

- cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results of the PALMS study. JNCI J Natl Cancer Inst. 105(20), 1550-1557.
7. Schmidt D., Bergeron C., Denton K.J., Ridder R. (2011), p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: Results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. Cancer Cytopathol. 119:158-166.
 8. K.Ulrich Petry, Dietmar Schmidt, Sarah Scherbring et al (2011), Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. Gynecologic Oncology.121(3), 505-509.
 9. Ordi J., Sagasta A., Munmany M., Rodriguez CL., et al (2014), Usefulness of p16/Ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. Cancer Cytopathology. 122(3):227-35.
 10. White C, Bakhiet S, Bates M, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C. et al. (2016) Triage of LSIL/ASC-US with p16/Ki-67 dual staining and human papillomavirus testing: a 2-year prospective study. Cytopathology. 27:269–76.

HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM, KHÁNG ĐỘNG VẬT NGUYÊN SINH CỦA CAM THẢO NAM (SCOPARIA DULCIS)

Phạm Thị Nhật Trinh¹, Lê Tiến Dũng², Nguyễn Thị Thùy Trang³,
Nguyễn Cửu Khoa², Hoàng Ngọc Anh², Alexey Osipov⁴,
Elena Cheremnykh⁵, Yuri Utkin⁴

TÓM TẮT

Bài báo này tiến hành đánh giá hoạt tính kháng viêm và kháng động vật nguyên sinh của cao chiết ethanol 30%, ethanol 96% và 1 số chất phân lập được từ toàn cây cam thảo nam thu hái tại Vĩnh Long. Kết quả cho thấy, cao ethanol 96% ức chế sản sinh nitric oxide ở nồng độ dưới 100µg/ml trên mô hình tế bào RAW264.7 gây viêm bởi LPS. Trên mô hình thực nghiệm gây viêm cấp tính bằng carrageenan 1% ở chuột nhắt trắng, lô điều trị bằng cao chiết 96% liều 500 mg/kg có độ sưng phù thấp hơn (chưa có ý nghĩa thống kê) so với lô chứng bệnh ở tất cả các thời điểm khảo sát. Lô điều trị bằng cao chiết 30% liều 500 mg/kg có độ sưng phù thấp hơn (có ý nghĩa thống kê) so với lô chứng bệnh ở các thời điểm 1 giờ, 5 giờ và 24 giờ. So với lô chứng dương (điều trị bằng diclofenac liều 5mg/kg), chuột được điều trị với cao chiết 30%, liều 500 mg/kg có độ sưng phù khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng dương ở hầu hết các thời điểm khảo sát (V1, V3, V5). Những kết quả trên cho thấy cao chiết với ethanol 30% có tác động kháng viêm tốt hơn cao ethanol 96%, sau 24 giờ khảo sát. Ngoài ra, cao ethanol 30% và ethanol 96% có tác động kháng động vật nguyên sinh *Tetrahymena pyriformis* sau 24 giờ ủ với cao chiết ở nồng độ 25 mg/ml. Sử dụng các phương pháp sắc ký,

đã phân lập và xác định cấu trúc 5 hợp chất từ cao ethanol 96% (1-5), thử nghiệm chống động vật nguyên sinh với 3 chất (1-3) cho thấy cả 3 chất đều có hoạt tính chống động vật nguyên sinh ở mức trung bình. **Từ khóa:** cam thảo nam, kháng viêm, kháng động vật nguyên sinh, *Tetrahymena pyriformis*

SUMMARY

ANTI-INFLAMMATORY, ANTI-PROTOZOAL ACTIVITIES OF SCOPARIA DULCIS

This study was designed to evaluate the anti-inflammatory and antiprotozoal activities of 30% and 96% ethanolic extracts and isolated compounds from the whole plant of *Scoparia dulcis* collected in Vinh Long. The results showed that 96% ethanolic extract inhibited nitric oxide production at concentrations below 100 µg/ml in the LPS-induced RAW 264.7 macrophages. In the model of carrageenan-induced paw edema in mice, the group treated with 96% ethanolic extract at a dose of 500 mg/kg indicated lower swelling (not statistically significant) than the negative control group at all time points of the experiment. The group treated with 30% ethanolic extract at a dose of 500 mg/kg showed lower swelling (statistically significant) compared with the negative control group at time point of 1h, 5h and 24h. Compared with the positive control group (treated with diclofenac at a dose of 5mg/kg), mice treated with 30% ethanolic extract, at a dose of 500 mg/kg showed no statistically significant difference in swelling compared with the positive control group in time point of 1h, 3h and 5h. The above results proved that the 30% ethanolic extract possessed a better anti-inflammatory effect than the 96% ethanolic extract, after 24 hours of experiment. In addition, 30% and 96% ethanolic extracts had antiprotozoal activity against *Tetrahymena pyriformis* after 24 hours of incubation with two these extracts at a concentration of 25 mg/ml. Using chromatographic techniques, 5 compounds were isolated and structurally determined from extract with 96% alcohol

¹Đại học Tiền Giang, Việt Nam

²Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng (VAST), Việt Nam

³Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam

⁴Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow 117997, Nga

⁵Mental Health Research Centre, Moscow 115522, Nga

Chịu trách nhiệm chính:

Email:

Ngày nhận bài: 3.11.2023

Ngày phản biện khoa học: 18.12.2023

Ngày duyệt bài: 5.01.2024

of *Scoparia dulcis* whole plant (cpd.1-5). Evaluating the antiprotozoal activity of compounds 1-3 indicated that all possessed moderate antiprotozoal activity.

Keywords: *Scoparia dulcis*, anti-inflammatory, anti-protozoal activities, *Tetrahymena pyriformis*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm là hoạt động bình thường của phản ứng bảo vệ vật chủ đối với tổn thương mô do nhiều kích thích như chấn thương vật lý, hóa chất và tác nhân truyền nhiễm [1, 2]. Hơn nữa, rối loạn chức năng viêm dẫn đến các bệnh mãn tính đang góp phần làm tăng chi phí chăm sóc sức khỏe cho xã hội [3]. Các thuốc chống viêm không steroid (NSAID), steroid và thuốc ức chế miễn dịch đã được sử dụng để xử lý các dạng viêm nhiễm [4]. Tuy nhiên, những loại thuốc này lại gây ra nhiều tác dụng phụ như viêm mạch máu, nhức đầu, thiếu máu tán huyết và các vấn đề liên quan đến suy giảm miễn dịch [5, 6].

Hơn nữa, các bệnh truyền nhiễm là một vấn đề xã hội và y tế cấp bách ở hầu hết các khu vực trên thế giới, và một tỷ lệ không nhỏ trong số chúng là do động vật nguyên sinh đơn bào gây ra. Bệnh lý nhiễm trùng gây ra bởi động vật nguyên sinh ảnh hưởng đến hàng trăm triệu người, chủ yếu ở châu Á, châu Phi và Mỹ Latinh. Việc điều trị các bệnh lý nhiễm động vật nguyên sinh còn hạn chế về hiệu quả và thường gây thêm các tác dụng phụ nghiêm trọng [8]. Ngoài ra, hiệu quả điều trị bị cản trở bởi sự phát triển tính kháng thuốc của mầm bệnh [9]. Độc tính của thuốc đối với cơ thể, những khó khăn trong quản lý và thời gian điều trị, cũng như hiệu quả thấp của chúng đã kích thích việc tìm kiếm các hoạt chất kháng động vật nguyên sinh mới.

Do đó việc tìm kiếm và phát triển được phẩm từ các nguồn dược liệu trong nước là vấn đề đang được quan tâm hiện nay nhờ đặc điểm rẻ tiền, ít gây tác dụng không mong muốn.

Cây cam thảo nam được nhân dân dùng chữa sốt, dị ứng mề đay, rôm sảy, eczema, lở ngứa, cảm mạo, ho hen [10]. Tuy nhiên việc đánh giá thành phần hóa học và tác dụng kháng viêm, chống động vật nguyên sinh của dược liệu này hiện vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Vì vậy, bài báo này trình bày kết quả đánh giá hoạt tính kháng viêm, kháng động vật nguyên sinh và thành phần hóa học của cam thảo nam thu hái tại Vĩnh Long.

II. THỰC NGHIỆM

Phương tiện, thiết bị và vật liệu thí nghiệm

Vật liệu: Toàn cây Cam thảo nam thu hái tại Vĩnh Long vào tháng 10/2020.

Thiết bị được sử dụng: cô quay chân không (Heidolph, Đức), kính hiển vi hai mắt soi nổi MBS-10 (Nga), máy đếm tế bào BioLat - 3.2 (OOO Europolitest, Moscow oblast, Pushkino).

Hóa chất: Ethanol (Việt Nam), Diclofenac (Sigma-Aldrich), Casein (Merck KGaA, Darmstadt, Đức), glucose (Merck), dịch chiết nấm men Springer 0251 (Bio Springer, Maisons-Alfort, Pháp), NaCl (Merck), DMEM (Sigma-Aldrich), MTT (Sigma-Aldrich), Griess reagent (Sigma-Aldrich), LPS (Sigma-Aldrich).

Điều chế cao chiết. Nguyên liệu sau khi thu hái phải được loại bỏ lá héo, phần bị úng. Sau khi đó được rửa sạch, để ráo, phơi khô tự nhiên trong mát có quạt. Mẫu cây sau khi phơi khô sẽ được xay thành bột và được chiết xuất (tỷ lệ: 1 nguyên liệu/10 dung môi, w/v) với ethanol 30% và ethanol 96% cho đến kiệt. Lọc và cô dưới áp suất giảm thu được cao ethanol 30% và cao ethanol 96%.

Hoạt tính chống động vật nguyên sinh

Chuẩn bị mẫu thử nghiệm: Cân 0,5 g cao ethanol và hòa tan trong 0,5 ml ethanol 30% hoặc 96% (tương ứng với nồng độ ethanol chiết xuất), sau đó định mức đến 5ml bằng ethanol 96.5% để thu được dung dịch gốc nồng độ 100mg/ml. Mẫu sau khi hòa tan đem hạ nhiệt xuống 6°C (trong lạnh), và ly tâm trong 3 phút ở tốc độ 3000 vòng/phút, hút 0.5 ml dịch chiết và pha loãng thành dãy nồng độ rồi xác định hoạt tính sinh học.

Nuôi cấy động vật nguyên sinh. Động vật nguyên sinh *Tetrahymena pyriformis* (chủng WH14) được lấy từ bộ sưu tập của Viện Nghiên cứu Vệ sinh Thú y và Sinh thái (Moscow, Nga). Nuôi cấy động vật nguyên sinh được thực hiện trong môi trường vô trùng gồm tryptone (10 g/L), chiết xuất nấm men (2 g/L), glucose (5 g/L) và NaCl (1 g/L). Môi trường được đổ vào các ống nghiệm có nút bông gạc, mỗi ống 4 mL, sau đó được khử trùng bằng nồi hấp ở áp suất 0,5 atm trong 30 phút. Sau khi làm mát, động vật nguyên sinh được cấy vào môi trường. Các ống nghiệm được giữ trong máy điều nhiệt ở nhiệt độ không đổi 25 °C. Sau 4-5 ngày, động vật nguyên sinh được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo, các tế bào được quan sát bằng kính hiển vi hai mắt soi nổi MBS-10.

Đánh giá độc tính trên động vật nguyên sinh *Tetrahymena pyriformis*. Phương pháp được sử dụng trước đây để phân tích hoạt tính tương tự của nọc rắn đã được sử dụng [7]. Phương pháp này bao gồm quy trình đếm tế bào *T. pyriformis* trên thiết bị BioLat - 3.2 (OOO

Europolitest, Moscow oblast, Pushkino).

Động vật nguyên sinh (mật độ 2000-4000 tế bào) được nuôi cấy trong môi trường chứa 0,5% casein (Merck KGaA, Darmstadt, Đức), 0,5% glucose, 0,1% dịch chiết nấm men Springer 0251 (Bio Springer, Maisons-Alfort, Pháp) và 0,1% NaCl.

Để xác định độc tính của cao chiết, các dung dịch thử nghiệm (5–50 μ L) đã được thêm vào môi trường có tế bào *T. pyriformis* trong các giếng và số lượng tế bào sống sót sau 24 giờ được đếm bằng BioLat - 3.2. Mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần.

Để xác định độc tính của chất tinh khiết, methanol được sử dụng để hòa tan các hợp chất này. Các chất tinh khiết được xác định ở nồng độ 1.5% - là nồng độ pha stock ban đầu.

Tỷ lệ sống (K) được tính toán theo công thức

$$K = T_{24}/T_0$$

Trong đó: T_{24} : là số lượng tế bào sống trong mẫu sau 24 giờ tiếp xúc; T_0 : số lượng đơn bào sống khi bắt đầu thí nghiệm.

Trong các thí nghiệm đối chứng, các cao chiết được thay bằng nước cất và tính toán hệ số K tương tự các thí nghiệm có sử dụng cao chiết. hệ số K lúc này là: $2 < K < 2.5$.

Thí nghiệm sử dụng dung dịch CuSO_4 (0,1 μ M) được sử dụng làm chất chứng dương để gây chết tất cả các tế bào trong vòng một giờ.

Hoạt tính kháng viêm in vitro. Tế bào Raw 264.7 được nuôi cấy trong môi trường RPMI chứa 10% FBS, ở 37 °C và 5% CO_2 trong tủ ủ. Tế bào được cấy trên đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^4 tế bào/giếng/100 μ L, ủ trong 24 giờ. Sau đó, được xử lý với cao chiết ở nồng độ thích hợp (pha trong DMSO). Một giờ sau khi xử lý với cao chiết, LPS (pha trong PBS ở pH 7,4) được thêm vào các giếng ở nồng độ cuối là 1 μ g/mL. Sau 24 giờ, dịch nuôi cấy được thu nhận để đo mức độ tiết NO bằng thuốc nhuộm Griess.

+ Mẫu chứng âm (Neg): tế bào không xử lý với cao chiết hoặc thuốc Dexamethasone, không xử lý LPS.

+ Mẫu chứng bệnh (LPS): tế bào xử lý với LPS, không xử lý thuốc hoặc cao chiết.

+ Mẫu chứng dương (Dex): tế bào xử lý với LPS, sau đó xử lý với dexamethasone 15 μ M.

+ Mẫu thử nghiệm: tế bào xử lý với LPS, sau đó xử lý với cao chiết ở các nồng độ.

Nồng độ nitrite của mỗi mẫu được xác định dựa vào đường chuẩn natri nitrite; 100 μ L dịch nuôi tế bào được trộn với thể tích tương ứng của thuốc thử Griess.

+ Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng.

+ Đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm trên

máy Microplate reader.

Thử nghiệm in vivo

- Chuẩn bị trước khi gây viêm. Chuột được phân lô sơ bộ theo thể trọng và thể tích chân Mỗi bocal chứa trung bình 8-10 chuột. Trước khi gây viêm, tiến hành đo thể tích chân chuột ban đầu (V_0)

- Tiến hành gây viêm và khảo sát hoạt tính kháng viêm. Chuột được chia và nuôi trong các bocal nhựa cho thích nghi với môi trường hai ngày trong điều kiện phòng thí nghiệm, cho chuột ăn uống đầy đủ trong suốt quá trình làm thí nghiệm. Chuột được phân chia ngẫu nhiên vào các lô:

Lô chứng: uống nước cất.

Lô đối chứng: uống Diclofenac liều 5 mg/kg.

Lô thử nghiệm 1 (SDE96, 500 mg/kg): uống cam thảo nam 96 liều 500 mg/kg

Lô thử nghiệm 2 (SDE30 500 mg/kg): cam thảo nam 30 liều 500 mg/kg

Lô thử nghiệm 3 (SDE30 250 mg/kg): cam thảo nam 30 liều 250 mg/kg

Chuột ở các lô đều được cho uống với thể tích 0,1 ml/10 g thể trọng và uống vào 1 giờ cố định trong 6 ngày liên tiếp. Dung dịch carrageenan 1% được pha trong dung dịch nước muối NaCl 0,9% trước khi tiêm 2 giờ để carrageenan trương nở hoàn toàn. Trước khi tiêm, dùng mực đánh dấu khuỷu chân chuột ở vị trí khớp xương chày cổ chân chuột và đo thể tích chân chuột khi bình thường. Vào ngày thứ 7 sau khi dùng thuốc 1 giờ thì tất cả con chuột đưa vào quá trình thử nghiệm đều được gây viêm bằng cách tiêm dưới da gan bàn chân trái sau 0,04 ml carrageenan 1%. Đo thể tích bàn chân chuột vào các thời điểm 1 giờ, 3 giờ, 5 giờ và 24 giờ sau khi gây viêm.

Tác động kháng viêm được đánh giá dựa vào mức độ sưng phù bàn chân chuột giữa các lô thử nghiệm với lô chứng và lô đối chứng.

Độ phù chân chuột (X%) là tỷ lệ phần trăm độ chênh lệch thể tích bàn chân chuột trước và sau khi gây viêm, được tính bằng công thức sau:

$$X\% = \frac{V_s - V_0}{V_0} \times 100$$

Trong đó: X%: Độ phù chân chuột.

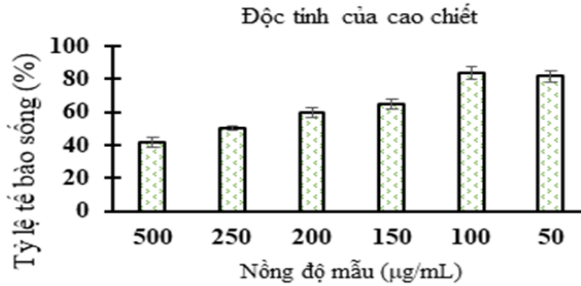
V_0 : Thể tích bàn chân chuột đo được trước khi tiêm carrageenan.

V_s : Thể tích bàn chân chuột đo được sau khi tiêm carrageenan.

Số liệu được xử lý bằng phần mềm minitab, phép kiểm mann - whitney

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt tính kháng viêm in vitro. Cao chiết ethanol 96% của cam thảo nam được đánh giá độc tính trên dòng tế bào RAW264.7. Kết quả được trình bày trong hình 1.

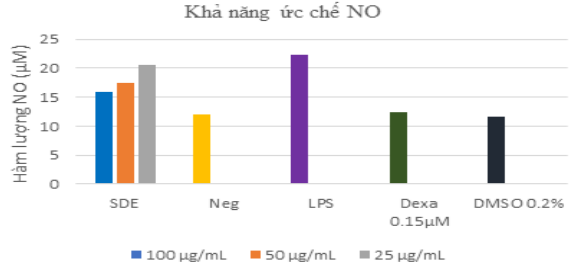


Hình 1. Độc tính của cao chiết

Ở nồng độ cao (>150 µg/mL), cao chiết gây chết tế bào, mật độ tế bào sống < 80%. Do vậy ngưỡng nồng độ dưới 100 µg/mL sẽ được chọn để đánh giá hoạt tính kháng viêm thông qua ức chế nitric oxide.

Để đánh giá tác động kháng viêm, đề tài tiến hành khảo sát khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào RAW 264.7 dưới tác động của các cao chiết ở các nồng độ là 25, 50 và 100 µg/mL. Tác nhân LPS được dùng để gây viêm, dexamethasone là chất đối chiếu. Kết quả được trình bày trong hình 2. Kết quả cho thấy, ở mẫu tế bào không xử lý với LPS, hàm lượng NO ở mức 11.9 µM. Ở mẫu chỉ xử lý tế bào với dung môi DMSO (dung hòa tan cao chiết), hàm lượng NO cũng không có biến đổi nhiều (11.6 µM) chứng tỏ DMSO không ảnh hưởng đến quá trình sản xuất nitric oxide. Trong mẫu tế bào gây viêm bằng LPS và không xử thêm với cao chiết hoặc thuốc đối chiếu, hàm lượng nitric oxide đã tăng

thêm 87.63% (22.37 µM) so với tế bào không xử lý bằng LPS. Trong khi đó, ở các mẫu tế bào xử lý bằng cao chiết hàm lượng nitric oxide đã giảm so với tế bào xử lý với LPS. Như vậy cao chiết ethanol cam thảo nam thể hiện tác động kháng viêm thông qua ức chế sản sinh nitric oxide trong tế bào gây viêm.



Hình 2. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng viêm in vitro

Neg: tế bào không xử lý; DMSO: tế bào xử lý với dung dịch DMSO 0.2%; LPS: tế bào xử lý với chất kích viêm LPS; Dexa: tế bào được gây viêm với LPS và ủ với thuốc desamethasone; SDE: tế bào được gây viêm với LPS và ủ với cao ethanol 96% cam thảo nam

Kết quả kháng viêm cấp trên mô hình thực nghiệm. Từ kết quả in vitro, cam thảo nam được tiếp tục đánh giá trên mô hình thực nghiệm. Nguyên liệu được chiết với 2 dung môi là ethanol 30% và ethanol 96%, sau đó được đánh giá trên mô hình gây viêm cấp tính, chỉ số theo dõi là độ phù chân của chuột sau 1, 3, 5 và 24 giờ (được ghi là V1, V3, V5 và V24 trong bảng) gây viêm bằng dung dịch carrageenan 1%. Kết quả độ phù chân chuột được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định độ phù chân chuột phù ở các thời điểm

STT	Lô thử nghiệm	Độ phù chân chuột (%)			
		1 giờ	3 giờ	5 giờ	24 giờ
1	Chứng bệnh	52.88 ± 3.48	69.64 ± 3.43	72.54 ± 4.72	63.88 ± 3.48
2	Diclofenac 5 mg/kg	35.81** ± 3.72	46.07** ± 2.33	50.35** ± 2.61	19.22** ± 2.16
3	SDE96, 500 mg/kg	50.9# ± 3.52	67.35## ± 4.17	61.64# ± 2.46	53.28 ± 2.83
4	SDE30, 500 mg/kg	36.93** ± 2.42	59.44 ± 5.97	52.9** ± 3.36	27.33**# ± 2.97
5	SDE30, 250 mg/kg	44.01 ± 2.64	67.63 ± 1.97	58.4 ± 2.69	40.59**## ± 2.79

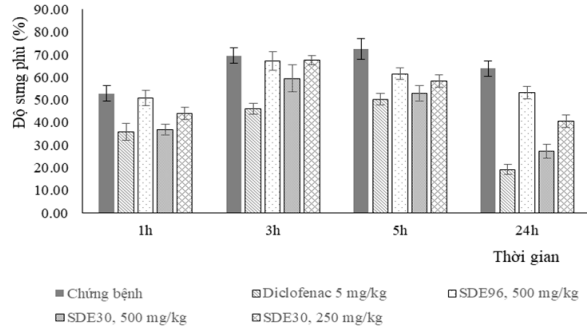
*(p<0,05), ***(p<0,01): khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh
#(p<0,05), ##(p<0,01): khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng dương

Ở lô chuột được điều trị bằng uống diclofenac liều 5 mg/kg có độ sưng phù thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ở tất cả các thời điểm khảo sát. Vậy diclofenac có tác động kháng viêm tốt và có thể làm chất đối chứng trong mô hình gây viêm bằng carrageenan. Ở các lô điều trị, tại thời điểm 5 giờ

sau khi gây viêm, các cao chiết đều thể hiện tác động kháng viêm và rõ nhất tại thời điểm 24 giờ sau gây viêm. Chuột uống cao cam thảo nam 96 liều 500 mg/kg có độ sưng phù thấp hơn so với lô chứng bệnh ở tất cả các thời điểm khảo sát. Tuy nhiên, sự khác biệt này chưa mang ý nghĩa thống kê, do đó cao chiết cam thảo nam

96 liều 500 mg/kg chưa thể hiện tác động kháng viêm trên mô hình gây viêm bằng carrageenan.

So với lô diclofenac 5 mg/kg, chuột uống cao cam thảo nam 30 liều 500 mg/kg có độ sưng phù khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với diclofenac 5 mg/kg ở hầu hết các thời điểm khảo sát (1, 3 và 5 giờ). Ở thời điểm 24 giờ, độ sưng phù của chuột uống cao cam thảo nam 30 liều 500 mg/kg cao hơn có ý nghĩa thống kê so với diclofenac liều 5 mg/kg. Vậy cao cam thảo nam 30 liều 500 mg/kg có tác động kháng viêm tương đương diclofenac 5 mg/kg ở các thời điểm 1, 3 và 5 giờ nhưng kém hơn diclofenac từ ở thời điểm 24 giờ.



Hình 3. Kết quả đánh giá hoạt tính thử nghiệm in vivo của cao ethanol cam thảo nam nồng độ 30% và 96%

Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy trên cùng 01 dược liệu thì cao chiết bằng ethanol 30% có độ phù chân chuột thấp hơn so với các cao chiết bằng ethanol 96%. Kết quả nghiên cứu góp phần định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc chọn lựa dung môi chiết có độ ethanol thấp để chiết được các hoạt chất phân cực có tác động kháng viêm.

Hoạt tính chống động vật nguyên sinh.

Đánh giá tiếp tác động chống động vật nguyên sinh trên chủng Tetrahymena pyriformis của cao chiết ethanol 30% và ethanol 96%, kết quả cho thấy cam thảo nam đều thể hiện hoạt tính chống động vật nguyên sinh sau 24 giờ ủ chung với cao chiết (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng ức chế tăng trưởng động vật nguyên sinh

Loại thực vật	Nồng độ (mg/ml)	Tỷ lệ sống (K)	
		Cao ethanol 30%	Cao ethanol 96%
Scoparia dulcis (SD)	6.25	2,92±0.01	3,74±0.03
	12.5	2,74±0.08	3,04±0.04
	25	0,00	0,00
	50	0,00	0,00

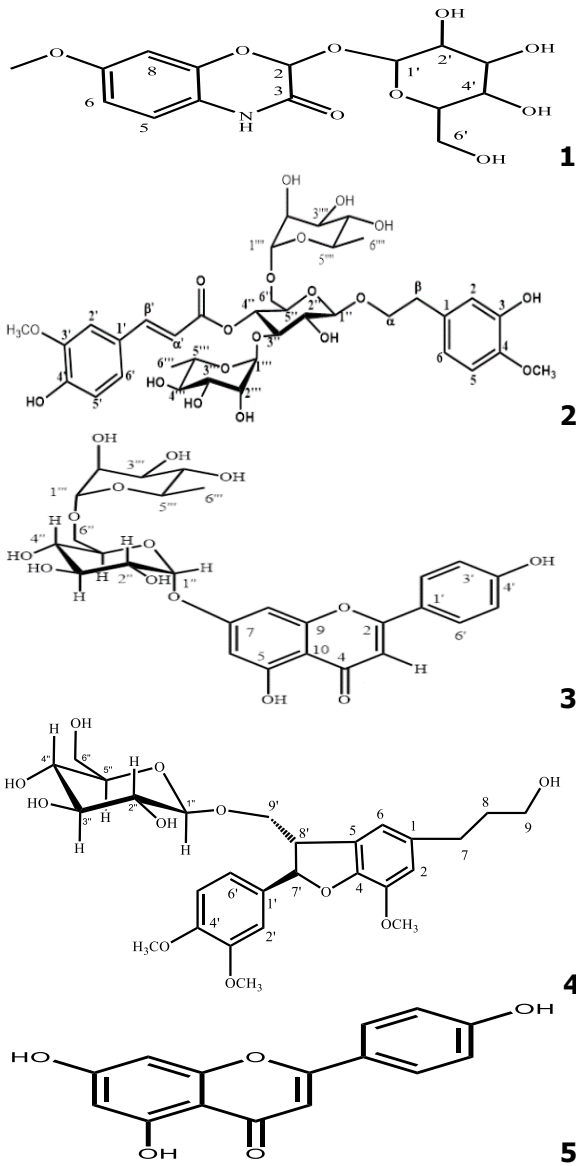
Cao chiết của cam thảo nam ở cả 2 loại dung môi ethanol 30% và 96% đều ức chế tăng

trưởng động vật nguyên sinh ở nồng độ 25 mg/ml. So với tác động của một số nọc rắn đã công bố, tác dụng của cam thảo nam yếu hơn.

Phân lập chất từ cam thảo nam. Phần trên mặt đất của cây cam thảo nam (4.5 kg) được chiết kiệt với ethanol 96% ở nhiệt độ phòng. Lọc thu dịch lọc và cô quay dưới áp suất giảm thu được cao mềm (280g). Phân tán cao mềm trong lượng tối thiểu methanol, sau đó hấp phụ với silica gel và tiến hành chiết pha rắn. Dung môi giải hấp lần lượt là hexan, ethyl acetate, methanol thu được các cao tương ứng.

Phân đoạn methanol (SDM) được phân chia bằng sắc ký cột silica gel, giải hấp với hỗn hợp EtOAc:MeOH:H₂O (25:1:1, 20:1:1, 10:1:1, 8:1:1, 5:1:1) thu được 3 phân đoạn (SDM1-3). Phân đoạn SDM2 (21.9 g) tiếp tục nạp lên cột silica gel và giải hấp với hỗn hợp CHCl₃:MeOH (30:1; 10:1 và 8:1, v/v) cho ra 8 phân đoạn (SDM2.1-8). Phân đoạn SDM2.7 được tiến hành sắc ký trên cột silica gel, sử dụng dung môi CHCl₃:MeOH (8:1 - 5:1, v/v) thu được 6 phân đoạn (SDM2.7.1-6). Phân đoạn SDM2.7.5 được phân tách trên cột silica gel giải hấp bằng CHCl₃:MeOH (8:1), và tiếp tục tinh chế trên sắc ký gel sephadex LH20 (MeOH) thu được hợp chất 1 (218 mg). Phân đoạn SDM2.7.6 được phân tách trên cột Sephadex LH 20 sử dụng MeOH làm dung môi triển khai, thu được 3 phân đoạn SDM2.7.6.1-3. Phân đoạn SDM2.7.6.2 được tiếp tục sắc ký trên cột ODS, dung môi giải hấp MeOH: H₂O (1:3 - 1:1) thu được 2 (18.2 mg). Phân đoạn SDM2.7.3 được nạp lên cột sắc ký ODS, dung môi giải hấp là MeOH:H₂O (1:3) thu được 7 phân đoạn (SDM2.7.3.1-7). Phân đoạn SDM2.7.3.1 được tách thông qua sephadex LH20, sau đó tinh chế trên cột silica gel với dung môi giải hấp CHCl₃: MeOH (6:1) thu được hợp chất 3 (12.0 mg). Hợp chất 4 (6 mg) thu được từ phân đoạn SDM2.7.3.4 thông qua cột Sephadex LH-20 (MeOH) và tinh chế tiếp với cột ODS, dung môi giải hấp MeOH:H₂O (1:2).

Phân đoạn ethyl acetat (SDE) được sắc ký trên cột silica gel, giải hấp với chloroform – isopropanol (20:1 – 1:1) thu được 6 phân đoạn (SDE1-6). Phân đoạn SDE3 (2.1 g) được tiếp tục tách trên cột silica gel, giải hấp với chloroform–methanol (20:1 – 8:1) thu được 4 phân đoạn (SDE3.1-4). Phân đoạn SDE3.2 được tiếp tục tách silica gel giải hấp với CHCl₃ – isopropanol (5:1), và tiếp tục tinh chế trên cột ODS, sử dụng dung môi giải hấp là methanol – nước (1:2.5) thu được hợp chất 5 (7.2 mg).



Hình 4: Cấu trúc hóa học các chất phân lập từ cam thảo nam

Dựa trên kết quả phân tích phổ NMR, cấu trúc các chất được trình bày trong hình 4. Đây là những chất đã được tìm ra trước đây trong cam thảo nam.

Hoạt tính chống động vật nguyên sinh của chất tinh khiết. Trong số 5 chất hữu cơ đã được phân lập và xác định cấu trúc, khảo sát hoạt tính chống động vật nguyên sinh của 3 hợp chất (chất 1-3), kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả chống động vật nguyên sinh các chất phân lập từ cam thảo nam

Hợp chất	Tỷ lệ sống (K)	
	M±SD	% so với đối chứng
1	2.17±0.05	100
2	1.95±0.08	89.9
3	1.81±0.11*	80.6
3	1.99±0.11	91.7

Đối chứng (methanol 1.5%)	2.17±0.05	100
1	1.95±0.08	89.9
2	1.81±0.11*	80.6
3	1.99±0.11	91.7

**p* < 0.05 so với đối chứng

Ở mẫu đối chứng, số lượng động vật nguyên sinh sau khi ủ với methanol 1.5% trong 24 giờ tăng 2,17 lần. Ở các mẫu thử nghiệm, cả 3 chất đều ức chế tăng trưởng tế bào của *Tetrahymena pyriformis* sau 14 giờ. Trong đó, chất 2 có hoạt tính ức chế cao nhất. Cụ thể, sau 24 giờ ủ với dung dịch nồng độ 1.5%, của các chất tinh khiết, số lượng động vật nguyên sinh sống đối với chất 1 là 89,9%, chất 2 là 80,6% và chất 3 là 91,7% so với đối chứng (dung dịch 1.5% methanol). Kết quả của chất số 2 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (*p*<0.05). Điều này cho thấy, các chất này đã làm chậm quá trình phát triển của động vật nguyên sinh so với đối chứng.

IV. KẾT LUẬN

Cam thảo nam thể hiện tác động kháng viêm in vitro ở cao chiết ethanol 96%. Ở thử nghiệm in vivo, cao chiết bằng ethanol 30% có độ phù chân chuột thấp hơn so với các cao chiết bằng ethanol 96% chứng tỏ tác động kháng viêm tốt hơn. Cam thảo nam có tác động kháng động vật nguyên sinh sau 24 giờ ủ. Từ 3 chất được phân lập trong cam thảo nam, chất số 2 (Ferruginoside C) có tác động ức chế động vật nguyên sinh ở mức độ trung bình. Hoạt tính kháng viêm và kháng động vật nguyên sinh lần đầu tiên được công bố.

V. LỜI CẢM ƠN

Công trình được hỗ trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (mã số QTRU01.15/21-22) và Quỹ Nghiên cứu cơ bản Nga (mã số 21-54-54005).

VI. XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả tuyên bố không có xung đột lợi ích.

VII. ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Tác giả Phạm Thị Nhật Trinh, Hoàng Ngọc Anh, Nguyễn Cửu Khoa, Lê Tiến Dũng tổng hợp tài liệu, ly trích, phân lập chất và xác định cấu trúc. Tác giả Nguyễn Thị Thùy Trang đánh giá hoạt tính kháng viêm. Tác giả Alexey Osipov, Elena Cheremnykh, Yuri Utkin xác định hoạt tính chống động vật nguyên sinh. Tất cả các giả đã đọc và chấp nhận bản thảo cuối cùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chiu, Y. J., Huang, T. H., Chiu, C. S., Lu, T. C., Chen, Y. W., Peng, W. H., Chen, C. Y. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both in vitro and in vivo. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-11 (2012).
2. Huang, G. J., Wang, B. S., Lin, W. C., Huang, S. S., Lee, C. Y., et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Pericarp. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-10 (2012).
3. Mizuno, Y., Jacob, R. F., Preston M. R. Inflammation and the development of atherosclerosis effects of lipid-lowering therapy. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 18(5), 351-358 (2011).
4. Su, S., Wang, T., Duan, J. A., Zhou, W., Hua, Y. O., Tan, Y. P., Yu, L., Oian, D. W. Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*. Journal of Ethnopharmacology 134(2), 251-258 (2011).
5. Rodrigo, L., De Francisco, R., Pérez-Pariente, J. M. Nimesulide-induced severe hemolytic anemia and acute liver failure leading to liver transplantation. Scandinavian Journal of Gastroenterology 37(11), 1341-1343 (2002).
6. Laine, L., Smith, R., Min, K., Chen, C., Dubois, R. W. Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 24(5), 751-767 (2006).
7. Черемных Е.Г., Осипов А.В., Старков В.Г., и др. Сравнительное исследование влияния ядов змей на рост инфузорий *Tetrahymena pyriformis*: идентификация ядов с высокой антипротозойной активностью. // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 503. 197-202 (2022).
8. Sperandio da Silva, G.M., Mediano, M.F., Alvarenga Americano do Brasil, P.E., et al., A clinical adverse drug reaction prediction model for patients with chagas disease treated with benznidazole, Antimicrob. Agents Chemother., 58(11), 6371-6377 (2014).
9. Meyer, A., Holt, H.R., Selby, R., and Guitian, J., Past and ongoing tsetse and animal trypanosomiasis control operations in five African countries: a systematic review, PLoS Negl. Trop. Dis., 10(12), art. ID e0005247 (2016).
10. Đỗ Huy Bích và ctv. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 334-335, (2004).

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM GÃY XƯƠNG ĐỐT SỐNG VÀ MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN ĐẾN LOÃNG XƯƠNG Ở NGƯỜI TRÊN 50 TUỔI TẠI BỆNH VIỆN TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC CẦN THƠ NĂM 2021-2023

Phan Trần Xuân Quyên¹, Nguyễn Thái Hòa^{1,2},
Huỳnh Kim Tiên¹, Phan Lý Hiếu², Dương Thị Mỹ Linh¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Gãy xương đốt sống ở bệnh nhân loãng xương tuy không phải là một bệnh lý cấp tính nhưng hậu quả để lại khiến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân giảm đáng kể. **Mục tiêu:** Xác định tỷ lệ, mô tả đặc điểm của gãy xương đốt sống liên quan loãng xương và một số yếu tố liên quan ở bệnh nhân trên 50 tuổi. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 74 bệnh nhân loãng xương không có tiền sử chấn thương cột sống trước đó trên 50 tuổi nhập viện tại khoa Nội Tổng hợp bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ năm 2021-2023. Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang. **Kết quả:** trong 74 trường hợp loãng xương được nghiên cứu có 66,2% trường hợp gãy xương liên quan loãng xương, tỷ lệ nữ giới cao hơn nam giới, chủ yếu nằm trong độ tuổi 60-80 tuổi. Tuổi

trung bình trong nghiên cứu là 72,18 ± 9,55 tuổi. Gãy xương ở cột sống ngực và cột sống thắt lưng chiếm 55%. Vị trí gãy nhiều nhất là ở L1 33,8% với kiểu gãy lún chiếm đa số là 42,9%. Gãy độ 1 40,7%, độ 2 36,7% và độ 3 22,6%. Những yếu tố liên quan với gãy xương đốt sống là tiền sử gãy xương ($p < 0,001$), tiền sử té ngã ($p < 0,001$), sử dụng corticoid ($p = 0,001$), mật độ xương ($p < 0,001$), tuổi mãn kinh ở nữ giới ($p = 0,011$). **Kết luận:** Gãy xương đốt sống liên quan loãng xương chiếm tỷ lệ cao 66,2% ở bệnh nhân loãng xương. Đa số bệnh nhân gãy đốt sống T11-L1, kiểu gãy lún và lổm chiếm ưu thế hơn và nhiều nhất là gãy độ 1. Bệnh nhân loãng xương có nhiều yếu tố nguy cơ dẫn đến gãy xương như tuổi cao, mật độ xương thấp, tuổi mãn kinh sớm, sử dụng corticoid, tiền sử té ngã, tiền sử gãy xương,...

Từ khóa: loãng xương, gãy xương đốt sống, yếu tố liên quan.

SUMMARY

STUDY ON THE CHARACTERISTICS OF VERTEBRAL FRACTURES AND SOME FACTORS RELATED TO OSTEOPOROSIS IN PEOPLE OVER 50 YEARS OLD AT CAN THO UNIVERSITY OF MEDICINE AND

¹Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

²Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

Chịu trách nhiệm chính: Phan Trần Xuân Quyên

Email: ptxquyen.bv@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 6.11.2023

Ngày phản biện khoa học: 20.12.2023

Ngày duyệt bài: 9.01.2024