kiện thử nghiệm bán trường diễn.

Số lượng hồng cầu (RBC), bạch cầu (WBC), tiểu cầu (PLT), cùng các chỉ số liên quan như HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC đều nằm trong khoảng bình thường, không có sự biến động bất thường giữa các nhóm (Bảng 2). Tỷ lệ các dòng bạch cầu (NEU, LYM, MONO, EOS) ổn định,

không ghi nhận dấu hiệu của quá trình viêm cấp hay phản ứng dị ứng hệ thống. Tỷ lệ LYM chiếm ưu thế trong tổng số bạch cầu là đặc điểm sinh lý bình thường của chuột nhắt (*Mus musculus*), khác với hệ huyết học của người, do đó không được xem là dấu hiệu bất thường [21-23]. Mặc dù máy phân tích huyết học tự động được thiết kế chủ yếu cho mẫu máu người, thiết bị này vẫn được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu tiền lâm sàng nhằm so sánh tương đối giữa các nhóm [21-23]. Trong nghiên cứu này, không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về các chỉ số huyết học giữa nhóm đối chứng và nhóm xử lý, cho thấy cao BaDO-R5 không ảnh hưởng bất lợi đến hệ tạo máu. Đáng chú ý, chỉ số MCH ở nhóm xử lý sau 45 ngày có xu hướng tăng nhẹ, tuy nhiên vẫn nằm

trong giới hạn sinh lý và không biểu hiện thành bất thường chức năng. Kết quả này cho thấy cao BaDO-R5 không ảnh hưởng tiêu cực đến chức năng tạo máu và miễn dịch ở chuột khi sử dụng lặp lại trong thời gian dài.

Về chỉ số chức năng gan, hoạt độ SGPT ở nhóm xử lý sau 45 ngày giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng, trong khi SGOT không thay đổi đáng kể ($p>0,05$). Điều này gợi ý tiềm năng bảo vệ gan hoặc ít nhất không gây tổn thương gan của cao BaDO-R5.

Chỉ số chức năng thận (urea và creatinine) không có sự biến động đáng kể giữa các nhóm, phản ánh cơ quan bài tiết không bị ảnh hưởng độc tính rõ rệt trong quá trình sử dụng cao chiết.

Bảng 2. Các chỉ số sinh lý và sinh hóa đánh giá độc tính bán trường diễn của cao chiết BaDO-R5 trên chuột thí nghiệm

Chi tiêu	Độc tính bán trường diễn (45 ngày)		Độc tính bán trường diễn (90 ngày)	
	Đối chứng	BaDO-R5	Đối chứng	BaDO-R5
Glucose huyết (mg/dL)	104,14 ^b ±5,92	113,66 ^a ±4,08	112,11 ^a ±6,55	117 ^a ±5,4
WBC (K/ μ L)	4,80 ^a ±0,39	4,95 ^a ±0,65	5,09 ^a ±0,60	4,94 ^a ±0,84
NEU (%)	3,75 ^a ±0,70	3,75 ^a ±0,63	4,04 ^a ±0,77	3,95 ^a ±0,56
LYM (%)	94,67 ^a ±2,14	90,63 ^a ±4,81	94,67 ^a ±2,14	91,20 ^a ±5,02
MONO (%)	1,70 ^a ±0,39	1,51 ^a ±0,48	2,27 ^a ±0,53	2,31 ^a ±0,39
EOS (%)	0,37 ^a ±0,08	0,41 ^a ±0,09	0,44 ^a ±0,05	0,51 ^a ±0,12
BASO (%)	1,70 ^a ±0,47	1,74 ^a ±0,45	2,56 ^a ±0,36	2,00 ^b ±0,17
RBC (M/ μ L)	9,02 ^a ±0,38	8,64 ^a ±0,78	9,45 ^a ±0,54	9,72 ^a ±0,91
HGB (g/L)	126,43 ^a ±8,72	131,43 ^a ±13,29	130,71 ^a ±8,38	136,14 ^a ±3,80
HCT (L/L)	0,45 ^a ±0,02	0,47 ^a ±0,05	0,48 ^a ±0,06	0,52 ^a ±0,03
MCV (fL)	54,67 ^a ±11,03	53,99 ^a ±1,66	52,39 ^a ±3,6	55,04 ^a ±2,64
MCH (pg)	14,07 ^b ±1,01	15,23 ^a ±0,63	14,50 ^a ±1,38	14,59 ^a ±0,97
MCHC (g/L)	279 ^a ±21,28	282,29 ^a ±10,06	274,71 ^a ±23,90	263,43 ^a ±23,74
PLT ($\times 10^3$ / μ L)	846 ^a ±94,95	860,43 ^a ±93,01	988,9 ^a ±58,4	1016 ^a ±109,3
Urea (mg/dL)	33,22 ^a ±1,61	34,60 ^a ±2,58	33,48 ^a ±1,73	34,17 ^a ±2,16
Creatinine (μ mol/L)	55,71 ^a ±8,94	52,14 ^a ±4,88	59,00 ^a ±7,81	57,14 ^a ±5,67
Cholesterol (mg/dL)	116,38 ^a ±18,57	119,14 ^a ±16,89	127,41 ^a ±18,38	134,58 ^a ±6,84

Chỉ tiêu	Độc tính bán trường diễn (45 ngày)		Độc tính bán trường diễn (90 ngày)	
	Đối chứng	BaDO-R5	Đối chứng	BaDO-R5
Triglycerid (mg/dL)	173,20 ^a ±16,84	179,52 ^a ±28,77	180,78 ^a ±19,02	176,86 ^a ±16,95
HDL cholesterol (mg/dL)	31,94 ^b ±4,38	37,84 ^a ±2,56	34,14 ^a ±2,85	32,65 ^a ±3,45
LDL cholesterol (mg/dL)	63,21 ^a ±6,44	69,44 ^a ±6,03	77,55 ^a ±3,39	81,41 ^a ±3,58
VLDL cholesterol (mg/dL)	34,64 ^a ±3,38	35,90 ^a ±5,76	36,16 ^a ±3,80	35,37 ^a ±3,39
Atherogenic index of plasma (AIP)	0,74 ^a ±0,06	0,67 ^a ±0,09	0,72 ^a ±0,05	0,73 ^a ±0,05
Atherogenic coefficient (AC)	2,71 ^a ±0,89	2,16 ^a ±0,46	2,75 ^a ±0,61	3,15 ^a ±0,30
Cardiac risk ratio (CRR)	3,72 ^a ±0,89	3,16 ^a ±0,46	3,75 ^a ±0,62	4,15 ^a ±0,30
Cardioprotective index (CPI)	0,51 ^a ±0,11	0,55 ^a ±0,05	0,44 ^a ±0,03	0,40 ^a ±0,05
SGPT (U/L)	77,57 ^a ±6,32	67,45 ^b ±9,67	80,43 ^a ±6,828	74,00 ^a ±7,70
SGOT (U/L)	116,86 ^a ±10,98	122,14 ^a ±10,02	119,71 ^a ±11,04	121,14 ^a ±5,15

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một hàng giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. WBC: White Blood Cell-Số lượng bạch cầu trong một thể tích máu; NEU: Neutrophil-Bạch cầu trung tính; LYM: Lymphocyte-Bạch cầu Lympho; MONO: Monocyte-Bạch cầu Mono; EOS: Eosinophils-Bạch cầu ưa acid, BASO: Basophils-Bạch cầu ưa kiềm, RBC: Red Blood Cell-Số lượng hồng cầu trong một thể tích máu; HGB: Hemoglobin-Lượng huyết sắc tố trong một thể tích máu; HCT: Hematocrit-Tỷ lệ thể tích hồng cầu trên thể tích máu toàn phần, MCV: Mean corpuscular volume-Thể tích trung bình của một hồng cầu, MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin-Lượng huyết sắc tố trung bình trong một hồng cầu; MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration-Nồng độ trung bình của huyết sắc tố hemoglobin trong một thể tích máu, PLT: Platelet Count-Số lượng tiểu cầu trong một thể tích máu.

Các thành phần lipid huyết bao gồm cholesterol toàn phần, triglyceride, LDL-C, HDL-C và VLDL-C đều dao động trong phạm vi bình thường, không ghi nhận sự gia tăng bất thường. Các chỉ số đánh giá nguy cơ tim mạch như Atherogenic Index of Plasma (AIP), Atherogenic Coefficient (AC), Cardiac Risk Ratio (CRR) và Cardioprotective Index (CPI) không thay đổi có ý nghĩa, cho thấy cao BaDO-R5 không gây rối loạn chuyển hóa lipid cũng như không làm gia tăng nguy cơ xơ vữa hoặc bệnh tim mạch trên mô hình chuột. Tóm lại, dữ liệu từ Bảng 2 khẳng định rằng cao chiết ethyl acetate từ vi khuẩn *Bacillus* sp. DO-R5 không gây độc tính đáng kể trên các chỉ số sinh lý, huyết học và sinh hóa khi sử dụng liên tục trong thời gian 45 và 90 ngày ở liều 400 mg/kg. Những kết quả này góp phần củng cố nền tảng an toàn tiền lâm sàng của dòng vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp. DO-R5 và tạo tiền đề cho việc phát triển các chế phẩm sinh học ứng dụng trong y học và thực phẩm chức năng.

Khi phân tích toàn diện các dữ liệu thu được, có thể thấy rằng cao ethyl acetate từ vi khuẩn *Bacillus* sp. DO-R5 (BaDO-R5) không gây ra bất kỳ biểu hiện bất thường nào về hành vi và sinh lý học trong suốt quá trình sử dụng kéo dài, điều này được củng cố bởi các quan sát mô đại thể cho thấy gan, thận và lách duy trì hình thái bình thường, không xuất hiện tổn thương rõ rệt. Đồng thời, các chỉ số sinh lý (tăng trưởng cơ thể, tỷ lệ khối lượng cơ quan) và huyết học (RBC, WBC, HGB, PLT...) ổn định, phản ánh rằng cao BaDO-R5 không ảnh hưởng đến hệ thống tạo máu và miễn dịch. Sự ổn định của các thông số sinh hóa, đặc biệt là men gan (SGOT, SGPT), creatinine, urea và lipid huyết, cho thấy chức năng gan thận và chuyển hóa nội môi được bảo toàn. Việc không ghi nhận sự gia tăng bất thường ở các chỉ số nguy cơ tim mạch như AIP, AC, CRR hay CPI cũng cho thấy cao BaDO-R5 không gây rối loạn chuyển hóa lipid trong điều kiện sử dụng lặp lại. Như vậy, sự nhất quán giữa dữ liệu hành

vi, mô học và sinh hóa tạo nên một chuỗi bằng chứng rõ ràng cho thấy cao BaDO-R5 không gây độc tính bán trường diễn trên mô hình chuột, mở ra triển vọng ứng dụng an toàn trong y dược học.

Khi đặt các kết quả của nghiên cứu này trong mối liên hệ với các công bố trước đây về cao BaDO-R5, có thể nhận thấy sự nhất quán giữa hoạt tính sinh học và tính an toàn. Mặc dù cao BaDO-R5 đã được chứng minh có hoạt tính chống oxy hóa và điều hòa chuyển hóa mạnh trên các mô hình *in vitro* và *in vivo*, việc sử dụng lặp lại ở liều có hiệu quả sinh học không gây ra các biến đổi bất lợi về hành vi, huyết học, sinh hóa hay hình thái cơ quan. Điều này cho thấy các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cao BaDO-R5 không có xu hướng tích lũy gây độc và vẫn duy trì được biên độ an toàn sinh học khi sử dụng kéo dài. Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế, bao gồm việc chỉ khảo sát trên chuột đực với một mức liều duy nhất, chưa đánh giá mối quan hệ liều – đáp ứng, chưa xem xét sự khác biệt giới tính, cũng như chưa thực hiện phân tích mô học và các chỉ dấu phân tử liên quan đến stress oxy hóa hoặc viêm. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo với nhiều mức liều, trên cả chuột đực và cái, kết hợp đánh giá mô học và cơ chế phân tử, sẽ cần thiết để hoàn thiện hơn hồ sơ an toàn tiền lâm sàng của cao BaDO-R5.”

4 Kết luận

Nghiên cứu này đã tiến hành đánh giá độc tính bán trường diễn của cao chiết ethyl acetate từ dòng vi khuẩn *Bacillus* sp. DO-R5 (BaDO-R5) được phân lập từ rễ cây Sỗ trai trên mô hình chuột nhắt trắng với liều cố định 400 mg/kg/ngày trong thời gian 45 và 90 ngày. Kết quả cho thấy, BaDO-R5 không gây ra biểu hiện bất thường nào về hành vi, sinh lý hay tỷ lệ tử vong ở chuột. Quan sát đại thể của gan, thận và lách không có thay đổi đáng kể, các chỉ số huyết học và sinh hóa (bao gồm chức năng gan, thận, đường huyết, lipid

máu và các chỉ số nguy cơ tim mạch như AIP, AC, CRR, CPI) đều nằm trong giới hạn sinh lý bình thường. Những dữ liệu này cho thấy rằng BaDO-R5 không gây ảnh hưởng xấu đến chức năng cơ quan đích cũng như không làm rối loạn chuyển hóa nội môi khi sử dụng kéo dài. Do đó, có thể kết luận rằng cao chiết ethyl acetate từ *Bacillus* sp. DO-R5 không gây độc tính rõ rệt trong điều kiện thử nghiệm bán trường diễn, góp phần hoàn thiện hồ sơ an toàn tiền lâm sàng của cao chiết này.

Tuyên bố về đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này là một phần của đề tài “Study on plant endophytic bacteria and evaluation of their biological activities related to oxidative stress”, đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu động vật – Đại học Cần Thơ phê duyệt theo mã số CTU-AEC25029.

Tài liệu tham khảo

1. Jităreanu A, Trifan A, Vieriu M, Caba IC, Martu I, Agoroaei LJP. Current Trends in Toxicity Assessment of Herbal Medicines: A Narrative Review. *Processes*. 2022;11(1):83.
2. Parasuraman S. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2011;2(2):74-9.
3. Han J-S, Back S-M, Cho J-W, Park HJ, Kim W-J, Park S-H, et al. Genotoxicity and subchronic general toxicity assessments of *Lactobacillus curvatus* WiKim 38 using Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;152:112199.
4. Bemidinezhad A, Zojaji SA, Taraz Jamshidi S, Mohammadi M, Alavi MS, Ghorbani A. Evaluation of acute, subacute, and subchronic toxicity of a hepatoprotective herbal formulation. *Toxicology Reports*. 2023;11:452-9.
5. Chandimali N, Bak SG, Park EH, Lim H-J, Won Y-S, Kim E-K, et al. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discovery*. 2025;11(1):19.
6. Tran LC, Duc CKT, Pham DT, Dai TTX, Nguyen TT. Bioprospecting endophytic bacteria in *Curcuma*

- zedoaria* for *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory potentials. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2025;9(5):2299-2306.
7. Tran LC, Duc CKT, Nguyen TT, Pham DT, Phan DK, Dai TTX, et al. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of *Bacillus* sp. CZ-Rh4, CZ-Rh7, and CZ-L11 extracts. *Egyptian Journal of Botany*. 2025;65(3):557-566.
 8. Singh M, Kumar A, Singh R, Pandey KD. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech*. 2017;7(5):315.
 9. Tripathi A, Pandey P, Tripathi SN, Kalra A. Perspectives and potential applications of endophytic microorganisms in cultivation of medicinal and aromatic plants. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:985429.
 10. Alwaili M, Alshehri M, Abdulrahman T, Albaqami F, Alghamdi A, Albureikan M, et al. Broad-spectrum bioactivities of a sulfated heteropolysaccharide from *Bacillus tequilensis* MYG163: antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antimicrobial, and antibiofilm properties. *Journal of Taibah University for Science*, 2025;19(1):2447151.
 11. Gao Z, Wu C, Wu J, Zhu L, Gao M, Wang Z, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of an aminoglycan-rich exopolysaccharide from the submerged fermentation of *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;220(1):1010-1020.
 12. Zhang J, Zhang R, Wang J, Abbas Z, Tong Y, Fang Y, et al. Efficient production strategy of a novel postbiotic produced by *Bacillus subtilis* and its antioxidant and anti-inflammatory effects. *Molecules*. 2025;30(10):2089.
 13. Pachiappan P, Vasudhevan P, Govindasamy B, Dhayalan A, Nadeem A, Jayanthi P, et al. Fish gut symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis*: RSM optimization for its extracellular lipase enzyme production, lipase-protein purification, characterization, and docking analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025;301:140428.
 14. Rabbee M, Baek K. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules*. 2020;25(21):4973.
 15. Tran LC, Duc CKT, Nguyen TT, Pham DT, Luu DT, Dai TTX. Investigating a new *Dillenia ovata* endophytic bacteria to produce antioxidants and anti-diabetes activity *in vitro* and *in vivo*. *Biotechnology Reports*. 2025;48:e00921.
 16. Tran CL, Nguyen TT, Dai TTX. Preclinical study on the acute toxicity of the crude extract from *Bacillus* sp. DO-R5 in an animal model. *TNU Journal of Science and Technology*. 2023;231(01):404-412.
 17. Department of Science, Technology and Training, Ministry of Health. Decision No. 141/QĐ-K2ĐT: Decision on promulgation of professional documents" Guidance on pre-clinical and clinical testing of oriental medicines and drugs from medicinal herbs. Hanoi: Department of Science, Technology and Training, Ministry of Health; 2015.
 18. Organization of Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris: OECD; 2018.
 19. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;18(6):499-502.
 20. Oršolić N, Landeka Jurčević I, Đikić D, Rogić D, Odeh D, et al. Effect of propolis on diet-induced hyperlipidemia and atherogenic indices in mice. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(6):156-167.
 21. Silva-Santana G, Bax JC, Fernandes DCS, Bacellar DTL, Hooper C, Dias AASO, et al. Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 *Mus musculus*. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2020;3(4):304-315.
 22. O'Connell KE, Mikkola AM, Stepanek AM, Vernet A, Hall CD, Sun CC, et al. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comparative Medicine*. 2015;65(2):96-113.
 23. Everds NE. Hematology of the laboratory mouse. In: Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL, editors. *The Mouse in Biomedical Research*. 2nd ed. Volume III: History, wild mice, and genetics. Amsterdam: Academic Press; 2007. p. 133-170.