

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

VŨ HUỲNH KIM LONG

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA
HỌC SÂM VIỆT NAM
(*Panax vietnamensis*, Araliaceae)
THEO HƯỚNG TÁC ĐỘNG
BẢO VỆ THẬN**

Ngành: Dược học cổ truyền

Mã số: **62720406**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Năm 2023

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học: GS. TS. Nguyễn Minh Đức

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại

vào hồi giờ ngày tháng ... năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP. HCM
- Thư viện Đại học

1. Giới thiệu luận án:

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Hiện nay, các bệnh liên quan đến thận, nhất là suy thận cấp và suy thận mạn tăng nhanh trong cộng đồng gây ảnh hưởng đến sức khỏe, chất lượng cuộc sống của người bệnh, thậm chí dẫn đến tử vong. Các nguyên nhân dẫn đến suy thận rất đa dạng, trong đó có các nguyên nhân do tác dụng phụ của thuốc như thuốc chữa ung thư (cisplatin...), thuốc ức chế miễn dịch (cyclosporin A), các kháng sinh (gentamicine, aminoglycosid...). Vì vậy, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm hạn chế tác hại của các thuốc này trên thận cũng như phục hồi chức năng thận bị giảm do thuốc.

Sâm Việt Nam là một loài sâm quý và đặc hữu của Việt Nam. Thành phần chính của Sâm Việt Nam là các saponin khung dammarane, đặc biệt là các saponin khung ocotillol như majonoside-R2, vina-ginsenoside-R2 chiếm hàm lượng rất cao. Các saponin khung ocotillol này được chứng minh đóng vai trò chính trong các tác dụng điều trị của Sâm Việt Nam như kháng ung thư, giảm stress, bảo vệ gan, kháng viêm... Bên cạnh đó, Sâm Việt Nam còn chứa các thành phần khác như polyacetylene, polysaccharide, vitamin, khoáng chất, trong đó, thành phần polyacetylene đóng vai trò chính trong tác dụng chống oxy hóa và kháng khuẩn. Các nghiên cứu trên Sâm Việt Nam chế biến dưới tác nhân nhiệt cũng đã được tiến hành và cho thấy quá trình hấp làm tăng tác dụng

chống oxy hóa, kháng khối u của Sâm Việt Nam. Tuy nhiên, sự thay đổi thành phần hóa học của Sâm Việt Nam trong quá trình sinh trưởng cũng như chế biến vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Ngoài ra, tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam chưa chế biến và Sâm Việt Nam chế biến ở nhiệt độ và áp suất cao vẫn chưa được nghiên cứu và công bố. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sự thay đổi thành phần hóa học của Sâm Việt Nam trong quá trình sinh trưởng, quá trình hấp ở nhiệt độ và áp suất cao và nghiên cứu thành phần hóa học của Sâm Việt Nam chế biến theo hướng tác dụng bảo vệ thận.

b. Mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với những mục tiêu sau:

- Đánh giá sự phát triển sinh khối và sự tích lũy saponin trong quá trình phát triển của Sâm Việt Nam trồng
- Đánh giá sự thay đổi thành phần hóa học và tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam qua quá trình hấp ở nhiệt độ và áp suất cao.
- Nghiên cứu thành phần hóa học của Sâm Việt Nam định hướng tác dụng bảo vệ thận.
- Đánh giá tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu:

- Thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam 2-7 tuổi trồng tại Trà

Linh, Lâm Đồng

- Thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam 6 tuổi

Phương pháp nghiên cứu

- Định lượng các saponin chính G-Rg₁, G-Rb₁, G-Rd, M-R2 bằng HPLC-ELSD để đánh giá sự tích lũy saponin trong thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam.
- Khảo sát sự thay đổi thành phần hóa học của Sâm Việt Nam qua quá trình hấp bằng HPLC-QToF-MS và thống kê bằng metabolomics
- Khảo sát sự thay đổi tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam ở các thời gian hấp khác nhau và nghiên cứu thành phần hóa học của Sâm Việt Nam chế biến trên mô hình *in vitro* với dòng tế bào thận LLC-PK1 và sử dụng cisplatin làm tác nhân gây độc.
- Đánh giá tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam chế biến trên mô hình *in vivo* sử dụng cyclosporin A làm tác nhân gây độc trên chuột nhắt trắng và đánh giá tác dụng thông qua các thông số BUN, creatinin huyết, MDA, GSH của thận chuột.
- Đánh giá cơ chế tác dụng bảo vệ thận của panaxynol trên mô hình *in vitro* và *in vivo* với tác nhân gây độc thận là cisplatin. Trên mô hình *in vitro*, các thông số đánh giá bao gồm mức độ sống của tế bào, đánh giá quá trình chết theo chu trình bằng dòng chảy tế bào, đánh giá khả năng giảm viêm bằng Western Blot. Trên mô hình *in vivo*,

đánh giá các chỉ số BUN, creatinine huyết, định lượng các protein của quá trình viêm bằng Real-time PCR.

d. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

1. Nghiên cứu đã khảo sát sự phát triển về sinh khối và tích lũy saponin trong Sâm Việt Nam bằng phương pháp HPLC và kết quả cho thấy Sâm Việt Nam sau 5 năm trồng đạt sinh khối và hàm lượng saponin tối đa và có thể thu hoạch.
2. Đề tài đã khảo sát và tối ưu các thông số cho phương pháp *in vitro* sử dụng dòng tế bào LLC-PK1 và tác nhân cisplatin gây độc thận để đánh giá tác dụng bảo vệ thận. Phương pháp đơn giản, rẻ tiền và có thể sử dụng để đánh giá hàng tác dụng bảo vệ thận của hàng loạt mẫu trong thời gian ngắn
3. Chúng tôi đã khảo sát và cho thấy quá trình hấp ở 120 °C làm tăng tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam. Thời gian hấp 12 h cho tác dụng bảo vệ thận cao nhất.
4. Quá trình nghiên cứu đã phân lập được 8 hợp chất có tác dụng bảo vệ thận bao gồm panaxynol, ocotillol genin, 20(*S*)-ginsenoside-Rh₂, 20(*R*)-ginsenoside-Rh₂, 20(*S*)-ginsenoside-Rg₃, 20(*R*)-ginsenoside-Rg₃, ginsenoside-Rk₁ và ginsenoside-Rg₅. Đây là lần đầu tiên ginsenoside-Rh₂ được phân lập từ Sâm Việt Nam chế biến. Đây cũng

là lần đầu tiên một saponin thuộc khung ocotillol là ocotillol genin được công bố có tác dụng bảo vệ thận.

5. Tác dụng bảo vệ thận của các hợp chất saponin đã phân lập được so sánh và kết quả cho thấy saponin khung protopanadiol cho tác dụng mạnh nhất. Đề tài đã phát hiện ginsenoside càng có ít nhóm đường càng cho tác dụng bảo vệ thận mạnh, đồng phân dạng R cho tác dụng mạnh hơn dạng S.
6. Tác dụng bảo vệ thận của panaxynol đã được chứng minh trên mô hình *in vitro* và cho thấy cơ chế của quá trình này thông qua việc giảm quá trình apoptosis cũng như giảm quá trình viêm của tế bào thận gây ra bởi cisplatin.
7. Tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam chế biến cũng đã được chứng minh trên mô hình *in vivo* với tác nhân gây độc là cyclosporin A bên cạnh tác nhân cisplatin.

e. Bố cục của luận án

Luận án gồm 151 trang: Mở đầu 2 trang, tổng quan tài liệu 40 trang, nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu 20 trang, kết quả nghiên cứu 47 trang, bàn luận 30 trang, kết luận và kiến nghị 4 trang

2. Tổng quan tài liệu

a. Sâm Việt Nam

Sâm Việt Nam được phát hiện lần đầu vào năm 1973 tại

vùng núi Ngọc Linh, tỉnh Quảng Nam và được đặt tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. thuộc họ Araliaceae. Thành phần hóa học của Sâm Việt Nam chủ yếu là các saponin thuộc khung protopanaxadiol (PPT), protopanaxatriol (PPD) và đặc biệt là các saponin khung ocotillol (OT) với hàm lượng rất cao, trong đó hợp chất majonoside-R2 có hàm lượng trên >5 %. Sâm Việt Nam được chứng minh sở hữu nhiều tác dụng sinh học ứng dụng trong trị liệu như kháng khuẩn, kháng oxy hóa, bảo vệ gan, chống stress, chống trầm cảm... Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam.

b. Sự thay đổi thành phần hóa học của saponin qua quá trình hấp

Quá trình hấp dưới tác nhân nhiệt độ làm thay đổi đáng kể thành phần hóa học của các loài Sâm thuộc chi *Panax*. Các quá trình biến đổi bao gồm thủy phân nhóm đường và khử nước ở vị trí C-20 của các ginsenoside khung PPT và PPD để thu được các ginsenoside kém phân cực hơn. Các ginsenoside này được chứng minh có tác dụng sinh học mạnh hơn các ginsenoside nguyên thủy, đặc biệt là tác dụng chống oxy hóa, chống khối u và tác dụng bảo vệ thận.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy các saponin khung OT do vị trí C-20 bị đóng vòng nên ít bị biến đổi trong quá trình hấp mà chủ yếu bị thủy phân nhóm đường thông qua

con đường chế biến dưới tác nhân vi sinh vật đường ruột.

c. Bệnh thận và tác dụng bảo vệ thận của dược liệu chi *Panax*

Thận là cơ quan quan trọng của cơ thể đóng vai trò đào thải nước tiểu và cân bằng nội môi. Về mặt giải phẫu, con người có 2 quả thận, thận phải nằm sát khung sườn 12 và hơi thấp hơn thận trái. Đơn vị của thận là các nephron đóng vai trò bài tiết nước tiểu, tái hấp thu thu động và duy trì hằng định nội môi.

Bệnh suy thận là tình trạng tổn thương thận làm suy giảm chức năng bài tiết nước tiểu, cô đặc nước tiểu và bảo tồn các chất điện giải cho cơ thể. Suy thận có hai loại chính là suy thận cấp tính và mạn tính. Suy thận cấp tính là tình trạng suy giảm nhanh chóng và đột ngột khả năng lọc của cầu thận với triệu chứng điển hình là tăng creatinin và BUN. Một trong các nguyên nhân gây suy thận là các thuốc như cisplatin, cyclosporin A,... Suy thận mạn tính là tình trạng tổn thương nhu mô thận từ từ, không hồi phục và nặng dần.

Cisplatin là một thuốc chống ung thư được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh ung thư mô cứng như đầu, mặt, cổ, tinh hoàn... Tuy nhiên, các tác dụng phụ, nhất là độc tính trên thận là nguyên nhân chính giới hạn việc sử dụng thuốc này trong điều trị. Cisplatin gây suy thận cấp thông qua các cơ chế như gây stress oxy hóa trong tế bào biểu mô thận, kích hoạt quá trình viêm, gây chết theo chu trình (apoptosis)

và gây hoại tử (necrosis) tế bào biểu mô thận, dẫn đến suy thận cấp. Các triệu chứng của suy thận cấp do cisplatin bao gồm giảm độ lọc cầu thận, tăng BUN và creatinin huyết. Bên cạnh cisplatin, cyclosporin A là một thuốc ức chế miễn dịch cũng có tác dụng phụ gây độc tính trên thận, dẫn đến hoại tử tế bào thận và suy thận cấp.

Nhân sâm sau quá trình chế biến dưới tác nhân nhiệt làm tăng đáng kể tác dụng bảo vệ thận thông qua thử nghiệm độc tế bào dưới tác nhân cisplatin. Các nghiên cứu về mặt hóa học hướng tác dụng bảo vệ thận cho thấy tác dụng bảo vệ thận chủ yếu đến từ các saponin kém phân cực sinh ra trong quá trình chế biến như ginsenoside-Rk₃, -Rh₄, -Rg₃, -Rk₁, -Rg₅.

3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

- Thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam 2-7 tuổi thu hái tại Trạm Dược liệu Trà Linh, Quảng Nam, được sấy khô ở nhiệt độ dưới 60 °C, tách riêng thân rễ, rễ củ và xay thành bột có kích thước dưới 0,5 mm.
- Thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam 6 tuổi cũng được thu hái tại Trạm Dược liệu Trà Linh, Quảng Nam, được sấy khô ở nhiệt độ dưới 60 °C và xay thành bột có kích thước

dưới 1 mm.

b. Phương pháp nghiên cứu

i. Kiểm nghiệm nguyên liệu

- Kiểm nghiệm vi học: kiểm nghiệm vi phẫu thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam, soi bột rễ Sâm Việt Nam
- Định tính bằng sắc ký lớp mỏng: định tính bằng sắc ký lớp mỏng silica gel với hai hệ dung môi chloroform-methanol-nước (65:35:10, lớp dưới) và *n*-butanol-nước-acid acetic (4:5:1, lớp trên)
- Định lượng bằng phương pháp HPLC-ELSD: thăm dò quy trình chiết xuất, tinh chế qua cột chiết pha rắn (SPE). Quy trình được thẩm định với các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, độ chọn lọc, độ lặp lại, độ đúng. Quy trình được áp dụng để đánh giá sự tích lũy saponin trong thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam 2-7 tuổi và định lượng hàm lượng saponin trong nguyên liệu.

ii. Xây dựng quy trình thử nghiệm tác dụng bảo vệ thận *in vitro*

Mô hình thử nghiệm tác dụng bảo vệ thận *in vitro* sử dụng tế bào biểu mô thận lợn LLC-PK1 với tác nhân gây độc cisplatin. Nghiên cứu tối ưu hóa một số thông số như sau:

- Xác định nồng độ cisplatin gây độc: 20, 25, 30, 40, 50 và 100 μ M. Nồng độ tối ưu khi mức độ sống tế bào còn

khoảng 50 %.

- Xác định mật độ tế bào: 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 tế bào/giếng. Mật độ tối ưu khi mức độ sống tế bào còn khoảng 50 %.
- Xác định nồng độ chứng dương *N*-acetylcystein có thể phục hồi tế bào bị giảm do độc tính của cisplatin
- Thử nghiệm nồng độ dimethylsulfoxide (DMSO) sử dụng. Nồng độ tối ưu khi mức độ sống tế bào không tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có DMSO.

iii. Phân tích sự thay đổi thành phần hóa học và tác dụng sinh học của Sâm Việt Nam qua quá trình chế biến

- *Chế biến và chiết xuất*: Bột Sâm Việt Nam (100 mg) được hấp trong cốc thép với 1 ml nước cất ở 120 °C trong thời gian 0-20 h. Bột được liêu sau khi hấp được chiết với MeOH và cô dưới áp suất giảm thu được các cao Sâm Việt Nam chế biến. Các cao này được hòa trong DMSO thành dung dịch mẹ có nồng độ 100 mg/ml
- *Đánh giá sự thay đổi thành phần hóa học của Sâm Việt Nam qua quá trình chế biến*: Dung dịch mẹ được pha loãng trong methanol với tỷ lệ 1:1000 và phân tích bằng UPLC-QToF-MS ở chế độ ion dương, diện tích đỉnh của các peak được xử lý thống kê đa biến bằng công cụ Metaboanalyst 5.0.
- *Đánh giá sự thay đổi tác dụng bảo vệ thận của Sâm*

Việt Nam qua quá trình chế biến: Cao chiết Sâm Việt Nam được đánh giá tác dụng bảo vệ thận ở các nồng độ 0-200 µg/ml trên mô hình *in vitro* đã xây dựng. Đánh giá điều kiện hấp Sâm Việt Nam cho tác dụng mạnh nhất.

iv. Nghiên cứu thành phần hóa học Sâm Việt Nam hướng tác dụng bảo vệ thận

- Bột Sâm Việt Nam (45 g) được hấp trong điều kiện tối ưu đã xác định, sau đó đông khô và chiết bằng methanol bằng phương pháp siêu âm. Dịch chiết được cô dưới áp suất giảm thu được cao khô Sâm Việt Nam chế biến. Cao khô được đánh giá tác dụng bảo vệ thận và so sánh với cao Sun Ginseng do công ty Ginseng Science (Hàn Quốc) cung cấp.
- Cao khô được phân tách thành các phân đoạn nhỏ hơn bằng phương pháp lắc phân bố, sắc ký cột silica gel. Các phân đoạn này được đánh giá tác dụng bảo vệ thận bằng mô hình *in vitro*. Phân đoạn tiềm năng được phân tách bằng sắc ký lỏng bán điều chế để thu được các hợp chất tinh khiết.
- Các hợp chất sau khi phân lập được xác định bằng các phương pháp phổ nghiệm MS và NMR và được so sánh tác dụng bảo vệ thận trên mô hình *in vitro*.

v. Đánh giá tác dụng bảo vệ thận của panaxynol trên mô hình *in vitro* và *in vivo*

- Cơ chế tác dụng bảo vệ thận của hợp chất panaxynol

theo hướng giảm apoptosis được định lượng bằng phương pháp dòng chảy tế bào. Mức độ giảm phosphoryl hóa của protein JNK, p38 và mức độ biểu hiện của cleaved caspase-3 của panaxynol trước độc tính của cisplatin được đánh giá bằng phương pháp Western Blot.

- Hợp chất panaxynol được đánh giá tác dụng bảo vệ mô hình *in vivo* sử dụng chuột đực C57/BL6 7 tuần tuổi. Chuột được cho uống panaxynol ở liều 10 mg/kg và 50 mg/kg hoặc *N*-acetylcysteine liều 1000 mg/kg trong 5 ngày. Vào ngày 2, chuột được tiêm cisplatin với liều 16 mg/kg bằng đường tiêm phúc mô. Vào ngày 5, chuột được gây mê và lấy máu từ tim để định lượng BUN và creatinin. Thận được cô lập và khảo sát RT-PCR sự biểu hiện của cyclooxygenase-2, monocyte chemoattractant protein-1 và hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1.

vi. Đánh giá tác dụng bảo vệ thận của cao chiết Sâm Việt Nam chế biến trên mô hình *in vivo* với tác nhân gây độc cyclosporin A

- Bột rễ Sâm Việt Nam (30 g) được phân tán với 200 g nước cất và hấp trong autoclave ở 105 °C trong 8 h, sau đó được làm nguội và đông khô thu được bột Sâm Việt Nam chế biến. Bột Sâm Việt Nam chế biến được chiết với methanol 70 % bằng phương pháp siêu âm. Dịch chiết được cô dưới áp suất giảm thu được 15

- g cao khô Sâm Việt Nam chế biến có độ ẩm 4,5 %.
- Chuột nhắt trắng *Swiss albino* đực (7-8 tuần tuổi) được dùng cho nghiên cứu. Chuột được chia thành các 5 lô bao gồm: Lô sinh lý: uống nước cất; Lô chứng bệnh: uống nước cất; Lô chứng dương: uống NAC liều 100 mg/kg; Lô Sâm Việt Nam: uống cao Sâm Việt Nam liều 100 mg/kg; Lô Sâm Việt Nam chế biến: uống cao Sâm Việt Nam chế biến liều 100 mg/kg.
 - Chuột cho uống nước cất hoặc NAC hoặc mẫu thử Sâm Việt Nam 1 lần/ngày trong 14 ngày liên tiếp. Vào các ngày 12, 13, 14, chuột ở lô sinh lý được tiêm phúc mạc bằng nước cất pha tiêm, chuột ở các lô còn lại được tiêm phúc mạc cyclosporin A pha trong nước cất pha tiêm ở liều 100 mg/kg với thể tích tiêm 10 ml/kg. Ngày 15, chuột được gây ngạt bằng đá CO₂, mổ lấy máu tim để định lượng ure và creatinin huyết tương, thận được tách ra, nghiền đồng thể trong KCl 1,15% để định lượng malonyl aldehyde (MDA) và glutathion (GSH).

4. Kết quả

a. Kiểm nghiệm nguyên liệu

- i. *Vi học*: Vi phẫu và các cấu tử Sâm Việt Nam có những đặc điểm như mô tả của Dược điển Việt Nam V.
- ii. *Định tính bằng sắc ký lớp mỏng*: Trên bản mỏng của hai hệ dung môi, sắc ký đồ của mẫu thử có các vết có màu sắc và R_f tương đương với vết của các chuẩn G-

Rb₁, G-Rg₁, M-R2, V-R2.

iii. *Định lượng bằng HPLC-ELSD*: Quy trình định lượng được tối ưu hóa bao gồm quy trình chiết và quy trình tinh chế. Phương pháp định lượng được thẩm định đạt các tiêu chí Tính tương thích hệ thống, Độ chọn lọc, Độ chính xác và Độ đúng. Quy trình định lượng được ứng dụng để đánh giá sự tích lũy saponin và kết quả cho thấy hàm lượng các saponin tăng nhanh trong thời gian 2-4 tuổi, sau đó thay đổi không đáng kể. Quy trình cũng được ứng dụng để định lượng các saponin chính trong nguyên liệu Sâm Việt Nam và hàm lượng các saponin G-Rg₁, M-R2, G-Rb₁ và G-Rd lần lượt là 3,95 %; 5,76 %; 1,51 % và 0,74 %. Tổng hàm lượng các saponin chính là 11,96 %.

b. Đánh giá sự thay đổi thành phần hóa học và tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam qua quá trình chế biến

i. *Thành phần hóa học*: Quá trình hấp làm giảm các ginsenoside phân cực khung protopanaxadiol và protopanaxatriol và xuất hiện các ginsenoside kém phân cực. Các saponin khung ocotillol giảm chậm và bắt đầu xuất hiện ocotillol genin. Phân tích metabolomics cho thấy quá trình hấp từ 2-12 h làm thay đổi đáng kể thành phần hóa học của Sâm Việt Nam. Khi tăng thời gian hấp lên 12-20 h, thành phần hóa học thay đổi không đáng kể. Hàm lượng các ginsenoside kém phân cực tăng cao nhất ở thời điểm 12 h, trong khi

hàm lượng ocotillol genin vẫn tiếp tục tăng đến thời điểm 20 h.

ii. *Tác dụng bảo vệ thận*: Khả năng phục hồi tế bào thận của dịch chiết Sâm Việt Nam chế biến (PVG) ở nồng độ 200 $\mu\text{g/ml}$ tăng dần theo thời gian hấp và đạt cao nhất ở thời điểm 12 h, giúp tăng tỷ lệ sống của tế bào từ 50,9 % lên 86,4 %. Khi tăng thời gian hấp, tỷ lệ tế bào sống không tăng thêm nữa. Vì vậy, điều kiện hấp ở 120 °C trong 12 h được lựa chọn để chế biến Sâm Việt Nam hướng tác dụng bảo vệ thận. Ở cùng nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$, PVG cho khả năng phục hồi tế bào sống khoảng 80 %, cao hơn so với cao chiết Sun Ginseng (66,1 %).

c. Nghiên cứu thành phần hóa học Sâm Việt Nam hướng tác dụng bảo vệ thận

- Bột Sâm Việt Nam (45 g) được hấp ở 120 °C trong 12 h sau đó được chiết và cô thu hồi dung môi thu được 27 g cao khô PVG. Cao được chiết phân bố với các dung môi diethyl ether (Et), ethyl acetate (EA), *n*-butanol bão hòa nước (Bu). Các phân đoạn được đánh giá tác dụng bảo vệ thận và kết quả cho thấy phân đoạn Et và EA cho tác dụng mạnh nhất. Vì vậy hai phân đoạn này được lựa chọn để tiếp tục phân tách.
- Từ phân đoạn Et phân tách bằng cột silica gel thu được 8 phân đoạn Et1-Et8, trong đó phân đoạn Et3 và Et5 cho tác dụng mạnh. Từ phân đoạn Et3 phân tách bằng cột silica gel thu được hợp chất panaxynol có tác dụng bảo vệ thận. Từ

phân đoạn Et5 thu được hợp chất ocotillol genin thể hiện tác dụng bảo vệ thận.

- Phân đoạn EA được phân tách bằng sắc ký cột silica gel thu được 6 phân đoạn EA1-EA6, trong đó phân đoạn EA4 và EA6 thể hiện tác dụng bảo vệ thận. Từ phân đoạn EA4 phân lập bằng sắc ký lỏng điều chế (prep-HPLC) thu được hợp chất 20(S) và 20(R)-ginsenoside-Rh₂ có tác dụng bảo vệ thận. Phân đoạn EA6 được hòa trong methanol và thu được phần không tan là 20(R)-G-Rg₃ có tác dụng bảo vệ thận. Phần dịch được phân tách bằng prep-HPLC thu được các hợp chất 20(S)-G-Rg₃, G-Rk₁ và G-Rg₅ đều thể hiện tác dụng bảo vệ thận.
- Các hợp chất phân lập được xác định cấu trúc bằng phổ MS độ phân giải cao, ¹H và ¹³C-NMR và được so sánh tác dụng bảo vệ thận thông qua nồng độ phục hồi 50 % tỷ lệ tế bào bị mất (RC₅₀). Kết quả cho thấy hợp chất panaxynol có tác dụng mạnh nhất với RC₅₀ = 6,18 ± 3,84 μM. Đồng phân 20(R) của G-Rh₂ và G-Rg₃ có tác dụng bảo vệ thận mạnh với RC₅₀ lần lượt là 6,67 ± 0,42 μM và 8,39 ± 0,3 μM, thấp hơn đồng phân dạng 20(S) 8-10 lần. 20(S)-G-Rg₃, là tiền chất của G-Rk₁, có RC₅₀ = 88,4 ± 54,62 μM, cao hơn 1,4 lần so với G-Rk₁ (RC₅₀ = 62,60 ± 17,3 μM). Tuy nhiên, đồng phân của G-Rk₁ là G-Rg₅ lại có RC₅₀ = 180,83 ± 33,27 μM, cao gấp 3 lần G-Rk₁. OT có RC₅₀ cao nhất (226,19 ± 66,16 μM) nhưng thấp hơn 6,8 lần so với chứng dương *N*-

acetylcystein với $RC_{50} = 1543,6 \pm 74,07 \mu\text{M}$.

d. Đánh giá tác dụng bảo vệ thận *in vitro* và *in vivo* của panaxynol

- Trên mô hình *in vitro*, bằng phương pháp đo dòng chảy tế bào, cisplatin $25 \mu\text{M}$ làm tăng tỷ lệ tế bào bị apoptosis lên $39,96 \pm 1,76 \%$, panaxynol ở nồng độ $2 \mu\text{M}$ và $4 \mu\text{M}$ làm giảm tỷ lệ tế bào bị apoptosis còn lần lượt $26,23 \pm 1,51 \%$ và $15,96 \pm 1,53 \%$. Điều này cho thấy panaxynol có tác dụng bảo vệ thận thông qua con đường giảm apoptosis. Bằng phương pháp Western Blot, kết quả cho thấy panaxynol $2 \mu\text{M}$ và $4 \mu\text{M}$ làm giảm sự biểu hiện của JNK, p38 bị phosphoryl hóa cũng như caspase-3 bị phân cắt.
- Trên mô hình *in vivo*, panaxynol làm tăng đáng kể khối lượng cơ thể, phục hồi chức năng thận thông qua việc làm giảm BUN và creatinin huyết tăng lên do cisplatin. Bên cạnh đó, panaxynol làm giảm phản ứng viêm trên tế bào thận gây ra do cisplatin, mức độ biểu hiện của COX-2 mRNA và MCP-1 mRNA được đánh giá bằng RT-PCR.

e. Đánh giá tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam chế biến trên mô hình *in vivo*

- Đối với tác nhân cyclosporin A gây độc, Kết quả cho thấy cyclosporin A tiêm phúc mạc ở liều 100 mg/kg làm suy giảm đáng kể chức năng thận thông qua việc làm tăng chỉ số BUN $70,2 \%$ từ $8,42 \text{ mM}$ lên $14,33 \text{ mM}$, tăng chỉ số creatinin huyết $93,1 \%$ từ $44,87 \text{ mM}$ lên $86,64 \text{ mM}$. Cao chiết Sâm Việt Nam chưa chế biến liều 100

mg/kg giúp phục hồi chỉ số BUN và creatinin xuống lần lượt 10,76 mM và 62,29 mM tương đương với chứng dương NAC ở cùng liều 100 mg/kg. Cao chiết Sâm Việt Nam chế biến ở liều 100 mg/kg có thể phục hồi chỉ số BUN và creatinin huyết xuống tương đương với lô sinh lý với nồng độ lần lượt là 8,61 mM và 47,92 mM.

- Trên thử nghiệm stress oxy hóa trong mô thận, cyclosporin làm giảm 29,2 % lượng GSH và tăng 33,1 % lượng MDA so với lô sinh lý. Cả chứng dương *N-acetylcystein*, cao chiết Sâm Việt Nam và Sâm Việt Nam chế biến ở liều 100 mg/kg có thể phục hồi lượng GSH bị giảm do cyclosporin A về tương đương với lô sinh lý. Tuy nhiên, đối với chỉ số MDA, chỉ có cao chiết Sâm Việt Nam chế biến có thể làm giảm đáng kể hàm lượng MDA so với lô chứng bệnh.

5. Kết luận và kiến nghị

i. Kết luận

Sau quá trình thực hiện nghiên cứu, đề tài đã thu được những kết quả như sau:

1. Đánh giá sự phát triển sinh khối và tích lũy saponin trong thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam

- Đã nghiên cứu động thái tích lũy saponin trong thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam 2-7 tuổi trồng tại Trà Linh, Quảng Nam bằng phương pháp HPLC-ELSD và cho thấy ở thời điểm 4 năm sau khi trồng, thân rễ và rễ củ đạt hàm lượng saponin cao nhất và thay đổi không đáng kể trong những

năm sau đó. Ở thời điểm 4-7 tuổi, hàm lượng các saponin thay đổi không đáng kể. Trong khi đó, sự phát triển sinh khối của thân rễ và rễ củ Sâm Việt Nam tăng nhanh trong thời gian 2-5 tuổi sau đó tăng không đáng kể.

2. Nghiên cứu thành phần hóa học Sâm Việt Nam định hướng tác dụng bảo vệ thận

- Nghiên cứu đã xác định các thông số của phương pháp thử nghiệm tác dụng bảo vệ thận in vitro trên dòng tế bào LLC-PK1 với tác nhân gây độc là cisplatin bao gồm liều cisplatin 20 μM , mật độ tế bào 1×10^4 tế bào/giếng, nồng độ DMSO trong tất cả các giếng được kiểm soát ở mức 0,2 %, chứng dương được dùng là N-acetylcystein ở liều 1.000 μM .
- Quá trình hấp Sâm Việt Nam ở 120 °C từ 0-20 h làm thay đổi thành phần hóa học và tác dụng sinh học
 - **Về mặt hóa học:** Phân tích bằng LC-QToF-MS cùng với metabolomics cho thấy thời gian hấp từ 0-12 h làm thay đổi đáng kể thành phần hóa học, nhưng khi tăng thời gian hấp lên 20 giờ, sự thay đổi về hóa học trong dịch chiết Sâm Việt Nam không đáng kể. Quá trình hấp làm chuyển hóa các ginsenosid khung protopanaxadiol và protopanaxatriol thành các saponin kém phân cực. Các saponin khung ocotillol như vina-ginsenosid-R2, majonosid-R2 giảm chậm cùng với sự tạo thành ocotillol genin.

- **Về mặt sinh học:** Tác dụng bảo vệ thận của dịch chiết Sâm Việt Nam tăng lên cùng với thời gian hấp và đạt tối đa ở thời điểm 12 h. Khi tăng thời gian hấp lên hơn 12 h, tác dụng bảo vệ thận không tăng lên. Vì vậy 12 h được xem là thời gian hấp tối ưu để dịch chiết Sâm Việt Nam đạt tác dụng bảo vệ thận tối đa
- Đề tài đã phân lập được 8 hợp chất có tác dụng bảo vệ thận từ dịch chiết Sâm Việt Nam chế biến bao gồm: panaxynol, 20(S) và 20(R)-ginsenosid-Rh₂, 20(S) và 20(R)-ginsenosid-Rg₃, ginsenosid-Rk₁, ginsenosid-Rg₅, ocotillol genin
- Đã so sánh tác dụng bảo vệ thận của các hợp chất phân lập được, trong đó hợp chất panaxynol có tác dụng mạnh nhất với RC₅₀ 6,18 ± 3,84 μM. Ocotillol genin tuy là hợp chất có RC₅₀ cao nhất nhưng có thể được xem là đặc trưng của Sâm Việt Nam chế biến có tác dụng bảo vệ thận.

3. Đánh giá tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam chế biến trên mô hình *in vivo*

- Trên mô hình *in vivo* với tác nhân gây độc cyclosporin A, cao Sâm Việt Nam chế biến thể hiện tác dụng bảo vệ thận rõ rệt thông qua việc giảm hàm lượng BUN và creatinin huyết, giảm hàm lượng MDA và phục hồi hàm lượng GSH trong tế bào thận.

4. Đánh giá tác dụng bảo vệ thận của panaxynol trên mô hình *in vitro* và *in vivo*

Trên mô hình *in vitro*, panaxynol làm giảm tỷ lệ tế bào chết theo chu trình (apoptosis) gây ra bởi cisplatin thông qua cơ chế làm giảm biểu hiện của protein caspase-3 bị phân cắt, giảm sự phosphoryl hóa protein JNK, p53. Trên mô hình *in vivo*, panaxynol cải thiện chức năng thận thông qua làm giảm các chỉ số BUN và creatinin huyết ở chuột tăng lên do độc tính của cisplatin trên thận. Về mặt cơ chế, panaxynol làm giảm phản ứng viêm gây ra do cisplatin thông qua làm giảm sự biểu hiện của COX-2 mRNA.

ii. Kiến nghị

- Nghiên cứu tác dụng bảo vệ thận của Sâm Việt Nam được chế biến bằng các phương pháp khác như bằng tác nhân vi ba hoặc lên men bên cạnh sử dụng tác nhân nhiệt.
- Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng và xây dựng tiêu chuẩn cho Sâm Việt Nam chế biến ở áp suất và nhiệt độ cao.
- Tiếp tục nghiên cứu các phân đoạn, nhất là các phân đoạn phân cực để tìm ra các hợp chất khác có tác dụng bảo vệ thận.
- Nghiên cứu các dạng bào chế từ Sâm Việt Nam chế biến và các hợp chất có tác dụng để bào chế thành sản phẩm có tác dụng phòng và điều trị suy thận do độc tính của cisplatin.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Lê Thanh Tuyên, **Vũ Huỳnh Kim Long**, Lê Thị Hồng Vân, Nguyễn Minh Đức, Đỗ Thị Hồng Tươi (2020), “Khảo sát tác động bảo vệ thận của Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae) trên chuột nhắt gây tổn thương thận bằng cyclosporin A”, *Tạp chí Dược học*, số 2 (số 526 năm 60), trang 64-67.

TẠP CHÍ QUỐC TẾ

2. **Kim Long Vu-Huynh**, Huy Truong Nguyen, Thi Hong Van Le, Chi Thanh Ma, Gwang Jin Lee, Sung Won Kwon, Jeong Hill Park, Minh Duc Nguyen (2020), "Accumulation of Saponins in Underground Parts of *Panax vietnamensis* at Different Ages Analyzed by HPLC-UV/ELSD", *Molecules*, **25** (13), 3086.
3. **Kim Long Vu-Huynh**, Thi Hong Van Le, Huy Truong Nguyen, Hyung Min Kim, Ki Sung Kang, Jeong Hill Park, Minh Duc Nguyen (2019), "Increase in Protective Effect of *Panax vietnamensis* by Heat Processing on Cisplatin-Induced Kidney Cell Toxicity", *Molecules*, **24** (24), 4627.
4. Dahae Lee, Jaemin Lee, **Kim Long Vu-Huynh**, Thi Hong Van Le, Thi Hong Tươi Do, Gwi Seo Hwang, Jeong Hill Park, Ki Sung Kang, Minh Duc Nguyen, Noriko Yamabe (2019), "Protective Effect of Panaxynol Isolated from *Panax vietnamensis* against Cisplatin-Induced Renal Damage: *In Vitro* and *In Vivo* Studies", *Biomolecules*, **9** (12), 890.