

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM MẠN CỦA QUẢ DỨA ĐẠI TRÊN THỰC NGHIỆM

Hoàng Thái Hoa Cương^{1*}, Vũ Thị Ngọc Thanh², Nguyễn Duy Thuần³

¹Trường Đại học Y Dược – ĐH Thái Nguyên, ²Trường Đại học Y Hà Nội,

³Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định độc tính cấp và đánh giá tác dụng chống viêm mạn của cao toàn phần (CTP) và phân đoạn ethyl acetat (PĐE) chiết xuất từ quả Dứa dại trên thực nghiệm. **Phương pháp:** Độc tính cấp được tiến hành theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon, xác định liều chết 50% (LD₅₀). Đánh giá tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng amiant trên chuột nhắt trắng. **Kết quả:** Độc tính cấp: Chưa xác định được độc tính cấp và chưa tính được LD₅₀ của mẫu CTP và PĐE trên chuột nhắt trắng. Chống viêm mạn: CTP và PĐE liều tương đương với 14,4 g được liệu khô/kg được chiết xuất từ quả dứa dại có tác dụng chống viêm mạn rõ rệt trên thực nghiệm.

Từ khóa: Quả dứa dại, cao toàn phần, phân đoạn ethyl acetat, độc tính cấp, chống viêm mạn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Dứa dại (*Pandanus odoratissimus* L.f.) (Tên khác: Dứa gai, Dứa gổ) được coi là loài đặc hữu ở Việt Nam, phân bố ở các tỉnh miền núi hoặc trung du phía Bắc, trên các bãi ẩm có cát, trong các bụi ven biển, dọc bờ ngòi nước mặn, rừng ngập mặn; cũng phân bố trong đất liền ở vĩ độ thấp, dọc theo các sông từ Thái Nguyên, Hòa Bình, Quảng Ninh, Nam Hà tới Quảng Nam, Đà Nẵng, Khánh Hòa, Bình Thuận, Đồng Nai, Kiên Giang. Quả Dứa dại từ lâu đã được sử dụng rộng rãi trong dân gian như sao uống thay trà chữa được chứng mắt mờ, làm nhẹ đầu, tiêu đàm, say nắng, đái buốt. Ngoài ra, khi kết hợp với một số thảo dược khác dứa dại còn điều trị được viêm gan siêu vi, xơ gan, đái tháo đường, bệnh trĩ... [2].

Mặc dù được sử dụng từ rất lâu trong dân gian, nhưng đến nay chưa có nghiên cứu nào về độc tính cũng như tác dụng về quả Dứa dại tại Việt Nam được thực hiện. Để định hướng cho một nghiên cứu về các tác dụng trên gan của quả Dứa dại, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu xác định mức liều an toàn và đánh giá tác dụng chống viêm để xây dựng mô hình nghiên cứu tiếp theo cho được liệu này.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Thuốc nghiên cứu: Cao toàn phần (CTP) và phân đoạn ethyl acetat (PĐE) chiết xuất từ quả Dứa dại (*Pandanus odoratissimus* L.f) do PGS.TS Nguyễn Duy Thuần – Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam cung cấp.

Vì CTP và PĐE không tan hoàn toàn trong nước, nên phải pha CTP và PĐE trong dầu olive cho tan hoàn toàn để cho động vật thực nghiệm uống.

Động vật nghiên cứu: Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống, khỏe mạnh, khối lượng 25 ± 2 g. Động vật được nuôi 5-7 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu bằng thức ăn chuẩn riêng cho từng loại (do Công ty liên doanh Guyomarc’h-VCN và Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp) tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Dược lý – Trường Đại học Y Hà Nội.

Dụng cụ máy móc và hóa chất nghiên cứu: Caragenin 1%, sợi amiant, ether mê, methylprednisolon (Biệt dược Medrol) viên nén 4 mg (Pfizer), cân điện tử, tủ sấy.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định độc tính cấp: Xác định LD₅₀ của mẫu thuốc thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [4].

* Tel: 0912 271076

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm. Từng lô chuột nhất trắng, mỗi lô 10 con, được uống mẫu thuốc nghiên cứu theo liều tăng dần. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột (0%), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100%) và các liều trung gian. Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của thuốc thử. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống mẫu nghiên cứu.

Tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng amiant: Chuột nhất trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con.

- Lô 1 (lô chứng sinh học): Hàng ngày chuột chỉ uống dầu olive với cùng thể tích nhóm uống thuốc

- Lô 2 (chứng dương): Uống methylprednisolon liều 15 mg/kg

- Lô 3 (uống CTP liều 1): Uống CTP liều tương đương với 7,2 g dược liệu khô/kg

- Lô 4 (uống CTP liều 2): Uống CTP liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg

- Lô 5 (uống PĐE liều 1): Uống PĐE liều tương đương với 7,2 g dược liệu khô/kg

- Lô 6 (uống PĐE liều 2): Uống PĐE liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg

- Các thuốc chuẩn hoặc thuốc thử được pha trong nước cất, cho chuột uống với lượng 0,2 ml/10 g

Gây u hạt thực nghiệm theo phương pháp của Ducrot, Julou và cộng sự trên chuột nhất trắng [5].

Amiant được viên thành hạt hình cầu nhỏ khối lượng 6,0 mg, tiệt khuẩn bằng nhiệt độ cao (160°C/ 2 giờ) trước khi cấy vào cơ thể chuột nhất.

Gây viêm mạn bằng cách cấy vào dưới da gáy của chuột viên amiant đã nhúng vào carrageenin 1%. Sau khi cấy amiant, chuột được uống thuốc trong 7 ngày liền. Ngày thứ 8, gây mê chuột bằng ether, bóc tách khối u hạt, sấy ở nhiệt độ 56°C/ 18 giờ.

So sánh khối lượng trung bình của khối u hạt (đã trừ khối lượng amiant) giữa các lô uống

thuốc và lô chứng. Tác dụng chống viêm được biểu thị bằng tỉ lệ % giảm khối lượng khối u.

Xử lý số liệu: Số liệu được nhập và xử lý bằng phương pháp và thuật toán thống kê y sinh học trên phần mềm SPSS 16. Số liệu

được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Kiểm định các giá trị bằng t-test Student hoặc test trước-sau (Avant – Apres). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Độc tính cấp

Độc tính cấp của CTP

Chuột nhất trắng được uống mẫu CTP với liều tăng dần từ 207 gam dược liệu/kg/24 giờ đến 1035 gam dược liệu/kg/24 giờ, với lượng uống hằng định mỗi lần 0,2 ml/10 gam cân nặng, uống 3 lần/24 giờ, các lần uống cách nhau ít nhất 2 giờ.

Sau khi uống mẫu thử, chuột vẫn ăn uống, hoạt động và bài tiết bình thường. Không thấy có biểu hiện ngộ độc ở chuột và không có chuột nào chết trong vòng 72 giờ sau khi uống mẫu thử. Tiếp tục theo dõi trong 7 ngày sau uống mẫu thử thấy chuột vẫn hoàn toàn bình thường, không có biểu hiện gì đặc biệt.

Độc tính cấp của PĐE

Chuột nhất trắng được uống mẫu PĐE với liều tăng dần từ 1350 gam dược liệu/kg/24 giờ đến 6750 gam dược liệu/kg/24 giờ, với lượng uống hằng định mỗi lần 0,2 ml/10 g cân nặng, uống 3 lần/24 giờ, các lần uống cách nhau ít nhất 2 giờ.

Sau khi uống mẫu thử, chuột vẫn ăn uống, hoạt động và bài tiết bình thường. Không thấy có biểu hiện ngộ độc ở chuột và không có chuột nào chết trong vòng 72 giờ sau khi uống mẫu thử. Tiếp tục theo dõi trong 7 ngày sau uống mẫu thử thấy chuột vẫn hoàn toàn bình thường, không có biểu hiện gì đặc biệt.

Tác dụng chống viêm mạn

Trên mô hình gây viêm mạn thực nghiệm bằng cấy amiant, xác định khối lượng khối u hạt của các lô chứng và các lô uống thuốc, kết quả thu được như sau:

Bảng 1. Khối lượng trung bình u hạt thực nghiệm

Lô nghiên cứu	n	Khối lượng u hạt (mg) ($\bar{X} \pm SE$)	Tỉ lệ giảm khối lượng u hạt (%)
Lô 1 (chứng sinh học)	10	20 \pm 6,51	
Lô 2 (prednisolon 5,0 mg/kg)	10	13,3 \pm 4,32	33,5
Lô 3 (CTP liều 1)	10	16,3 \pm 5,12	18,5
Lô 4 (CTP liều 2)	10	15,0 \pm 2,73	24,5
Lô 5 (PĐE liều 1)	10	15,7 \pm 4,32	21,5
Lô 6 (PĐE liều 2)	10	15,2 \pm 2,62	24
		p1-2 < 0,05	p2-3 > 0,05
		p1-3 > 0,05	p2-4 > 0,05
		p1-4 < 0,05	p2-5 > 0,05
		p1-5 > 0,05	p2-6 > 0,05
		p1-6 < 0,01	p3-4 > 0,05
			p5-6 > 0,05

Kết quả ở bảng 1 cho thấy:

- Khối lượng u hạt ở 2 lô uống thuốc thử là CTP và PĐE liều 2 và lô uống prednisolon đều giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$). Hai lô uống CTP và PĐE liều 1 mặc dù có giảm khối lượng u hạt so với lô chứng nhưng chưa có ý nghĩa thống kê.

- Không có sự khác biệt rõ rệt về khối lượng u hạt giữa các lô uống thuốc thử và prednisolon.

BÀN LUẬN

Bàn luận về độc tính cấp

Theo hướng dẫn của WHO, tất các các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu hay hóa chất đều phải đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn trên súc vật trước khi đưa vào thử nghiệm trên người [10]. Hơn nữa, quả Dứa dại tại Việt Nam mặc dù đã được sử dụng từ rất lâu trong dân gian để làm thuốc chữa bệnh nhưng đến nay vẫn chưa có công bố về độc tính của dược liệu này trên thực nghiệm. Chính vì vậy, việc xác định độc tính cấp và liều chết 50% để đánh giá mức độ độc và có cơ sở chọn liều thử tác dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Theo kinh nghiệm dân gian, để chữa các bệnh về gan, quả dứa dại dùng với liều khoảng 30 g quả phơi khô/ngày sắc nước uống, tương đương 0,6 g dược liệu/ kg/ ngày (tính trung bình người nặng 50 kg). Ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và chuột nhắt trắng có hệ số là 12, vậy liều dùng ở chuột để có tác dụng tương đương trên người là 7,2 g dược liệu/ kg/ ngày.

- Cho chuột nhắt trắng uống mẫu CTP theo liều tăng dần từ 207g dược liệu/kg/24 giờ (*gấp 28,75 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) đến liều cao nhất có thể được (nồng độ và thể tích tối đa cho phép) là 1035 g dược liệu/kg/24 giờ (*gấp 143,75 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) nhưng không thấy dấu hiệu bất thường nào trên chuột và không có chuột nào chết.

- Cho chuột nhắt trắng uống mẫu PĐE theo liều tăng dần từ 1350 g dược liệu/kg/24 giờ (*gấp 187,5 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) đến liều cao nhất có thể được (nồng độ và thể tích tối đa cho phép) là 6750 g dược liệu/kg/24 giờ (*gấp 937,5 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) nhưng không thấy dấu hiệu bất thường nào trên chuột và không có chuột nào chết.

Vì vậy, chưa xác định được độc tính cấp và chưa tính được LD₅₀ của mẫu CTP và PĐE trên chuột nhắt trắng theo đường uống. Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới Dứa dại là dược liệu an toàn [10].

Chống viêm mạn tính

Mô hình gây viêm mạn tính sử dụng các kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức (như kháng nguyên là các amiant, protein, virus). Khi cấy amiant là một vật lạ không tiêu đóng vai trò là kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức vào dưới da gây của chuột sẽ khởi động quá trình đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào là phương thức miễn dịch thứ hai bên cạnh đáp ứng miễn dịch dịch thể nhằm loại trừ kháng

nguyên lạ, do các lympho bào T phụ trách [6], [7], carragenin có bản chất là polysaccharid, có khả năng kích thích quá trình viêm [3], [9]. Cây amiant đã nhúng carragenin vào dưới da chuột sẽ kích thích quá trình viêm mạnh hơn chỉ cây amiant đơn thuần. Khi đó cơ thể chuột sẽ phản ứng viêm bằng cách tập trung nhiều tế bào, tạo ra mô bào lưới, nguyên bào sợi bao quanh vật lạ, tạo nên hình ảnh u hạt của mô hình viêm gan thực nghiệm [6], [8]. Prednisolon là thuốc chống viêm steroid kinh điển, tác dụng chủ yếu chống viêm mạn tính do ức chế đáp ứng miễn dịch chủ yếu qua trung gian tế bào do các lympho bào T đảm nhận nên được dùng làm thuốc chứng dương trên mô hình gây viêm mạn tính [6], [8]. Trong nghiên cứu này, methylprednisolon đường uống được lựa chọn làm thuốc chuẩn để so sánh vì methylprednisolon là thuốc chống viêm mạnh thường được dùng trên người [1].

Thuốc nghiên cứu có tác dụng chống viêm mạn sẽ ức chế sự tạo thành u hạt, làm giảm khối lượng u hạt tạo thành so với nhóm chứng không dùng thuốc. Thông qua việc so sánh khối lượng u hạt giữa các lô uống thuốc thử và thuốc đối chứng, có thể đánh giá được thuốc có tác dụng chống viêm mạn hay không.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy hai lô uống CTP liều 2 và PDE liều 2 đều có tác dụng ức chế sự tạo thành u hạt sau khi gây viêm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$) và tương đương so với lô uống prednisolon, với tỉ lệ giảm khối lượng u hạt tương ứng ở lô uống CTP liều 2 là 24,5% và PDE liều 2 là 24%, ở lô uống prednisolon là 33,5%.

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa khối lượng u hạt của các lô uống thuốc thử so với nhau và so với lô uống prednisolon ($p > 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho CTP liều tương đương với 14,4g dược liệu khô/kg và PDE liều tương đương với 14,4g dược liệu khô/kg được chiết xuất từ quả dứa dại có tác dụng chống viêm mạn rõ rệt tương đương với methylprednisolon trên thực nghiệm.

KẾT LUẬN

- Về độc tính cấp: Chưa xác định được độc tính cấp và chưa tính được LD50 của mẫu CTP và PDE trên chuột nhắt trắng theo đường uống. Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới Dứa dại là dược liệu an toàn.

- Về tác dụng chống viêm mạn: CTP liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg và PDE liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg được chiết xuất từ quả dứa dại có tác dụng chống viêm mạn rõ rệt trên thực nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội (2012), *Dược lý học lâm sàng*, Nxb Y học.
2. Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 792 – 794.
3. Đỗ Trung Đàm (1997), “Đánh giá mô hình gây phù thực nghiệm bằng cao lạnh và carragenin để nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của thuốc”, *Tạp chí Dược học* (số 12), tr. 18 – 21.
4. Đỗ Trung Đàm (2104), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nxb Y học, Hà Nội, tr. 101 – 115.
5. Ducrot R., Julou L. (1965), “Turner, Screening methods in pharmacology”, *Academic press*, (5), pp. 114-115.
6. Gerhard Vogel H. (2002), *Drug discovery and evaluation Pharmacological assays, Chapter H: analgesic, anti-inflammatory, anti-pyretic activity*, Springer, pp. 669-774.
7. Kyoung Soo Kim, Hae In Rhee, Eun Kyung (2008), “Anti-inflammatory effects of Radix Gentianae Macrophyllae(Qinjiao), Rhizoma Coptidis (Huanglian) and Citri Unshiu Pericarpium(Wenzhou migan) in animal models”, *Chinese Medicine 2008*, 3, pp. 10.
8. Mitul Patel (2012), “In vivo animal models in preclinical evaluation of anti inflammatory activity- a review”, *International journal of pharmaceutical research and allied sciences*, Vol. 1, Issue 2, pp. 01- 05.
9. Nagoev B. S., Abidw M. T., Ivanova M. R. (2002), “LPO and free-radical oxidation parameters in patients with acute viral hepatitis”, *Bull. Exp. Bio. Med.*, 134 (6), pp. 557 – 558.
10. World Health Organization (2000), *Working group on the safety and efficacy of herbal medicine*, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.

ABSTRACT

STUDY OF ACUTE TOXICITY AND CHRONIC ANTI - INFLAMMATORY EFFECTS OF PANDANUS FRUITS IN EXPERIMENTS**Hoang Thai Hoa Cuong^{1*}, Vu Thi Ngoc Thanh², Nguyen Duy Thuan³**¹University of Medicine and Pharmacy - TNU, ²Hanoi Medical University³Vietnam University of Traditional Medicine

Objectives: To estimate acute toxicology and evaluate chronic anti – inflammatory of total extract (TE) and ethyl acetate extract (EAE) of *Pandanus odoratissimus* L.f. fruits in experiments. **Method:** Acute toxicology was conducted based on method of Litchfield – Wilcoxon to calculate LD₅₀. Chronic anti-inflammatory effect was assessed through amiant- induced granuloma model in mice. **Results:** Acute toxicology: No acute toxicology was detected and LD₅₀ was not able to be calculated of TE and EAE in mice. Chronic anti – inflammatory: TE and EAE extracted from *Pandanus odoratissimus* L.f. fruits with equivalent doses of 14.4 grs/kg have chronic anti-inflammatory effects in experiments.

Keywords: *Pandanus fruit, TE, EAE, Acute toxicology, Chronic anti – inflammatory*

Ngày nhận bài: 08/9/2017; Ngày phản biện: 25/9/2017; Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

* Tel: 0912 271076