TÁC DỤNG CHỐNG OXY HÓA CỦA VIÊN NANG AK (BÈO HOA DÂU, KHỔ QUA RỪNG, NGHỆ VÀNG)

● Thái Tấn Nhã[1] ● Nguyễn Phương Dung*,[2]

[1] *Hội Đông Y tỉnh Khánh Hòa*

[2] *Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng*

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá tác dụng chống oxy hóa của viên nang AK (Bèo hoa dâu, Khổ qua rừng, Nghệ vàng) thông qua các thử nghiệm DPPH, MDA in vitro và trên chuột nhắt trắng tổn thương tế bào gan bằng cyclophosphamid (CY). Phương pháp: Khảo sát độc tính cấp đường uống của viên nang AK theo phương pháp Behrens trên chuột nhắt trắng. Khảo sát tác dụng chống oxy hóa in vitro bằng thử nghiệm 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) và thử nghiệm ức chế peroxy hóa lipid (MDA) tế bào gan của chuột. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa in vivo trên chuột nhắt tổn thương stress oxy hóa bởi cyclophosphamide (150 mg/kg, tiêm phúc mạc). Tiêu chí đánh giá là nồng độ MDA và GSH trong gan. Silymarin (0,1g/kg) được sử dụng làm chứng dương. Kết quả: Liều tối đa có thể cho chuột uống của bột viên nang AK là 5 g/kg. Viên nang AK thể hiện hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH với IC_{50}=83,84 (µg/ml) và ức chế peroxy hóa lipid (MDA) tế bào gan chuột với IC_{50}=76,06 µg/ml. So với lô bệnh lý, viên nang AK (1 g/kg, 0,5 g/kg và 0,25 g/kg) làm giảm MDA (46,89% – 27,77%), chỉ có liều 1 g/kg phục hồi GSH (22,74%). Kết luận: Liều tương đối an toàn (Dmax) của viên nang AK là 5 g/kg. Viên nang AK có tác dụng chống oxy hóa in vitro và trên chuột nhắt trắng stress oxy hóa bởi cyclophosphamid.

Từ khóa: *viên nang AK, cyclophosphamid, chống oxy hóa*

IN VITRO AND IN VIVO STUDY ON ANTIOXIDANT EFFECTS OF AK CAPSULE (*HERBA AZOLLAE MICROPHYLLAE, FRUCTUS MOMORDICAE CHARANTIAE, RHIZOMA CURCUMAE LONGAE)*

● Thai Tan Nha ● Nguyen Phuong Dung

ABSTRACT

Objectives: This study was designed to examine the antioxidant activity of AK capsule (Herba Azollae microphyllae, Fructus Momordicae charantiae and Rhizoma Curcumae longae). DPPH radical scavenging and lipid peroxidative assays (thiobarbituric assay) were applied in vitro study. A model of cyclophosphamide-induced hepatic oxidative stress in mice was used to evaluate lipid peroxidative marker malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) in liver homogenates. Methods: Investigated the acute toxicity of AK capsules referring to Behrens method in mice. For in vitro study, the free radical scavenging effect for the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) test and lipid peroxidation inhibition assay (MDA) liver cells of mice. For in vivo study, the model of cyclophosphamide-induced liver damage (150 mg/kg, i.p) in mice. Evaluation criteria were the concentration of MDA and GSH in the liver. Silymarin (0.1g/kg) was used as a positive control. Results: The Dmax of AK capsule was 5 g/kg. The AK capsule showed antioxidant activity with the

* Tác giả liên hệ: PGS.TS. Nguyễn Phương Dung, Email: dungnp@hiu.vn

(Ngày nhận bài: 13/10/2022; Ngày nhận bản sửa: 11/11/2022; Ngày duyệt đăng: 16/11/2022)

IC50 value of 83.84µg/ml (DPPH) and 18.09µg/ml (MDA). The levels of MDA were significantly decreased (46.8 % – 27.77%) at all three doses (1 g/kg, 0.5 g/kg, and 0.25 g/kg) while the recovery of reduced GSH after oxidation (22.74%) only occurred at a dose of 1 g/kg compared to the control group. Conclusion: The Dmax of AK capsule was 5 g/kg. The AK capsule had antioxidant activity in vitro and in mice subjected to cyclophosphamide-induced hepatic oxidative stress.

Keywords: *AK capsule, cyclophosphamide, antioxidant effect*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gốc tự do liên quan đến nhiều loại bệnh lý mạn tính tiến triển như ung thư, xơ gan, sa sút trí tuệ, xơ vữa động mạch [1]. Các bệnh mạn tính đang là mối lo sức khỏe chính trên toàn thế giới do quá trình điều trị thường tốn kém và bệnh nhân hầu như phải dùng thuốc suốt đời. Đa số các bệnh ung thư hiện nay áp dụng phương pháp hóa trị, xạ trị. Các tác nhân trị liệu này đều gây tổn hại các tế bào lành và nhiều cơ quan trong cơ thể, tạo ra các gốc oxy tự do hoặc ảnh hưởng đến hệ thống enzym chống oxy hóa nội sinh của cơ thể. Cyclophosphamid được chỉ định để điều trị một số loại ung thư, với cơ chế làm chậm hoặc ngừng sự phát triển của tế bào ác tính, đồng thời ức chế phản ứng của hệ thống miễn dịch trước một số tình trạng bệnh lý. Do được chuyển hóa ở gan, nên cyclophosphamid gây độc tế bào gan bằng cách gián tiếp làm gia tăng quá trình peroxy hóa lipid trong tế bào gan và gây viêm [2].

Bên cạnh những nghiên cứu về phương pháp và thuốc điều trị ung thư mới hiệu quả và ít độc tính hơn, thì những nỗ lực giảm thiểu tác dụng phụ liên quan đến sự mất cân bằng oxy hóa gây bởi hóa trị, xạ trị bằng các chế phẩm chống oxy hóa nguồn gốc thảo dược rất được quan tâm. Bèo hoa dâu, Khổ qua rừng, Nghệ vàng là những thảo dược sẵn có tại Việt Nam, cũng là những dược liệu có tác dụng chống oxy hóa [3 - 5]. Tuy nhiên, viên nang AK chứa cao chiết từ Bèo hoa dâu, Khổ qua rừng và Nghệ vàng có thể dùng để tái lập cân bằng oxy hóa hay không thì chưa có bằng chứng ghi nhận khả năng chống oxy hóa của chế phẩm này. Nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho việc sử dụng viên nang AK để hỗ trợ giảm thiểu tác dụng phụ liên quan đến sự gia tăng gốc tự do của các tác nhân hóa trị liệu ung thư, nghiên cứu này được tiến hành để đánh giá tác dụng chống oxy hóa *in vitro* và *in vivo* của chế phẩm này.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chế phẩm thử nghiệm là viên nang cứng số 0, thành phần gồm 3 loại cao khô chiết xuất từ Bèo hoa dâu, Khổ qua rừng, Nghệ vàng và tá dược; khối lượng trung bình 560 mg/viên. Chuẩn bị mẫu thử nghiệm bằng cách gỡ bỏ vỏ nang, lấy bột trong nang hòa với dung môi hoặc nước cất theo nồng độ phù hợp với từng thử nghiệm.

2.2. Phương tiện nghiên cứu

Chuột nhắt trắng đực chủng *Swiss albino*, 5 – 6 tuần tuổi, trọng lượng trung bình 22 ± 2g, được cung cấp bởi Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh, được nuôi ổn định 1 tuần trước khi thực hiện thí nghiệm. Chuột được nuôi với cám viên, có bổ sung thêm giá đậu xanh, nước uống.

Hóa chất và thuốc đối chiếu: Endoxan® chứa 534,5mg cyclophosphamid monohydrat – tương đương 500 mg cyclophosphamid khan (Baxter OG, Đức); kali clorua, methanol (Merck, Đức); 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), acid thiobarbituric (TBA), acid tricloacetic (TCA), đệm phosphat, đệm Tris HCI (Merck, Đức). Trolox (CalbiochemLtd. Co.), acid ascorbic (Merck, Đức), silymarin (Sigma Co. Ltd, Mỹ).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế thử nghiệm: Thiết kế song song, ngẫu nhiên và có đối chứng.

Trong thử nghiệm *in vitro,* các biến độc lập là viên nang AK, acid ascorbic, Trolox được pha thành các nồng độ khác nhau. Biến phụ thuộc gồm nồng độ phản ứng dập tắt gốc tự do DPPH và nồng độ ức chế peroxyl hóa lipid của tế bào gan chuột.

Trong thử nghiệm *in vivo*, các biến độc lập là nhóm chuột uống nước cất, chuột tiêm phúc mô cyclosphosphamid liều 150 mg/kg (CY+), chuột uống silymarin liều 100 mg/kg và chuột uống viên nang AK liều 1 g/kg, 0,5 g/kg và 0,25 g/kg, thể tích 10 mL/kg thể trọng. Các biến phụ thuộc gồm nồng độ MDA và GSH trong tế bào gan chuột được đo bằng máy quang phổ tử ngoại khả kiến Unicam DU 730 (Beckman Coutlter, Mỹ).

Thử nghiệm độc tính cấp

Giai đoạn sơ khởi được thực hiện với 4 chuột/mức liều (2 đực, 2 cái). Khởi đầu với liều cao nhất có thể bơm được qua kim đầu tù, thể tích cho uống là 0,2 mL/10 g thể trọng. Nếu có chuột chết trong vòng 72 giờ sau uống, thì giảm dần để xác định liều cao nhất không gây chết chuột (D_0) và liều thấp nhất gây chết 100% chuột (LD_{100}). Theo dõi những bất thường về hành vi, tim mạch, hô hấp, tiêu hóa, tiết niệu của chuột trong vòng 72 giờ sau cho uống. Chuột được tiếp tục theo dõi sau 14 ngày uống để ghi nhận những triệu chứng bất thường (nếu có). Giải phẫu và ghi nhận những bất thường về đại thể của các cơ quan của chuột. Giai đoạn xác định được thực hiện với 12 chuột/mức liều (6 đực, 6 cái). Các mức liều được chia theo cấp số cộng và nằm trong khoảng D_0 và D_{100}. Theo dõi các triệu chứng bất thường của chuột sau uống thuốc tương tự như giai đoạn sơ khởi. Liều gây chết 50% chuột thử nghiệm – LD_{50} (nếu có) được tính theo công thức Karber-Behrens. Chọn liều cho thử nghiệm *in vivo* trong giới hạn từ 1/20 đến 1/5 LD_{50} hoặc nhỏ hơn 1/5 D_{max}[6].

Chỉ tiêu đánh giá kết quả: những thay đổi về hành vi và vận động (biến định tính) của chuột trong vòng 72 giờ đầu và 14 ngày sau khi dùng thuốc, so sánh với lô chuột bình thường.

Đánh giá tác dụng chống oxy hóa in vitro bằng thử nghiệm DPPH [7]

Xác định khả năng chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu qua việc xác định khả năng làm giảm màu của 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Pha mẫu thử là bột trong viên nang thành 6 mức nồng độ 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL và 10 µg/mL. Cho 0,5 mL mẫu thử ở các nồng độ khảo sát được cho phản ứng với đồng lượng dung dịch DPPH 0,8 mM pha trong methanol. Hỗn hợp sau khi pha được lắc đều trong 15 giây, ổn định trong 30 phút trong điều kiện nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Ống chứng gồm hỗn hợp 3,5mL MeOH và 0,5mL DPPH. Đo quang ở bước sóng λ=517 nm. Các mẫu được đo 3 lần và lấy kết quả trung bình của 3 lần đo (biến định lượng). Acid ascorbic được sử dụng làm chứng dương.

Công thức tính % hoạt tính chống oxy hóa (HTCO): $HTCO\% = [(OD_C - OD_T) / OD_C] \times 100$, trong đó OD_C là mật độ quang của chứng và OD_T là mật độ quang của mẫu thử.

Giá trị IC_{50} được tính dựa vào đồ thị biểu diễn tỷ lệ % khả năng dập tắt gốc tự do theo nồng độ khảo sát của chất thử nghiệm bằng phần mềm Excel 2016. Từ đồ thị, nội suy ra giá trị nồng độ dập tắt gốc tự do IC_{50} dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính y=ax+b.

Đánh giá khả năng ức chế peroxy hóa lipid bằng thử nghiệm MDA [7]

Xác định khả năng ức chế peroxy hóa lipid của mẫu nghiên cứu qua việc xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA), là sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào. MDA có khả năng phản ứng với acid thiobarbituric để tạo thành phức hợp trimethin (màu hồng) có đỉnh hấp thu cực đại ở λ=532 nm. Bột viên nang được tiến hành với các nồng độ: 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/ml, 250 µg/mL, 100 µg/mL và 50 µg/mL *(biến định lượng).* Sau khi gây mê chuột bằng cách

tiêm phúc mô cloral hydrat, tiến hành cố định chuột và giải phẫu để thu nhận gan. Gan chuột được cho vào dung dịch đệm phosphat bảo quản lạnh theo tỷ lệ 2:9 (gan:đệm), tiến hành nghiền đồng thể với tốc độ 13000 vòng/phút ở nhiệt độ 0 – 5 °C. Cho mẫu thử ở các nồng độ thử nghiệm được cho phản ứng với dịch đồng thể não và thêm đệm phosphat vừa đủ 2 ml. Ủ hỗn hợp phản ứng trong 15 phút và dừng phản ứng bằng acid tricloacetic. Sau khi ly tâm lấy dịch trong cho phản ứng với thuốc thử acid thiobarbituric trong 15 phút. Tiến hành đo quang ở bước sóng l=532 nm. Các mẫu được đo 3 lần và lấy kết quả trung bình của ba lần đo *(biến định lượng)*. Trolox, đồng phân của vitamin E, được sử dụng làm chứng dương.

Công thức tính % hoạt tính chống oxy hóa (HTCO):

$HTCO\% = [(OD_C - OD_T) / OD_C] \times 100$

(OD_C là mật độ quang của chứng; OD_T là mật độ quang của mẫu thử)

Tính giá trị IC_{50}: Vẽ đồ thị biểu diễn tỷ lệ % khả năng ức chế peroxy hóa lipid theo nồng độ khảo sát của chất cần thử nghiệm bằng phần mềm Excel 2016. Từ đồ thị, nội suy ra giá trị nồng độ ức chế peroxy hóa lipid IC_{50} bằng phương trình hồi quy tuyến tính y=ax+b.

Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa in vivo

Mô hình tổn thương gan bằng cyclophosphamid [8]

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm: Nhóm bị gây stress oxy hóa – CY (+) tiêm phúc mô liều duy nhất cyclophosphamid 150 mg/kg và 10 ml/kg thể trọng; nhóm sinh lý – CY (-) tiêm phúc mô dung dịch NaCl 0,9%, thể tích 10 ml/kg thể trọng. Sau đó, mỗi nhóm chia làm 5 lô (n=8): Lô chứng uống nước cất; lô đối chiếu uống silymarin (0,1 g/kg thể trọng); lô AK1, AK0,5 và AK0,25 uống viên nang liều 1 g/kg, 0,5 g/kg và 0,25 g/kg thể trọng chuột. Thời gian cho uống hằng ngày trong khoảng 8 – 9 giờ sáng và liên tục trong 8 ngày sau khi tiêm phúc mô cyclophosphamid hoặc NaCl 0.9%. Đến ngày thứ 8, 1 giờ sau lần cho uống cuối cùng, tách lấy gan chuột để định lượng MDA và GSH *(biến định lượng)*.

Khảo sát hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA) và glutathion (GSH) trong gan chuột

Nghiền gan chuột đồng thể với dung dịch đệm KCl 1.15%, trong 1 phút, tốc độ 13.000 vòng/phút. Sau đó, lấy 1 – 2 mL dịch đồng thể và thêm đệm đệm Tris (pH=7,4) vừa đủ 3 ml. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 60 phút và dừng phản ứng bằng 1 ml acid trichloroacetic 10%. Sau đó, đem ly tâm hỗn hợp ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 5 °C. Định lượng MDA: Lấy 2 mL dịch trong cho phản ứng với 1 mL acid thiobarbituric 0,8% ở 100°C trong 15 phút và đo quang ở l=532 nm. Hàm lượng MDA (nM/g protein, hàm lượng protein được đo từ 1 ml dịch đồng thể gan) được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn MDA (y = 0,0796x + 0,0035). Định lượng GSH: Lấy 1 ml dịch trong cho phản ứng với 0,2 ml thuốc thử Ellman là 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) và thêm đệm EDTA phosphat vừa đủ 3 mL. Để 3 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó đo quang ở bước sóng l=412 nm. Hàm lượng GSH (nM/g protein, hàm lượng protein được đo từ 1 mL dịch đồng thể gan) được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn GSH (y=0,0043x–0,0033).

Phương pháp xử lý thống kê số liệu thực nghiệm

Các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: M ± SEM (Standard error of the mean – sai số chuẩn của giá trị trung bình). Các số liệu được khảo sát trên các nhóm súc vật thí nghiệm độc lập (nhóm chứng và nhóm dùng thuốc) và các mẫu đều bé (< 30). Do đó phương pháp thống kê được sử dụng là phép kiểm Student cho 2 dãy số liệu độc lập. So sánh sự khác nhau giữa các nhóm về giá trị trung bình hàm lượng MDA và GSH (biến định lượng) bằng phép kiểm Student-t-test (so sánh hai lô); One-Way ANOVA (so sánh nhiều lô), tiếp theo hậu kiểm bằng Student-Newman-Keuls test

(phần mềm Jandel Scientific SigmaStat 3.5). Kết quả đạt ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi p<0,05 so với lô chứng.

3. KẾT QUẢ

3.1. Độc tính cấp

Ở liều tối đa có thể đưa trực tiếp vào dạ dày chuột là 5 g/kg thể trọng chuột, tất cả chuột không có biểu hiện bất thường sau uống mẫu thử và không có chuột chết trong vòng 72 giờ và 14 ngày (Bảng 1). Quan sát đại thể phổi, tim, gan, thận, ruột không ghi nhận các dấu hiệu bất thường.

Bảng 1. Tỷ lệ tử vong của chuột sau uống viên nang AK 72 giờ và 14 ngày

Giai đoạn	Liều (g/kg)	Tổng số chuột	Số chuột chết	Tỷ lệ chuột chết (%)
Sơ khởi	5	4	0	0
Xác định	5	12	0	0

Từ kết quả Bảng 1, xác định D_{max} = 5 g/kg thể trọng. Vì liều tương đối an toàn cho các thí nghiệm dược lý có thể bằng hoặc nhỏ hơn 1/5 D_{max} [6], liều được chọn cho các thử nghiệm *in vivo* là 1 g/kg, 0,5 g/kg và 0,25 g/kg (tương ứng với 1/5, 1/10, 1/20 D_{max}).

3.2. Tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của viên nang AK

Bảng 2. Kết quả hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH của các mẫu thử

Nồng độ ban đầu (µg/mL)	Nồng độ phản ứng (µg/mL)	OD				HTCO%
		L1	L2	L3	TB	
Chứng		0,812	0,823	0,800	0,812 ± 0,012	
1000	125,00	0,244	0,245	0,248	0,246 ± 0,002	69.73
500	62,50	0,460	0,472	0,477	0,470 ± 0,009	42.14
250	31,25	0,611	0,602	0,618	0,610 ± 0,008	24.80
100	12,50	0,713	0,716	0,727	0,719 ± 0,007	11.46
50	6,25	0,757	0,770	0,762	0,763 ± 0,007	6.00
10	1,25	0,786	0,773	0,798	0,786 ± 0,013	3.20

Hoạt tính chống oxy hóa của viên nang tăng theo nồng độ mẫu thử. Từ Bảng 2 có được phương trình tuyến tính y = 0,5399x+4,7374; R^2 = 0,9882; suy ra nồng độ dập tắt gốc tự do của viên nang AK là IC_{50} = 83,84 (ìg/mL).

Bảng 3. Kết quả hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH của acid ascorbic

Nồng độ ban đầu (µg/mL)	Nồng độ phản ứng (µg/mL)	OD				HTCO%
		L1	L2	L3	TB	
Chứng		0,917	0,989	0,909	0,938 ± 0,044	
88,07	11,01	0,051	0,055	0,055	0,054 ± 0,002	94,28
44,03	5,50	0,363	0,359	0,352	0,358 ± 0,006	61,85

17,61	2,20	0,665	0,667	0,644	0,659 ± 0,013	29,80
8,81	1,10	0,761	0,781	0,759	0,767 ± 0,012	18,26
1,76	0,22	0,861	0,891	0,863	0,872 ± 0,017	7,10

Từ Bảng 3 xây dựng phương trình tuyến tính y=8,0061x+10,18; R^2=0,9798. Trị số IC_{50} = 4,97 (µg/mL).

Bảng 4. Kết quả của thử nghiệm MDA trên tế bào gan chuột của các mẫu thử

Nồng độ ban đầu (µg/mL)	Nồng độ phản ứng (µg/mL)	OD				HTCO%
		L1	L2	L3	TB	
Chứng		0,146	0,137	0,142	**0,142**	
4000	**200,00**	0,055	0,056	0,044	**0,052**	**63.53**
2000	**100,00**	0,065	0,056	0,059	**0,060**	**57.65**
1000	**50,00**	0,077	0,076	0,080	**0,078**	**45.18**
500	**25,00**	0,096	0,091	0,112	**0,100**	**29.65**
250	**12,50**	0,119	0,125	0,111	**0,118**	**16.47**

Khả năng ức chế peroxy hóa lipid của viên nang AK tăng theo nồng độ mẫu thử. Từ số liệu trong Bảng 4 có được phương trình logarit y = 17,576ln(x) - 26,131 với r^2=0,9801, suy ra hoạt tính ức chế peroxy hóa lipid IC_{50} của viên nang AK là IC_{50}=76,06 (µg/ml).

Bảng 5. Hoạt tính ức chế peroxy hóa lipid tế bào gan của Trolox

Nồng độ ban đầu (µg/mL)	Nồng độ phản ứng (µg/mL)	OD				HTCO%
		L1	L2	L3	TB	
Chứng		0,146	0,137	0,142	**0,142**	
1500	**75,00**	0,045	0,041	0,038	**0,041**	**70.89**
1000	**50,00**	0,062	0,055	0,056	**0,058**	**59.39**
500	**25,00**	0,085	0,079	0,088	**0,084**	**40.85**
250	**12,50**	0,099	0,098	0,109	**0,102**	**28.17**
100	**5,00**	0,132	0,126	0,136	**0,131**	**7.51**

Từ Bảng 5 xây dựng được phương trình tuyến tính y=23,069ln(x)-30,538; r^2=0,9949; suy ra IC_{50}= 32,83 (µg/mL).

3.3. Tác dụng chống oxy hóa *in vivo* của viên nang AK

Bảng 6. Hàm lượng MDA và GSH trong gan chuột sau 7 ngày uống viên nang AK

Nhóm	Lô (n=8)	Liều uống (g/kg)	Hàm lượng MDA (nM/g protein)	Hàm lượng GSH (nM/g protein)
CY (-)	Chứng sinh lý		31,41 ± 1,56	6957,25 ± 241,24
	Viên nang AK	1	37,02 ± 1,84	6228,70 ± 178,12
		0,5	34,71 ± 2,23	6370,76 ± 225,99
		0,25	34,75 ± 3,79	6190,61 ± 115,84
	Silymarin	0,1	36,38 ± 2,54	6827,08 ± 299,26
CY (+)	Chứng bệnh lý		**70,28 ± 4,05**$^{\#\#\#}$	**4638,27 ± 234,77**$^{\#\#\#}$
	Viên AK	1	**37,32 ± 3,01*****	**5693,01 ± 228,40****
		0,5	**50,76 ± 2,69****	5105,72 ± 225,17
		0,25	**49,69 ± 1,37****	4711,29 ± 237,26
	Silymarin	0,1	**31,93 ± 1,12*****	**6956,46 ± 398,45*****

$^{\#}p<0,05$ so với chứng sinh lý; $^{\#\#\#}p<0,001$ so với chứng sinh lý.

$^{*}p<0,05$ so với chứng bệnh lý; $^{**}p<0,01$ so với chứng bệnh lý; $^{***}p<0,001$ so với chứng bệnh lý

Kết quả Bảng 6 cho thấy hàm lượng MDA trong gan chuột nhóm CY (-) của các lô uống viên nang AK ở 3 mức liều thử nghiệm cũng như lô đối chiếu silymarin 0,1 g/kg khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Như vậy, viên nang AK ở 3 mức liều (1 g/kg, 0,5 g/kg và 0,25 g/kg) không ảnh hưởng đến hàm lượng MDA trên cơ thể chuột bình thường. Nhóm CY (+): Lô chứng bệnh lý có hàm lượng MDA trong gan tăng 123.71% so với lô chứng sinh lý ($p\leq0,001$). Sau 7 ngày uống silymarin liều 0,1 g/kg, hàm lượng MDA trong gan giảm 54.57% ($p<0,001$) và trở về giá trị bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý ($p=0,931$). Các lô chuột uống viên nang AK liều 1 g/kg, 0,5 g/kg và 0,25 g/kg đều thể hiện sự giảm hàm lượng MDA trong gan (27,77 – 46.89 %) so với lô chứng bệnh lý ($p<0,001$, $p=0,002$, $p=0,003$, tương ứng). Trong đó, liều 1 g/kg có tác dụng giảm MDA tương tự silymarin (0,1 g/kg) và có giá trị MDA ở mức bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý ($p=0,931$).

Kết quả Bảng 6 cho thấy trong nhóm CY (-), hàm lượng GSH trong tế bào gan của chuột uống viên nang AK ở 3 mức liều thử nghiệm cũng như lô đối chiếu silymarin khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Cho thấy, viên nang AK ở 3 liều thử nghiệm (1 g/kg, 0,5 g/kg và 0,25 g/kg) không ảnh hưởng đến hàm lượng GSH trên cơ thể chuột bình thường. Nhóm CY (+)*:* Lô chứng bệnh lý có hàm lượng GSH giảm 33.33% so với lô chứng sinh lý (*$p\leq0,001$*). Trong khi đó, sau 7 ngày uống silymarin (0,1 g/kg), GSH tăng 49.98% (*$p<0,001$*) và trở về giá trị bình thường khi so sánh với lô chứng sinh lý ($p=0,998$). Viên nang AK liều 1 g/kg thể hiện tác dụng làm phục hồi hàm lượng GSH trong gan 22.74% so với lô chứng bệnh lý ($p=0,006$) và kém hơn silymarin (0,1 g/kg). Viên nang AK liều 0,5 g/kg và 0,25 g/kg không thể hiện tác dụng phục hồi GSH trên chuột nhắt trắng bởi cyclophosphamid.

4. BÀN LUẬN

4.1. Hoạt tính chống oxy hóa in vitro thông qua thử nghiệm DP PH và MDA

2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl (DPPH) là một gốc tự do có màu tímvà malonyl dialdehyd (MDA) là sản phẩm của quá trình peroxy hoá các phân tử lipid trên màng tế bào. Kết quả thử nghiệm cho thấy các mẫu thử làm giảm màu cả hai phản ứng, chứng tỏ viên nang AK có hoạt tính chống oxy hóa vừa dập tắt gốc tự do DPPH theo cơ chế cho hydrogen, vừa ức chế quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào. Khi so sánh hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH IC_{50} của những công trình nghiên cứu trước đây: về chứng dương của acid ascorbic IC_{50}=4,97 µg/mL) từ bảng 3 và Trolox IC_{50}=32,83 µg/mL từ bảng 5 cho thấy kết quả thử nghiệm khá tương đồng [8]. Kết quả đánh giá tác dụng toàn thân Bèo hoa dâu (chiết xuất bằng ethanol) có IC_{50}=59,8 µg/mL [9], quả Khổ qua rừng (chiết xuất bằng nước) có IC_{50}=11 µg/mL [10], thân rễ Nghệ vàng (chiết xuất bằng methanol) có IC_{50}=9,7 µg/ml [11]. Ở nghiên cứu này được tiến hành với viên nang chứa 3 dược liệu được chiết xuất bằng nước có IC_{50}=83,84 µg/mL thì thấy lớn hơn từng dược liệu riêng lẻ. Có thể nguyên nhân nằm ở sự khác nhau về nguồn gốc nguyên liệu, phương pháp chiết xuất và thành phần hóa học. Nghệ vàng chiết xuất bằng methanol có hoạt tính chống oxy hóa DPPH tốt hơn so với khi chiết xuất bằng nước [11]. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy Bèo hoa dâu, Nghệ vàng có chứa các phenolic (polyphenol, flavonoid...) là những hợp chất có khả năng chống oxy hóa nổi trội nhất ở thực vật (Lu và Foo, 1995). Các cao chiết từ Bèo hoa dâu, Khổ qua rừng và Nghệ vàng trong viên nang AK được chiết bằng nước. Sự khác biệt về phương pháp chiết có ảnh hưởng đến thành phần hóa thực vật, dẫn đến sự khác biệt về khả năng dập tắt gốc tự do trong thử nghiệm DPPH *in vitro* của nghiên cứu này.

Viên nang AK có tác dụng bắt giữ gốc tự do *in vitro* trong thử nghiệm DPPH và trong cả thử nghiệm MDA với IC_{50} lần lượt là 83,84 µg/mL (Hình 1) và 76,06 µg/ml (Hình 2). Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu thử tăng theo nồng độ khảo sát. Ở nồng độ 1000 µg/mL viên nang AK có hoạt tính chống oxy hóa tương đương với chất đối chiếu acid ascorbic ở nồng độ 5,5 mM. Định tính thành phần hóa học và định lượng các phenolic trong viên nang AK, cũng như các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế chống oxy hóa, tác dụng dược lý đặc thù cần được tiếp tục triển khai trong tương lai để cung cấp cơ sở khoa học cho các ứng dụng hỗ trợ điều trị của chế phẩm này.

4.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa *in vivo*

Khảo sát hàm lượng MDA trong gan

MDA trong gan là sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào gan, hàm lượng MDA trong gan càng cao chứng tỏ quá trình này càng tăng. Kết quả ở bảng 3 cho thấy lô chứng tiêm cyclophosphamid và uống nước cất trong 8 ngày có hàm lượng MDA trong gan tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bình thường ($p<0,001$) chứng tỏ cyclophosphamid gây tăng quá trình peroxy hóa tế bào gan dẫn đến tăng hàm lượng sản phẩm MDA trong gan. Trong lô chứng dương uống thuốc đối chiếu silymarin liều 0,1 g/kg; và các liều của viên nang uống trong 8 ngày đều ghi nhận hàm lượng MDA giảm đạt ý nghĩa thống kê ($p<0,01$) so với lô chứng âm bệnh lý, chứng tỏ silymarin và các liều thử nghiệm đều có tác dụng bảo vệ gan theo cơ chế chống quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào gan khi được tiêm cyclophosphamid. So sánh về tác dụng làm giảm hàm lượng lượng MDA, lô thử uống liều 1 g/kg của mẫu thử với lô uống silymarin liều 0,1 g/kg cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Chứng tỏ về tác dụng tương đương làm giảm hàm lượng MDA trong gan của liều viên nang 1 g/kg và silymarin liều 0,1 g/kg.

Khảo sát hàm lượng GSH trong gan

Các chất chống peroxyd chiếm thành phần chủ yếu trong gan, đó là các chất glutathion (GSH) và enzym glutathion peroxydase (GSH – Px). Kết quả bảng 4 cũng ghi nhận là có sự giảm hàm

lượng GSH ở lô chứng tiêm cyclophosphamid so với lô chứng sinh lý CY (-). Cho thấy GSH và những nhóm chất có chứa sulfhydryl (như cystein và N-acetylcystein) với chức năng giải độc đã thông qua hệ thống cytocrom P-450 tương tác với acrolein, chất chuyển hóa của cyclophosphamid trong cơ thể. Độc tính của cyclophosphamid tăng kéo theo sự suy giảm GSH nội sinh trong gan. Kết quả cũng cho thấy lô tiêm cyclophosphamid: uống thuốc đối chiếu silymarin liều 0,1 g/kg; và liều viên nang 1g/kg trong 8 ngày làm hàm lượng GSH tăng đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý. Cho thấy liều viên nang 1g/kg có tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ gan thông qua việc phục hồi hàm lượng GSH bị suy giảm do cyclophosphamid nhưng yếu hơn lô uống silymarin liều 0,1g/kg.

Trong viên nang AK chứa các dược liệu đã được chứng minh về thành phần hoạt tính chống oxy hóa chủ yếu là các flavonoid (quercetin), polyphenol, polysaccharid, curcumin [12 - 13]. Việc kết hợp curcumin và flavonoid (quercetin) cho thấy hiệu quả tốt để bảo vệ chức năng gan bằng cách chống oxy hóa trên mô hình tổn thương gan do paracetamol ở chuột. Đồng thời trong các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng đều cho thấy tính an toàn khi kết hợp [14]. Ngoài ra, nghiên cứu kết hợp polysaccharid (Khổ qua) và curcumin (Nghệ vàng) cũng giúp chống lại các gốc tự do để ngăn ngừa tổn thương gan do arsen trên gan ở chuột [15]. Về dược động học, quercetin có ảnh hưởng đến sự hấp thu của curcumin thông qua cơ chế chuyển hóa CYP3A4, bơm đẩy P-glycoprotein, ức chế phenol sulfotransferase (SULT-1A1) và sự hấp thu tại ruột. Kết hợp flavonoid có triển vọng tăng hấp thu và sinh khả dụng của curcumin so với điều trị đơn lẻ [16]. Trong thời gian tới, những nghiên cứu về tác dụng dược lý trên các mô hình bệnh lý liên quan đến mất cân bằng oxy hóa (đái tháo đường, rối loạn mỡ máu, giảm chức năng gan, thận, ung thư...), đánh giá tính an toàn khi sử dụng dài ngày, xác định các thông số dược động học cơ bản của viên nang AK cần được tiến hành để có có cơ sở ứng dụng chế phẩm này trong thực tế lâm sàng.Từ kết quả chống oxy hóa in vivo có thể gợi ý liều thử nghiệm lâm sàng của viên nang AK có thể trong khoảng 2 - 4 viên/ngày.

5. KẾT LUẬN

Viên nang AK thể hiện tác dụng chống oxy hóa *in vitro* trong thử nghiệm DPPH với IC_{50}=83,84 µg/ml và trong thử nghiệm MDA với IC_{50}=76,06 µg/mL.

Trên chuột nhắt trắng tổn thương oxy hóa gan bởi cyclophosphamid, viên nang AK ở 3 mức liều (1 g/kg; 0,5 g/kg và 0,25 g/kg, uống) làm giảm MDA gan chuột, ở liều 1 g/kg làm tăng hàm lượng GSH trong gan chuột. Như vậy, viên nang AK có tác dụng chống oxy hóa theo hướng bảo vệ gan thông qua sự giảm peroxy hóa lipid màng tế bào gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM., "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging" *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 90(17), 7915-7922, 1993.

[2] Abraham P, Sugumar E., "Increased glutathione levels and activity of PON1 (phenyl acetate esterase) in the liver of rats after a single dose of cyclophosphamide: a defense mechanism?" *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(5), 301-306, 2008.

[3] Selvaraj K, Chowdhury R and Bhattacharjee C., "Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and evaluation of free radical scavenging activity", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 743-749, 2013.

[4] Kubola J and Siriamornpun S., "Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*", *Food chemistry*, 110(4), 881-890, 2008.

[5] Singh G, Kapoor IP, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CA., "Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric

(*Curcuma longa* Linn.)", *Food and Chemical Toxicology*, 48(4), 1026-31, 2010.

[6] Đỗ Trung Đàm (2014). *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*. Nhà xuất bản Y Học, pp.15-57.

8] Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K., "Methods for testing antioxidant activity", *Analyst,* 127(1), 183-198, 2002.

[9] Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Ngọc Hằng (2010). Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa theo hướng bảo vệ gan của nấm linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*). *Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 14(2), 129-134, 2010.

[10] Sreenath KB, Sundaram S, Gopalakrishnan VK and Poornima K., "Quantitative phytochemical analysis, in vitro antioxidant potential and gas chromatography-mass spectrometry studies in ethanolic extract of *Azolla Microphylla*", *Asian Journal Pharmaceutical and Clinnical Research*, 9 (2), 318-323, 2016.

[11] Kubola J and Siriamornpun S., "Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro", *Food chemistry*, 110(4), 881-890, 2008.

[12] Zaeoung S, Plubrukarn A and Keawpradub N., "Cytotoxic and free radical scavenging activities of *Zingiberaceous rhizomes*", *Songklanakarin Journal Science Technology*, 27(4), 799-812, 2005.

[13] Selvaraj K, Chowdhury R and Bhattacharjee C., "Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and evaluation of free radical scavenging activity", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 743-749, 2013.

[14] Yousef MI, Omar SA, El-Guendi MI, Abdelmegid LA., "Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat", *Food and Chemical Toxicology,* 48(11), 3246-3261, 2010.

[15] Perveen H, Dash M, Khatun S, Maity M, Islam SS, Chattopadhyay S., "Electrozymographic evaluation of the attenuation of arsenic induced degradation of hepatic SOD, catalase in an in vitro assay system by pectic polysaccharides *of Momordica charantia* in combination with curcumin", *Biochemistry and Biophysics Reports,* 11, 64-71, 2017.

[16] Lund KC, Pantuso T., "Combination effects of quercetin, resveratrol and curcumin on in vitro intestinal absorption", *Restorative Medicine,* 3(1), 112-120, 2014.