

TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA DỊCH CHIẾT METHANOL TỪ QUẢ DỨA DẠI (*Pandanus odoratissimus*) TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG DÒNG SWISS

Nhận bài:

24 – 11 – 2015

Chấp nhận đăng:

17 – 02 – 2016

<http://jshe.ued.udn.vn/>

Nguyễn Công Thùy Trâm

Tóm tắt: Tác dụng bảo vệ gan của cao chiết methanol quả dứa dại (*Pandanus odoratissimus*) đã được tiến hành nghiên cứu trên chuột Swiss được gây nhiễm độc bằng paracetamol. Chuột được uống cao chiết methanol (100, 200 và 300mg/kg thể trọng/ngày) trong 7 ngày, đến ngày thứ tám và thứ chín gây độc bằng paracetamol (liều 3g/kgP). Silymarin được sử dụng làm đối chứng tham chiếu. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết methanol quả *P.odoratissimus* có tác dụng chống lại sự tổn thương gan do paracetamol gây ra, gan của lô chuột uống liều 100mg/kg thể trọng/ngày được bảo vệ tốt hơn so với lô liều 200 và 300mg/kg thể trọng/ngày. Cao chiết methanol quả *P.odoratissimus* ở nồng độ 100mg/kg thể trọng/ngày có khả năng làm giảm 1,76 lần hoạt tính của enzyme aspartate amino transferase (AST), giảm 2,12 lần hoạt tính enzyme alanine amino transferase (ALT) trong huyết tương và giảm nồng độ malondialdehyd (MDA) trong thí nghiệm chống peroxyl hóa lipid màng tế bào so với nhóm chuột đối chứng bệnh lý.

Từ khóa: alanine amino transferase; aspartate amino transferase; chàm ruột malondialdehyd; peroxyl; *Phyllanthus acidus*.

1. Đặt vấn đề

Gan là cơ quan đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyên hóa vật chất của cơ thể. Một trong những chức năng chính của gan là tham gia vào quá trình giải độc gây ra bởi các chất nội sinh và ngoại sinh. Trong trường hợp bệnh lý hay do sự dư thừa quá mức các chất độc trong gan, các tế bào gan sẽ bị hủy hoại, dẫn đến các tổn thương và tổn thương không hồi phục trên gan như: xơ gan, làm mất chức năng giải độc... Bệnh gan là một trong những bệnh phổ biến trong cộng đồng. Có nhiều loại bệnh về gan trong đó thường gặp là những tổn thương gan gây ra bệnh viêm gan dẫn đến xơ gan và ung thư gan với nguyên nhân chủ yếu là do virus và bị nhiễm độc gan [4, 10, 11]

Mặc dù y học hiện đại có những bước tiến dài, các loại thuốc được tổng hợp sử dụng trong điều trị bệnh

gan đều có tác dụng kích thích chức năng gan, bảo vệ gan khỏi những tác động có hại và khởi động quá trình tái sinh tế bào gan (Boyd,1970). Tuy nhiên việc sử dụng các loại thuốc có nguồn gốc thảo dược để hỗ trợ và điều trị bệnh gan vẫn đang được các nhà khoa học chú ý đến nhằm hạn chế tác dụng phụ không mong muốn của thuốc có nguồn gốc tổng hợp gây ra.

Cây dứa dại (*Pandanus odoratissimus*) được sử dụng nhiều trong các bài thuốc dân gian để hỗ trợ điều trị các bệnh như bệnh phong ghẻ, giang mai, rối loạn tiết niệu, trị vàng da... Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tác động của cao chiết methanol từ quả dứa dại đến gan chuột bị gây tổn thương bởi paracetamol.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu thực vật

Quả Dứa dại được thu hái tại Duy Xuyên, Quảng Nam. Mẫu được xác định bằng việc khảo sát đặc điểm hình thái thực vật học dựa trên quan sát cây tươi. Mẫu

* Liên hệ tác giả

Nguyễn Công Thùy Trâm

Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng

Email: nctham@gmail.com

tiêu bản được lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm Di truyền – Giải phẫu sinh lý động vật, Khoa Sinh – Môi trường, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

Quả Dứa dại (2kg) được loại bỏ phần hỏng, rửa sạch, xay nhỏ ngâm chiết với methanol (3x1,5 lít) ở nhiệt độ phòng. Cô quay cất loại dung môi thu cao chiết tổng methanol (180g) (POME)

2.2. Nguyên liệu động vật

Chuột nhắt trắng dòng Swiss có khối lượng từ 20-25 gram, gồm cả hai giống đực và cái, được cung cấp bởi Viện Vaccin và Sinh phẩm Nha Trang, được nuôi trong cùng một điều kiện tại phòng Thí nghiệm Di truyền - Giải phẫu, sinh lý động vật, Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng. Chuột được cho ăn thức ăn tiêu chuẩn và nước uống tự do.

2.3. Hoá chất

Paracetamol, Silymarin, và các hóa chất thông thường khác.

2.4. Phương pháp xác định hoạt tính bảo vệ gan trên chuột

2.4.1. Thử nghiệm độc tính cấp

Xác định độc tính cấp theo phương pháp Bộ Y tế Việt Nam ban hành [2,6]. Cụ thể là cao chiết POME được pha ở nồng độ gốc 20 gram/ml (có thể đạt được do mẫu cao chiết) nhằm khảo sát độc tính cấp.

30 chuột chia thành 5 nhóm (6 con chuột/nhóm) gồm 1 nhóm đối chứng sinh lý, 4 nhóm thí nghiệm và bị bỏ đói hoàn toàn 16 giờ trước khi cho uống mẫu. Mẫu POME được cho uống với liều cao nhất có thể và giảm dần, cụ thể là 10; 5; 2,5 và 1,25 gram/kg thể trọng. Sau khi cho uống cao chiết POME với một liều duy nhất từ 1-2 giờ, chuột được nuôi dưỡng bình thường trở lại (cho ăn, uống tự do) và theo dõi liên tục trong 72 giờ để xác định số chuột chết trong từng lô và tính giá trị LD₅₀.

Giá trị LD₅₀ được xác định bằng phương pháp của Karber [4,12] như sau: $LD_{50} = LD - \frac{\sum ab}{n}$. Trong đó: LD₅₀ là Liều chết 50% động vật thí nghiệm; LD là liều gây chết 100% động vật thí nghiệm; n là số động vật trong một nhóm; a là sự khác biệt về liều giữa hai liều liên tiếp; b là tỷ lệ tử vong trung bình của hai nhóm liên tiếp. Đồng thời, chuột chết sẽ được mổ để xét nghiệm đại thể.

2.4.2. Xác định hoạt tính bảo vệ gan

Xác định hoạt tính bảo vệ gan được thực hiện theo phương pháp của Kumar và cộng sự (2006) với một số thay đổi phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. 30 con chuột được chia thành 5 nhóm (6 chuột/nhóm), cụ thể như sau:

- Nhóm 1 (nhóm chứng sinh lý): uống nước cất
- Nhóm 2 (nhóm chứng bệnh lý): uống paracetamol liều 3g/kgP
- Nhóm 3 (nhóm chứng tham khảo): uống silymarin và uống paracetamol
- Nhóm 4 (nhóm thực nghiệm): uống cao chiết POME liều 100mg/kgP và uống paracetamol
- Nhóm 5 (nhóm thực nghiệm): uống cao chiết POME liều 200mg/kgP và uống paracetamol
- Nhóm 6 (nhóm thực nghiệm): uống cao chiết POME liều 300mg/kgP và uống paracetamol

Những con chuột thí nghiệm được uống nước cất hoặc silymarin hoặc POME tại thời điểm cố định (buổi sáng) hàng ngày, uống trong 7 ngày. Vào ngày thứ 8 và ngày thứ 9 của quá trình thử nghiệm, những con chuột ở tất cả các nhóm (trừ nhóm 1- nhóm đối chứng sinh lý) được uống paracetamol liều 3g/kgP, cho nhịn ăn qua đêm. Vào ngày thứ 10, chuột được lấy máu, thu huyết thanh, xác định các chỉ số AST, ALT. Chuột được mổ lấy gan để thu nhận hình ảnh gan trước khi chúng được tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

2.4.3. Định lượng AST, ALT

Vào ngày thứ 9, máu mắt chuột được thu nhận, ly tâm 12.000 vòng trong 10 phút, thu huyết thanh và xác định các chỉ số AST, ALT trên hệ thống sinh hóa tự động AU-680 của Beckman Coulter.

2.4.4. Kiểm tra đại thể gan

Sau khi thu thập máu, toàn bộ chuột thí nghiệm bị giết, mổ nhanh lấy gan, quan sát đại thể và chụp ảnh.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý trên Excell, thuật toán thống kê students' t-test

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát độc tính cấp của cao chiết POME

Trước khi tiến hành nghiên cứu khảo sát tác động bảo vệ gan, cần phải khảo sát độc tính cấp của hoạt chất sử dụng trong nghiên cứu, với mục đích tìm ra

khoảng nồng độ an toàn không gây độc cho đối tượng nghiên cứu.

Để khảo sát độc tính cấp của cao chiết lá chùm ruột, chuột được uống cao chiết POME liều 10; 5; 2,5

và 1,25 gram/kg thể trọng (mức liều 10 gram/kgP là nồng độ cao nhất chuột có thể uống/lần thí nghiệm). Kết quả thí nghiệm kiểm tra độc tính cấp của mẫu cao chiết methanol POME quả dừa dại được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Độc tính cấp của POME trên chuột thí nghiệm

Lô	POME (g/kgP/lần)	Số chuột chết/số chuột sống (sau 72 giờ)	Biểu hiện chức năng trong vòng 24 giờ
1	10	0/6	Chuột ăn uống giảm, di chuyển chậm. Sau 24 giờ, hoạt động của chuột trở lại bình thường, di chuyển bình thường, ăn uống trở lại phân xạ ánh sáng và âm thanh bình thường
2	5	0/6	Chuột di chuyển chậm, ăn uống bình thường, phân xạ ánh sáng và âm thanh chậm
3	2,5	0/6	Chuột khỏe mạnh, di chuyển và ăn uống bình thường, phân xạ với ánh sáng và âm thanh tốt.
4	1,25	0/6	Chuột khỏe mạnh, di chuyển và ăn uống bình thường, phân xạ với ánh sáng và âm thanh tốt.
5	Đối chứng sinh lý	0/6	Chuột khỏe mạnh, di chuyển và ăn uống bình thường, phân xạ với ánh sáng và âm thanh tốt.

Kết quả trên cho thấy, sau khi uống cao chiết ở nồng độ POME cao nhất có thể là 10 gram/kgP, chuột hơi lờ đờ nhưng nhanh chóng lấy lại sự linh hoạt. Sau 24 giờ được uống cao chiết POME, chuột ở tất cả các lô thí nghiệm hoàn toàn khỏe mạnh và di chuyển linh hoạt, không có dấu hiệu bị tổn thương, không ghi nhận chuột bị chết.

Như vậy, qua thử nghiệm độc tính cho thấy cao chiết POME ở các nồng độ thực nghiệm an toàn cho chuột, không xác định được giá trị LD50 và không thể hiện độc tính cấp.

Căn cứ vào kết quả thử độc tính của cao chiết POME, chúng tôi tiến hành thí nghiệm để khảo sát tác động bảo vệ gan của cao chiết POME.

3.2. Kết quả định lượng AST, ALT

Sau khi cho uống hoạt chất nghiên cứu trong 7 ngày và uống paracetamol vào ngày thứ 8, 9 chuột thí nghiệm ở các lô nhện ăn qua đêm được lấy máu để kiểm tra hàm lượng AST và ALT trong huyết thanh vào ngày thứ 10. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Nồng độ AST, ALT trong huyết thanh

	AST (UI/L)	ALT (UI/L)
Chứng sinh lý	55,29 ± 6,13	38,41 ± 6,30
Chứng bệnh lý	149,57 ± 10,67	129,02 ± 20,40
Chứng tham khảo	82,64 ± 13,22 (69,93)	58,36 ± 3,72 (77,98)
POME (100 mg/kgP)	83,81 ± 6,29 (69,75)	60,96 ± 3,50 (75,28)
POME (200 mg/kgP)	101,23 ± 8,63 (51,27)	69,84 ± 6,29 (65,31)
POME (300 mg/kgP)	116,40 ± 9,61 (35,18)	94,28 ± 10,90 (38,34)

*Hiệu quả bảo vệ được tính bằng $100x$ (giá trị kiểm soát CCl_4 – giá trị mẫu nghiên cứu)/giá trị kiểm soát CCl_4 – giá trị bình thường)

Qua Bảng 3 cho thấy:

Ở nhóm chứng bệnh lý nồng độ AST tăng 2,71 lần, ALT tăng 3,36 lần so với nhóm chứng sinh lý.

Nhóm uống cao chiết POME ở ba mức liều 100 mg/kgP, 200 mg/kgP và 300 mg/kgP có nồng độ AST, ALT giảm với nhóm đối chứng bệnh lý. Trong đó nhóm

uống cao chiết liều 100mg/kg thể trọng có nồng độ AST, ALT giảm thấp nhất (AST giảm 1,76 lần và ALT giảm 2,12 lần) so với nhóm đối chứng bệnh lý. Khi so sánh hiệu quả bảo vệ gan của cao chiết POME với silymarin cho thấy dịch chiết POME ở nồng độ

100mg/kg thể trọng có tác dụng bảo vệ gan tương đương với tác dụng của silymarin.

3.3. Kết quả kiểm tra đại thể gan

Kết quả kiểm tra đại thể gan được thể hiện ở Bảng 4 và Hình 1.

Nhóm	Quan sát hình thái trực quan gan
Chứng sinh lý	Gan bình thường nhu mô gan đồng nhất, màu hồng
Chứng bệnh lý	Gan nhạt màu, nhu mô gan to nổi rõ
Chứng tham khảo	Gan hơi nhạt màu, nhu mô gan hơi to
POME (100mg/kgP)	Gan hơi nhạt màu, nhu mô gan hơi to
POME (200mg/kgP)	Gan hơi nhạt màu, nhu mô gan hơi to
POME (300mg/kgP)	Gan hơi nhạt màu, nhu mô gan hơi to



Chứng sinh lý



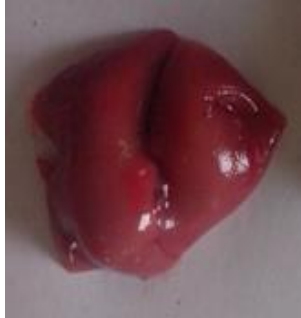
Chứng bệnh lý



Chứng tham khảo



POME (100mg/kgP)



POME 200mg/kgP



POME 300mg/kgP

Hình 1. Hình tổng thể gan chuột trong các nhóm thử nghiệm

Kết quả Bảng 4 và Hình 1 cho thấy nhóm chuột dùng cao chiết POME ở liều 100 mg/kg thể trọng có bề mặt gan nhẵn, mô gan và tế bào đều nhỏ hơn so với nhóm bệnh lý, màu gan nhạt hơn so với nhóm chứng sinh lý và nhóm chứng tham khảo. Ở nhóm chứng bệnh lý, gan nhạt màu, nhu mô gan nổi rõ.

Dựa vào kết quả nghiên cứu về nồng độ enzyme AST, ALT trong huyết thanh và hình ảnh đại thể của gan cho thấy, paracetamol đã tác động mạnh đến tế bào

gan, gây tổn thương tế bào gan, làm các enzyme AST, ALT trong tế bào gan được giải phóng vào trong máu, khiến nồng độ các enzyme này trong huyết thanh tăng lên đáng kể [1]. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy cao chiết POME và silymarin có tác dụng bảo vệ gan chống lại tác động gây độc gan của paracetamol. Cao chiết POME ở nồng độ 100 mg/kg thể trọng có hiệu quả bảo vệ gan gần tương đương với hiệu quả bảo vệ gan của Silymarin. Hiệu quả vào vệ gan của cao chiết là do

trong thành phần cao chiết của quả có chứa các hợp chất phenolic như vanillin, (+)-pinoresinol, (+)-syringaresinol và (+)-medioresinol...[3] các chất này có đặc tính chống oxi hóa, dập tắt các gốc tự do thông qua việc nhường nguyên tử H [7], đáng chú ý là các chất như: (+)-pinoresinol có tác dụng chống oxi hóa, giảm sự hình thành các chất trung gian gây viêm thông qua sự ức chế trung tâm hoạt động kB (NF-kB) và quá trình phosphoryl hóa c-Jun, do đó có tác dụng bảo vệ tế bào gan [9]; (+)-syringaresinol với tác dụng kháng viêm [8].

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy: cao chiết POME ở nồng độ 100 mg/kg thể trọng có tác dụng bảo vệ gan, chống lại tác động gây độc của paracetamol. Những kết quả này cho thấy tiềm năng bảo vệ gan của các hoạt chất có trong quả cây *Pandanus odoratissimus*.

Tài liệu tham khảo

- [1] A.A.Oyagbemi and A.A.Odetola (2010), Hepatoprotective effects of Ethanolic extract of *Cnidioscolus aconitifolius* on paracetamol-Induced hepatic damage in Rats, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13(4), 164-169.
- [2] Bộ Y tế (1996), Hướng dẫn nghiên cứu, đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc Y học cổ truyền, Hà Nội.
- [3] Nguyễn Mạnh Cường et al (2015), Chiết tác một số chất thuộc nhóm Phenolic từ quả cây Dừa dại *Pandanus odoratissimus* L.f., *Tạp chí hóa học p.* 432-435.
- [4] David J. Newman, Gordon M. Cragg, and Kenneth M. Snader. (2003), "Natural products as sources of new drugs over the periode 1981-2002", *J. Nat. prod.* 66, pp 1022-1037
- [5] Dodehe Yeo, Rita Bouagnon, Bernard Nazaire Djyh, Chonta Tuo and Jean David N'guessan (2012), Acute and subacute toxic study of aqueous leaf extract of *Combretum molle*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* April; 11(2): 217-223.
- [6] Đỗ Trung Đàm (2003), Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp của thuốc, NXB Y học.
- [7] Enika Nagababu et al (2011), Assessment of Antivities of Eugenol by in vitro and In vivo Methods, *Methods Mol Biol*, Author manuscript available in PMC.
- [8] Hong-Jie Zhang et al (2001), Antimalarial Compounds from *Rhaphidophora decursiva*, *Journal of Natural Products*, 64, 772-777
- [9] Hyo-Yeon Kim et al (2010), Hepatoprotective Effect of Pinoresinol on Carbon Tetrachloride – Induced Hepatic Damage in Mice, *J. Pharmacol. Sci.*, 112, 105-112.
- [10] M.U. Dianzani, G. Muzia, M.E. Biocca, R.A. Canuto (1991), Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats. *International journal of tissue reactions* 13, 79-85.
- [11] S. Shahani (1999), Evaluation of hepatoprotective efficacy of APCL-A polyherbal formulation in vivo in rats, *Indian Drugs* 36, 628-631.
- [12] Shetty Akhila J, Shyamjith Deepa and Alwar MC (2007), Actue toxicity studies and determination of median lethal dose, *Current Science*, 93(7): 917-920.

THE HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF THE METHANOLIC EXTRACT FROM THE *PANDANUS ODORATISSIMUS* FRUIT EXPERIMENTED ON THE SWISS STRAIN OF MICE

Abstract: The hepatoprotective effects of the methanolic fruit extract from the *Pandanus odoratissimus* fruit have been shown from an experiment on Swiss mice infected with paracetamol. The methanolic extract (100, 200 and 300 mg/kg body weight/day) was given orally to the mice for seven consecutive days. On the 8th and 9th days of the experiment, the mice were intoxicated with paracetamol (3g/kg body weight/day). Silymarin was served as a reference agent. The research results showed that the methanolic extract from the *Pandanus odoratissimus* fruit had a hepatoprotective effect against paracetamol-induced liver damage. The livers of the mice receiving the testing dose of 100 mg/kg/day were better protected than the ones receiving 200, 300 mg/kg/day. The *Pandanus odoratissimus* fruit methanolic extract with a concentration of 100 mg/kg body weight/day was capable of decreasing the plasma activeness of the aspartate amino transferase enzyme (AST) and the alanine amino transferase (ALT) enzyme 1,76 times and 2,12 times respectively as well as reducing malondialdehyde (MDA) concentration in an experiment against the lipid peroxidation of cell membranes compared to the control group of mice.

Key words: alanine amino transferase; aspartate amino transferase; Paracetamol malondialdehyd; peroxy; *Pandanus odoratissimus*