

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

MAI NGUYỄN NGỌC TRÁC

NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG DƯỢC LÝ
HƯỚNG BẢO VỆ GAN, THẬN CỦA BÍ KỲ NAM
(*Hydnophytum formicarum* Jack., Rubiaceae)

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2020

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:

PGS. TS. Đỗ Thị Hồng Tươi

PGS. TS. Nguyễn Phương Dung

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 Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh
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 Y Dược TP. HCM

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của nghiên cứu

Gan và thận là cửa ngõ tiếp xúc đồng thời là nơi chuyển hóa, bài tiết các chất nên cũng là hai cơ quan chịu sự ảnh hưởng của nhiều tác nhân gây tổn thương. Stress oxy hóa là một trong các cơ chế chính dẫn đến tổn thương gan, thận cấp và mạn tính. Nhiều dược liệu chứa các hợp chất chống oxy hóa đã chứng minh tác dụng bảo vệ gan, thận một cách kinh tế và hiệu quả. Vườn quốc gia Phú Quốc là trung tâm đa dạng sinh học của Việt Nam, nơi có nhiều nguồn gen quý hiếm, trong đó có Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.). Một số nghiên cứu cho thấy loài cây này có các thành phần polyphenol, tác dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn, ức chế tăng trưởng tế bào *in vitro*. Tuy nhiên, đến nay chưa có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước về tác dụng dược lý cũng như tính an toàn của dược liệu này. Với mong muốn nghiên cứu một cách khoa học công dụng dân gian, tác dụng dược lý và tính an toàn, góp phần tạo cơ sở cho việc bảo tồn, phát triển dược liệu, “**Nghiên cứu tác động dược lý hướng bảo vệ gan, thận của Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack., Rubiaceae)**” được thực hiện với các nội dung cụ thể: 1. Phân tích thực vật và định danh loài Bí kỳ nam thu hái tại Vườn quốc gia Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang; 2. Chiết xuất, sàng lọc các cao toàn phần, lựa chọn cao tiềm năng và khảo sát chất lượng. Chiết xuất cao phân đoạn, phân lập chất; 3. Khảo sát các tác dụng dược lý *in vitro* và *in vivo* theo hướng bảo vệ gan, thận; 4. Khảo sát độc tính cấp và độc tính bán trường diễn đường uống của cao Bí kỳ nam.

2. Những đóng góp mới của nghiên cứu

Luận án đã đóng góp những dữ liệu khoa học mới như sau:

- Lần đầu tiên các dữ liệu về mặt vi phẫu thực vật, đặc điểm mã vạch ADN, chỉ tiêu chất lượng của dược liệu Bí kỳ nam thu hái tại Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang được báo cáo giúp định danh, xác định độ tinh khiết và phân biệt giữa Bí kỳ nam với các loài tương tự.
- Luận án đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và tác động trên sự tăng trưởng của các dòng tế bào ung thư phổi người (NCI-H460), tế bào ung thư vú người (MCF-7), tế bào ung thư cổ tử cung người (HeLa), tế bào ung thư cơ vân người (RD), tế bào biểu mô thận heo (LLC-PK1), tế bào biểu mô thận khỉ (Vero) và tế bào ung thư gan người (HepG2) của các cao cồn toàn phần Bí kỳ nam. Chất lượng cao cồn Bí kỳ nam được báo cáo, giúp đóng góp dữ liệu cho chuyên luận về dược liệu này. Lần đầu tiên phân lập catechin và acid protocatechuic từ cao cồn 50% Bí kỳ nam.
- Luận án đã đánh giá tác động dược lý bảo vệ gan, thận của Bí kỳ nam ở mức độ *in vitro* (trên tế bào) và *in vivo* (trên chuột nhắt) dựa trên tiềm năng chống oxy hóa thông qua con đường tín hiệu protein Nrf2 điều hòa stress oxy hóa.
- Luận án đã khảo sát tính an toàn *in vivo* đường uống của cao chiết Bí kỳ nam.

3. Bố cục luận án

Luận án gồm 150 trang. Luận án có 40 bảng, 47 hình, 329 tài liệu tham khảo gồm 14 tài liệu tiếng việt, 315 tài liệu tiếng anh, 67 phụ lục thể hiện các kết quả thực nghiệm.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về Bí kỳ nam: Bí kỳ nam, tên khoa học *Hydnophytum formicarum* Jack., họ Cà phê (Rubiaceae), thuộc nhóm cây Tổ kiến (ant-plants), thân hình thành củ lớn, bên trong có những lỗ hồng do kiến sống cộng sinh. Bộ phận dùng là thân củ. Một số nghiên cứu cho thấy dược liệu có các hợp chất polyphenol và dùng dược lý *in vitro* như chống oxy hóa, kháng khuẩn, ức chế tăng trưởng tế bào...

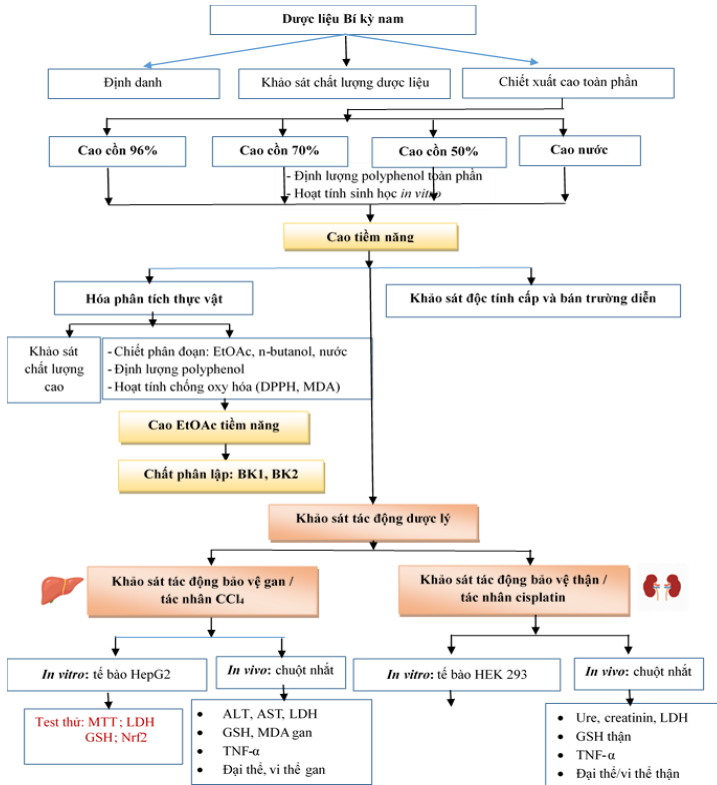
1.2. Tổng quan về stress oxy hóa: Stress oxy hóa là sự mất cân đối giữa các gốc tự do và các chất phòng vệ. Đóng vai trò trung tâm trong điều hòa stress oxy hóa là con đường Keap1/Nrf2/ARE.

1.3. Tổng quan về stress oxy hóa và bệnh gan, thận: Stress oxy hóa làm giảm hệ thống phòng vệ cơ thể, rối loạn nội môi, peroxyd hóa lipid màng tế bào, tổn thương ADN, protein...; là một trong các cơ chế chính của tổn thương gan do chất độc ngoại sinh, do rượu, do thuốc, tổn thương thận cấp và mạn tính.

1.4. Các mô hình nghiên cứu tác động bảo vệ gan, thận: Mô hình *in vitro*: các tế bào gan tươi, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp hay các dòng tế bào bất tử. Mô hình *ex vivo*: các lát cắt, các cơ quan phân lập, lưu giữ trong 24 giờ. Mô hình *in vivo*: động vật sống. **Các mô hình gây tổn thương gan:** tác nhân CCl₄, acetaminophen, rượu, D-galactosamin, thioacetamid. **Các mô hình gây tổn thương thận:** tác nhân cisplatin, vancomycin, gentamycin, acetaminophen.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU



2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Khảo sát dược liệu: *Khảo sát đặc điểm hình thái bên ngoài, đặc điểm giải phẫu, đặc điểm bột dược liệu. Khảo sát mã vạch ADN:* Doyle và Doyle (1990), phương pháp Sanger. So sánh trên GenBank BLAST. **Khảo sát chất lượng dược liệu:** *Khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật. Khảo sát độ ẩm, độ tro (ĐĐVNV). Định tính, định lượng polyphenol (Folin – Ciocalteu).*

2.2.2. Chiết xuất và sàng lọc các cao toàn phần: cao nước, cao cồn 50%, cồn 70%, cồn 96%. *Tính hiệu suất chiết. Định lượng polyphenol toàn phần. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa in vitro (DPPH, MDA). Khảo sát tác động lên sự tăng trưởng tế bào in vitro (test MTT).*

2.2.3. Cao phân đoạn Bí kỳ nam: cao EtOAc, cao *n*-butanol, cao nước. *Định lượng polyphenol toàn phần. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa. Phân lập chất từ cao EtOAc thu BK1, BK2.*

2.2.4. Khảo sát độc tính cấp đường uống của cao cồn 50% Bí kỳ nam: thể tích uống 0,2 ml/10 g (nồng độ tối đa có thể bơm qua kim (500 mg/ml)). Theo dõi trong 72h và 14 ngày.

2.2.5. Khảo sát tác động dược lý hướng bảo vệ gan

Khảo sát tác động bảo vệ gan in vitro: *Đánh giá tác động các mẫu thử lên tế bào gan HepG2 (1×10^5 tế bào/ml, 24h) (MTT). Khảo sát tác động bảo vệ gan của các cao Bí kỳ nam, chất phân lập và đối chứng silymarin 100 μ g/ml, có hoặc không bổ sung CCl_4 2 mM: đánh giá sự tăng trưởng tế bào, hoại tử, stress oxy hóa. Khảo sát yếu tố Nrf2 bằng phương pháp Western blot.*

Khảo sát tác động bảo vệ gan in vivo: Chuột Swiss albino: uống nước cất, silymarin 100 mg/kg, hay mẫu thử trong 14 ngày. Ngày thứ 15, tiêm (i.p.) dầu ô liu hoặc CCl_4 0,2% 10 ml/kg. Ngày thứ 16, xét nghiệm ALT, AST, TNF- α , LDH, MDA, GSH và quan sát mô bệnh học.

2.2.6. Tác động dược lý hướng bảo vệ thận của Bí kỳ nam

Khảo sát tác động bảo vệ thận in vitro: *Xây dựng mô hình in vitro tế bào HEK 293 với cisplatin. Đánh giá mô hình. Khảo*

sát tác động bảo vệ HEK 293: Xử lý tế bào với mẫu thử hoặc đối chứng NAC 1000 mM, có hoặc không bổ sung cisplatin, đánh giá sự tăng trưởng tế bào, tình trạng hoại tử và stress oxy hóa. *Khảo sát yếu tố Nrf2 bằng Western blot*.

Khảo sát tác động bảo vệ thận *in vivo*: Chuột *Swiss albino*: uống nước cất, NAC 100 mg/kg, hay mẫu thử Bí kỳ nam. Ngày 11, tiêm i.p. cisplatin pha trong NaCl 0,9%, liều duy nhất 16 mg/kg (ngoài trừ lô sinh lý). Ngày 14, định lượng ure, creatinin, TNF- α , LDH, GSH, phân tích đại thể, vi thể thận.

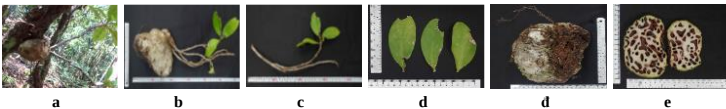
2.2.7. Khảo sát độc tính bán trường diễn đường uống: trong 60 ngày liên tiếp, theo dõi tình trạng chung, cân nặng, chỉ số sinh hóa, huyết học và giải phẫu bệnh.

2.3. Phân tích kết quả và xử lý số liệu thống kê: Kết quả trình bày dạng Mean $\pm$ SEM, thống kê phần mềm SPSS 22.0, phép kiểm Kruskal-wallis, Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. ĐỊNH DANH LOÀI BÍ KỲ NAM

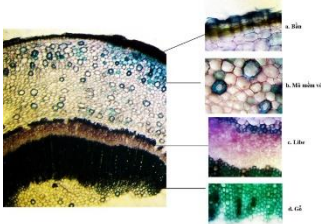
Đặc điểm thực vật: Bí kỳ nam thân phình to thành củ. Bề mặt sần sùi, bên trong mang đầy kiến (**Hình 3.1**).



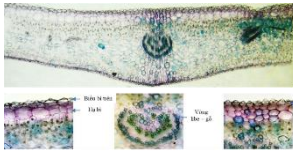
Hình 3.1 (a) Bí kỳ nam trong rừng Phú Quốc; (b) Thân và lá; (c) Thân mang lá; (d) Lá; (đ) Mặt ngoài; (e) Mặt trong

Đặc điểm giải phẫu: Vi phẫu rễ có lớp bần, mô mềm vỏ xen tế bào mô cứng và các khuyết lớn; Vi phẫu thân có lớp bần, tế bào vách dày, mô mềm vỏ, libe 1, libe 2, gỗ 2 và gỗ 1; Vi phẫu

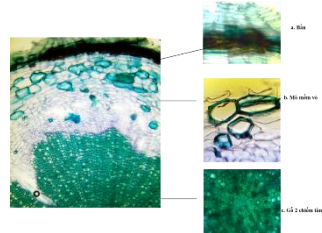
lá: lớp biểu bì có cutin lõi, tế bào hạ bì, 2 lớp tế bào mô giậu chứa diệp lục tố, gân chính có vòng libe - gỗ với các tế bào mô cứng.



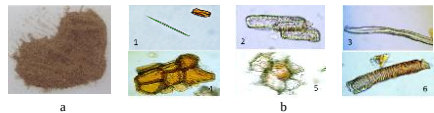
Hình 3.1 Thân Bí kỳ nam



Hình 3.2 Lá Bí kỳ nam



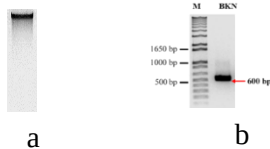
Hình 3.3 Rễ Bí kỳ nam



Hình 3.4 Bột thân củ Bí kỳ nam

Đặc điểm bột dược liệu: màu vàng nâu, không mùi, không vị, có tinh thể calci oxalat hình kim (1), tế bào mô cứng (2), sợi dài (3), mảnh bần (4), tế bào mô mềm (5), mạch mạng (6).

Đặc điểm mã vạch ADN: Trình tự *rbcL* của mẫu thử tương đồng 99% với mẫu đối chứng loài *H. formicarum* Jack. [mã số X81099.1] trên Genbank.



Hình 3.5 (a) Kết quả điện di ADN lá tươi Bí kỳ nam trên gel aragose 1% và (b) sản phẩm PCR với cặp mồi *rbcL*
Bảng 3.1 Trình tự mồi *rbcL* sử dụng trong phản ứng PCR

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Tm (°C)	Tác giả
<i>rbcL</i> .F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	60	[96],
<i>rbcL</i> .R	GTAAATCAAGTCCACCRGC		[182]

3.1.1. Chất lượng dược liệu

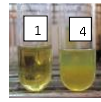
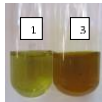
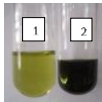
Bảng 3.2 Thành phần hóa học dược liệu Bí kỳ nam

Nhóm	Phương pháp	ether	cồn	nước
Alkaloid	Mayer; Dragendoff	-	-	-
Acid hữu cơ	Thuốc thử Na_2CO_3	+	+	+
Coumarin	Phản ứng phát quang	-	-	-
Flavonoid	Phản ứng cyanidin	+	+	+
Glycosid tim	Raymond, Xanthydrol	-	-	-
Hợp chất khur	Thuốc thử Fehling	+	+	+
Saponin	Phản ứng tạo bọt	+	+	+
Tanin	Thuốc thử gelatin, FeCl_3	-	+	+
Triterpenoid	Salkowski	+	-	-

Bảng 3.3 Độ ẩm và độ tro của dược liệu Bí kỳ nam

	M1	M2	M3	Trung bình
Độ ẩm (%)	13,0	12,9	13,1	13,0 ± 0,1
Độ tro toàn phần (%)	10,1	8,8	9,9	9,6 ± 0,4
Độ tro không tan trong HCl (%)	0,7	0,7	0,6	0,7 ± 0,03

Phản ứng với FeCl_3 2% Phản ứng với NaOH 20% Phản ứng với $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ 1



(1): mẫu thử, (2) mẫu thử bổ sung FeCl_3 2%, (3) mẫu thử bổ sung NaOH 20%, (4) mẫu thử bổ sung $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ 1%

Hình 3.6 Kết quả định tính polyphenol dược liệu Bí kỳ nam

Bảng 3.4 Hàm lượng polyphenol toàn phần Bí kỳ nam

	Polyphenol toàn phần trong 1 g bột (mg pyrogallol/g bột)	Polyphenol trung bình (mg pyrogallol/ g bột)
Lần 1	60,7	58,8 ± 1,7
Lần 2	57,5	
Lần 3	58,3	

3.2. CÁC CAO TOÀN PHẦN BÍ KỲ NAM

Chiết xuất cao toàn phần: Cao nước, cao cồn 50%, cao cồn 70% và cao cồn 96% có hiệu suất chiết: 14,4%, 26,1%, 21,5% và 18,4%; hàm lượng polyphenol toàn phần: 376,8 mg/g cao, 703,2 mg/g cao, 669,5 mg/g cao và 820,0 mg/g cao.



Hình 3.7 Các cao toàn phần từ thân củ Bì kỳ nam
Hoạt tính chống oxy hóa in vitro

Bảng 3.5 Phương trình tuyến tính của các cao Bì kỳ nam (DPPH)

Mẫu thử	Phương trình tuyến tính	R ²	IC ₅₀ (µg/ml)
Cao nước	$y = 1,136x + 9,934$	0,957	35,3
Cao còn 50%	$y = 1,498x + 22,98$	0,949	18,0
Cao còn 70%	$y = 1,961x + 2,376$	0,977	24,3
Cao còn 96%	$y = 2,310x + 6,113$	0,997	19,0
Quercetin	$y = 10,43x - 2,149$	0,997	4,8

Bảng 3.6 Phương trình tuyến tính của các cao Bì kỳ nam (MDA)

Mẫu thử	Phương trình tuyến tính	R ²	IC ₅₀ (µg/ml)
Cao nước	$y = 0,1516x + 9,6584$	0,9758	266,1
Cao còn 50%	$y = 0,4651x - 4,3469$	0,9721	116,8
Cao còn 70%	$y = 0,4360x + 2,8572$	0,9995	108,1
Cao còn 96%	$y = 0,5193x - 0,6565$	0,9728	97,5
Quercetin	$y = 1855,4x - 31,984$	0,9930	13,3

Tác động lên sự tăng trưởng của tế bào

Bảng 3.7 Tác động của Bì kỳ nam đối với các dòng tế bào

Dòng tế bào	Tỷ lệ ức chế (%)				
	Nồng độ (µg/ml)	Cao nước	Cao còn 50%	Cao còn 70%	Cao còn 96%
HeLa	1000	- 23,0	83,0	83,8	84,0
	500	- 13,1	54,5	47,5	59,0
	250	- 17,7	- 18,0	- 18,4	- 2,9
	100	2,3	10,4	- 1,2	3,9
	50	4,2	5,7	1,5	5,1
	PTX 10 µM	52,7			
RD	1000	29,0	42,4	33,5	27,6
	500	24,5	32,1	37,9	32,1
	250	16,7	25,8	30,7	35,3
	100	11,8	12,9	10,1	- 3,1
	50	5,3	4,3	4,0	- 6,4
	PTX 10 µM	47,6			

MCF-7	1000	- 2,0	78,4	70,2	71,4
	500	- 13,4	72,2	67,2	68,4
	250	- 15,1	9,8	12,2	21,6
	100	4,2	2,2	-9,9	- 10,1
	50	4,5	3,0	-8,2	- 12,1
	PTX 10 μM	29,5			
NCI-H460	1000	- 24,8	66,6	61,6	80,4
	500	- 7,1	7,2	8,4	32,2
	250	- 8,8	- 12,1	- 17,2	- 16,3
	100	4,4	7,2	9,6	12,5
	50	3,3	8,2	4,3	13,3
	PTX 10 μM	34,8			
HepG2	1000	- 16,2	- 73,8	- 91,5	- 62,4
	500	- 21,7	- 82,0	- 68,0	- 83,3
	250	- 15,1	- 43,9	- 21,2	- 60,8
	100	- 18,2	- 2,8	- 5,3	- 19,3
	PTX 10 μM	49,1			
	500	13,7	9,5	- 4,9	- 21,0
LLC-PK1	250	13,9	5,0	5,5	- 6,8
	100	4,0	6,0	7,7	- 10,2
	PTX 10 μM	28,5			
	500	- 11,2	6,0	- 9,1	14,9
Vero	250	- 5,1	- 9,3	- 11,6	- 2,5
	100	- 9,7	- 7,6	- 13,8	- 2,8
	PTX 10 μM	30,5			

Bảng 3.8 Giá trị IC₅₀ các cao toàn phần

Tế bào	IC₅₀ (μg/ml)	Cao cồn 50%	Cao cồn 70%	Cao cồn 96%
HeLa		441,9	526,3	376,3
MCF-7		611,6	440,7	397,7
NCI-H460		901,3	893,1	655,5

3.3. CHIẾT XUẤT VÀ CHẤT LƯỢNG CAO TIỀM NĂNG

Cao cồn 50% đạt các tiêu chuẩn chất lượng theo ĐCVN V; không phát hiện các vi khuẩn: *E. coli*, *Salmonella spp.*, *S. aureus* và *P. aeruginosa*; polyphenol toàn phần 678,9 mg pyrogallol/g cao.

**Hình 3.8 Cao cồn 50% từ thân củ Bí kỳ nam**

Bảng 3.9 Độ ẩm và độ tro của cao còn 50% Bí kỳ nam

	M1	M 2	M3	Trung bình
Độ ẩm (%)	7,2	7,4	7,4	7,3 ± 0,1
Độ tro toàn phần (%)	6,3	6,2	6,6	6,4 ± 0,1
Độ tro không tan trong HCl (%)	0,9	0,7	0,8	0,8 ± 0,1

3.4. CAO PHÂN ĐOẠN, HOẠT TÍNH CAO PHÂN ĐOẠN

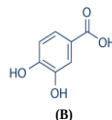
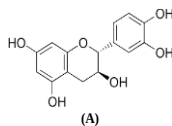
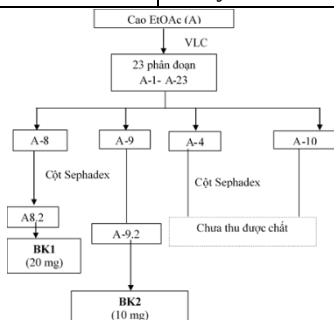
Cao phân đoạn EtOAc, *n*-butanol và nước có hàm lượng polyphenol toàn phần $365,4 \pm 5,9$ mg/g cao, $281,7 \pm 5,7$ mg/g cao và $15,9 \pm 1,8$ mg/g cao. Cao EtOAc có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất. Từ cao EtOAc phân lập được **BK1** (2R,3S)-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-3-ol hay (+)-catechin và **BK2** acid 3,4-dihydroxy benzoic hay acid protocatechuic.

Bảng 3.10 Giá trị IC₅₀ của các cao phân đoạn Bí kỳ nam (DPPH)

Mẫu thử	Phương trình tuyến tính	R ²	IC ₅₀ (µg/ml)
Cao EtOAc	$y = 9,1494x - 9,5078$	0,9998	5,6
Cao n-BuOH	$y = 3,0893x + 0,3133$	0,9938	16,1
Cao nước	$y = 0,1157x + 7,858$	0,9986	366,4

Bảng 3.11 Giá trị IC₅₀ của các cao phân đoạn Bí kỳ nam (MDA)

Mẫu thử	Phương trình tuyến tính	R ²	IC ₅₀ (µg/ml)
Cao EtOAc	$y = 2,3893x + 4,9393$	0,9957	18,9
Cao n-BuOH	$y = 1,3975x - 17,219$	0,9794	48,1
Cao nước	$y = 0,0182x - 5,9997$	0,9978	3076,8

**Hình 3.9 Cấu trúc của hợp chất BK1 (A) và BK2 (B)****Sơ đồ 1.1. Quy trình phân lập chất từ cao phân đoạn**

3.5. ĐỘC TÍNH CẤP ĐƯỜNG UỐNG CỦA CAO TIỀM NĂNG

Cao còn 50% không gây độc tính cấp đường uống ở liều 10 g cao khô/kg (tương đương với 32,3 g dược liệu khô/kg).

3.6. TÁC ĐỘNG BẢO VỆ GAN CỦA BÍ KỲ NAM

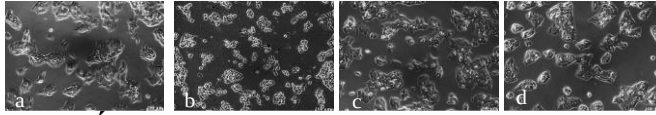
Tác động bảo vệ gan *in vitro*: Sau 24 giờ, các mẫu thử Bí kỳ nam không gây độc tế bào HepG2. Các mẫu thử và chất đối chiếu silymarin phòng ngừa sự ức chế tăng trưởng, tăng sinh gốc tự do và hoại tử tế bào do CCl_4 2 mM gây ra. Tế bào xử lý với CCl_4 có hình dạng co tròn và hoại tử.

Bảng 3.12 Tác động lên sự tăng trưởng của tế bào gan HepG2

Mẫu thử / Nồng độ (n=6)	$\text{OD}_{570\text{nm}} \pm \text{SEM}$	Phần trăm thay đổi so với mẫu sinh lý (%)
Mẫu chứng sinh lý	0,602 $\pm$ 0,047	
Cao còn 50% 100 $\mu\text{g/ml}$	0,888 $\pm$ 0,053*	+ 47,44
Cao còn 50% 200 $\mu\text{g/ml}$	0,907 $\pm$ 0,091*	+ 50,68
Cao EtOAc 100 $\mu\text{g/ml}$	0,648 $\pm$ 0,057	+ 7,62
Cao EtOAc 200 $\mu\text{g/ml}$	0,779 $\pm$ 0,085	+ 29,31
Catechin 10 μM	0,709 $\pm$ 0,063	+ 17,75
Catechin 20 μM	0,702 $\pm$ 0,052	+ 16,62
Acid protocatechuic 10 μM	0,669 $\pm$ 0,045	+ 11,13
Acid protocatechuic 20 μM	0,683 $\pm$ 0,030	+ 13,39

Bảng 3.13 Phòng ngừa ức chế tăng trưởng tế bào gan HepG2

Mẫu (n=6)	$\text{OD}_{570\text{nm}}$ trung bình $\pm \text{SEM}$	Phần trăm phòng ngừa so với mẫu chứng bệnh (%)
Sinh lý	0,602 $\pm$ 0,047	
Chứng bệnh	0,427 $\pm$ 0,046*	
Silymarin 100 $\mu\text{g/ml}$	0,655 $\pm$ 0,018##	130,43
Cao còn 50% 100 $\mu\text{g/ml}$	0,759 $\pm$ 0,053##	189,55
Cao còn 50% 200 $\mu\text{g/ml}$	0,786 $\pm$ 0,062###	204,77
Cao EtOAc 100 $\mu\text{g/ml}$	0,817 $\pm$ 0,043###@	222,81
Cao EtOAc 200 $\mu\text{g/ml}$	0,852 $\pm$ 0,033###*@@	242,98
Catechin 10 μM	0,695 $\pm$ 0,057#	152,96
Catechin 20 μM	0,738 $\pm$ 0,046##	177,73
Acid protocatechuic 10 μM	0,699 $\pm$ 0,012##	155,50
Acid protocatechuic 20 μM	0,721 $\pm$ 0,015##@	167,75



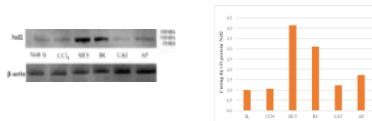
Hình 3.10 Tế bào HepG2 sau 24 giờ xử lý (a) với DMSO 0,1%; (b) CCl_4 2 mM; (c) Silymarin; (d) Cao cồn 50% 100 µg/ml

Bảng 3.14 Phòng ngừa tình trạng hoại tử tế bào gan HepG2

Mẫu (n=6)	OD _{490nm} trung bình $\pm$ SEM	Phần trăm phòng ngừa so với mẫu chứng bệnh (%)
Sinh lý		0,309 $\pm$ 0,011
Chứng bệnh		0,397 $\pm$ 0,004**
Silymarin 100 µg/ml (SM)	0,284 $\pm$ 0,004##	128,41
Cao cồn 50% 100 µg/ml	0,235 $\pm$ 0,003###@@	183,74
Cao cồn 50% 200 µg/ml	0,233 $\pm$ 0,001###@@	186,06
Cao EtOAc 100 µg/ml	0,262 $\pm$ 0,006###@	152,66
Cao EtOAc 200 µg/ml	0,251 $\pm$ 0,007###@	166,18
Catechin 10 µM	0,237 $\pm$ 0,003###@	186,46
Catechin 20 µM	0,234 $\pm$ 0,004###@	183,40
Acid protocatechuic 10 µM	0,244 $\pm$ 0,002###@	173,07
Acid protocatechuic 20 µM	0,241 $\pm$ 0,008###@	177,30

** $p < 0,01$ so với mẫu sinh lý; ## $p < 0,01$: so với chứng bệnh; @ $p < 0,05$; @@ $p < 0,01$ so với chứng dương silymarin

Silymarin, cao cồn 50% Bí kỳ nam làm tăng biểu hiện protein Nrf2, gợi ý tác động chống oxy hóa, bảo vệ gan liên quan đến cơ chế kích hoạt yếu tố chống oxy hóa Nrf2.

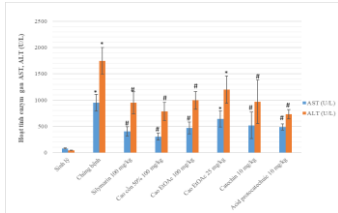


Hình 3.11 Kích hoạt protein Nrf2 ở tế bào HepG2

Tác động bảo vệ gan *in vivo*: Các mẫu thử không làm thay đổi trọng lượng của chuột. Silymarin 100 mg/kg và mẫu thử Bí kỳ nam (trừ EtOAc 25 mg/kg) làm giảm ALT, AST, giảm LDH, TNF- α , tăng GSH và giảm MDA so với chứng bệnh CCl_4 .

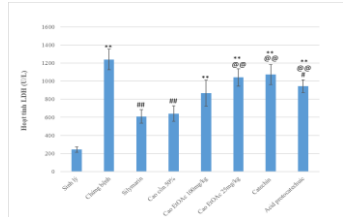
Bảng 3.15 Trọng lượng chuột trong tác động bảo vệ gan

Lô (n = 8)	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 7	Ngày 9	Ngày 11	Ngày 13
Sinh lý	21,11 ± 0,41	23,95 ± 0,51	26,45 ± 0,72	28,89 ± 1,01	29,73 ± 0,97	32,08 ± 0,92	34,85 ± 0,93
Chứng bệnh	19,61 ± 0,42	22,74 ± 0,63	24,81 ± 0,59	28,14 ± 0,72	29,91 ± 0,61	29,49 ± 0,45	33,59 ± 0,74
Silymarin 100 mg/kg	18,53 ± 0,33	21,19 ± 0,35	23,49 ± 0,37	25,86 ± 0,42	28,69 ± 0,34	32,03 ± 0,42	33,17 ± 0,56
Cao còn 50% 100 mg/kg	19,24 ± 0,40	22,75 ± 0,58	25,85 ± 0,5	29,53 ± 0,55	30,21 ± 0,55	32,51 ± 0,45	35,39 ± 0,71
Cao EtOAc 100 mg/kg	20,04 ± 0,34	22,95 ± 0,45	25,40 ± 0,33	27,90 ± 0,49	30,30 ± 0,49	31,78 ± 0,42	33,36 ± 0,22
Cao EtOAc 25 mg/kg	19,51 ± 0,55	22,31 ± 0,43	25,63 ± 0,39	28,80 ± 0,60	30,63 ± 0,50	32,78 ± 0,54	34,23 ± 0,45
Catechin 10 mg/kg	19,76 ± 0,38	22,79 ± 0,30	25,26 ± 0,56	28,23 ± 0,55	30,24 ± 0,42	32,53 ± 0,36	33,38 ± 0,36
Acid protocate- chuic 10 mg/kg	19,26 ± 0,28	21,61 ± 0,47	24,58 ± 0,33	28,91 ± 0,49	31,19 ± 0,50	31,56 ± 1,02	34,14 ± 0,52



*: $p < 0,05$ so với mẫu sinh lý; #: $p < 0,05$; so với chứng bệnh

Hình 3.12 Hoạt tính AST, ALT trong tác động bảo vệ gan



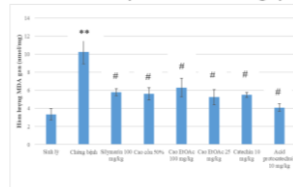
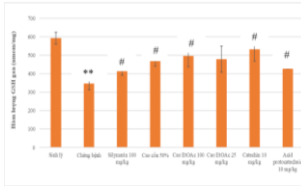
0,01 so với sinh lý; #: $p < 0,05$; ### $p < 0,01$; so với chứng bệnh

Hình 3.13 Hoạt tính LDH trong tác động bảo vệ gan

Bảng 3.16 Hoạt tính TNF- α trong tác động bảo vệ gan

Lô (n=6)	TNF- α (pg/ml)
Sinh lý	197,5 ± 44,3
Chứng bệnh	1040,1 ± 50,2**
Silymarin 100 mg/kg	436,9 ± 68,6##
Cao còn 50% 100 mg/kg	392,1 ± 44,9##
Cao EtOAc 100 mg/kg	544,8 ± 84,3##
Catechin 10 mg/kg	410,3 ± 56,5##
Acid protocatechuic 10 mg/kg	488,0 ± 82,7##

** : $p < 0,01$ so với mẫu sinh lý; ##: $p < 0,01$; so với chứng bệnh

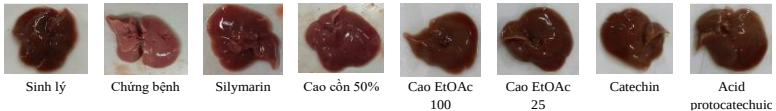


** : $p < 0,01$ so với mẫu sinh lý; #: $p < 0,05$: so với chứng bệnh

Hình 3.14 Hàm lượng GSH trong tác động bảo vệ gan

Hình 3.15 Hàm lượng MDA trong tác động bảo vệ gan

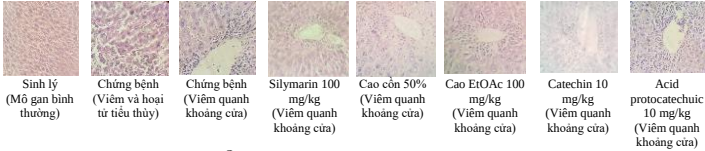
Tác động trên đại thể và vi thể gan: Gan chuột CCl_4 nhạt màu, có nhiều chấm xuất huyết, chấm trắng đường kính 0,5 – 1 mm, hoại tử nhu mô gan, viêm quanh khoảng cửa, viêm nhu mô gan. Mẫu thử và silymarin làm giảm tổn thương gan so với CCl_4 .



Hình 3.16 Đại thể gan chuột trong tác động bảo vệ gan

Bảng 3.17 Vi thể gan chuột trong tác động bảo vệ gan

Lô (n=6)	Kết quả phân tích vi thể
Sinh lý (SL)	6/6 mẫu: mô gan bình thường.
Chứng bệnh	1/6 mẫu: viêm quanh khoảng cửa. 5/6 mẫu: viêm quanh khoảng cửa, viêm nhu mô gan, hoại tử tiêu thụ.
Silymarin 100 mg/kg	4/6 mẫu: bình thường 2/6 mẫu: viêm quanh khoảng cửa.
Cao còn 50% 100 mg/kg	4/6 mẫu: bình thường; 2/6 mẫu: viêm quanh khoảng cửa.
Cao EtOAc 100 mg/kg	4/6 mẫu: bình thường; 2/6 mẫu viêm quanh khoảng cửa.
Catechin 10 mg/kg	4/6 mẫu: bình thường; 2/6 mẫu: viêm quanh khoảng cửa.
Acid protocatechuic 10 mg/kg	5/6 mẫu: bình thường; 1/6 mẫu: viêm quanh khoảng cửa.

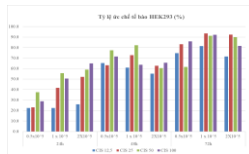


Hình 3.17 Vi thể mô gan trong tác động bảo vệ gan

3.7. TÁC ĐỘNG BẢO VỆ THẬN CỦA BÍ KỲ NAM

Xây dựng mô hình mô phỏng tổn thương tế bào thận: Mô

hình với mật độ nuôi cấy tế bào HEK 293 là $2,0 \times 10^5$ tế bào/ml, thời gian xử lý 24h với cisplatin nồng độ 25 μM . Cisplatin làm giảm tỷ lệ sống tế bào, giảm GSH và tăng LDH so với mẫu sinh lý, các tế bào co rút, giảm số lượng.



Hình 3.18 Tỷ lệ ức chế tế bào HEK 293

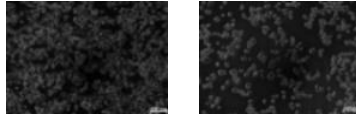
Bảng 3.18 Tác động của cisplatin lên tế bào HEK 293

OD _{570nm} ± SEM (n=4)			
MẬT ĐỘ/ CIS	0,5 x 10 ⁵ tế bào /ml	10 ⁵ tế bào/ml	2 x 10 ⁵ tế bào /ml
Xử lý tế bào trong 24 giờ			
0 μM	0,195 ± 0,024	0,419 ± 0,026	0,833 ± 0,038
12,5 μM	0,151 ± 0,015	0,325 ± 0,021*	0,617 ± 0,054
25 μM	0,150 ± 0,016	0,245 ± 0,012*	0,399 ± 0,057*
50 μM	0,122 ± 0,005	0,186 ± 0,039*	0,342 ± 0,038*
100 μM	0,139 ± 0,012	0,208 ± 0,015*	0,292 ± 0,033*
Xử lý tế bào trong 48 giờ			
0 μM	0,513 ± 0,044	1,426 ± 0,028	2,256 ± 0,146
12,5 μM	0,178 ± 0,015*	0,557 ± 0,039*	1,014 ± 0,048*
25 μM	0,189 ± 0,008*	0,388 ± 0,063*	0,842 ± 0,033*
50 μM	0,116 ± 0,009*	0,253 ± 0,027*	0,892 ± 0,089*
100 μM	0,146 ± 0,007*	0,519 ± 0,227*	0,778 ± 0,072*
Xử lý tế bào trong 72 giờ			
0 μM	0,580 ± 0,095	1,616 ± 0,073	1,850 ± 0,196
12,5 μM	0,147 ± 0,015*	0,299 ± 0,043*	0,528 ± 0,084*
25 μM	0,097 ± 0,011*	0,104 ± 0,019*	0,143 ± 0,027*
50 μM	0,223 ± 0,156	0,143 ± 0,025*	0,185 ± 0,027*
100 μM	0,081 ± 0,004*	0,126 ± 0,013*	0,341 ± 0,078*

Bảng 3.19 Tác động của cisplatin lên tế bào HEK 293

Mẫu (n=6)	OD _{570nm} trung bình $\pm$ SEM (n=6)	GSH trung bình (nM/mg protein) $\pm$ SEM	LDH trung bình (mU/ml) $\pm$ SEM
Sinh lý	1,636 $\pm$ 0,089	77,2 $\pm$ 4,6	0,712 $\pm$ 0,012
Chứng bệnh	0,997 $\pm$ 0,054**	23,6 $\pm$ 4,5**	0,848 $\pm$ 0,008**
NAC 1000 μ M	1,213 $\pm$ 0,092 [#]	62,5 $\pm$ 9,9 ^{##}	0,631 $\pm$ 0,006 ^{##}

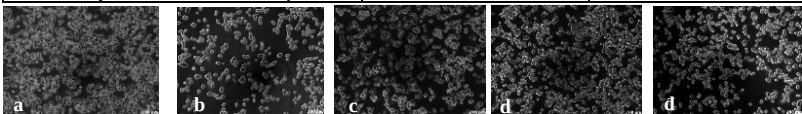
**₂: p < 0,01 so với mẫu sinh lý; [#]: p < 0,05, ^{##}: p < 0,01 so với mẫu chứng bệnh

**Hình 3.19 Tế bào HEK 293 sinh lý và xử lý với cisplatin**

Tác động bảo vệ thận *in vitro*: Sau 24 giờ, các mẫu thử Bí kỳ nam không gây độc tế bào HEK 293. NAC hay Bí kỳ nam phòng ngừa sự ức chế tăng trưởng, hoại tử tế bào và tăng sinh gốc tự do do cisplatin gây ra.

Bảng 3.20 Tác động lên sự tăng trưởng của tế bào HEK 293

Mẫu thử / Nồng độ (n=6)	Sự tăng trưởng của tế bào	
	OD _{570nm} $\pm$ SEM	% thay đổi so với mẫu sinh lý
Mẫu chứng sinh lý	1,638 $\pm$ 0,098	
Cao cồn 50% 100 μ g/ml	1,989 $\pm$ 0,025*	+21,4
Cao cồn 50% 200 μ g/ml	2,027 $\pm$ 0,038*	+23,8
Cao EtOAc 100 μ g/ml	2,112 $\pm$ 0,260	+29,0
Cao EtOAc 200 μ g/ml	2,139 $\pm$ 0,142*	+30,6
Catechin 10 μ M	1,836 $\pm$ 0,100	+12,1
Catechin 20 μ M	1,866 $\pm$ 0,052	+13,9
Acid protocatechuic 10 μ M	1,995 $\pm$ 0,029*	+21,8
Acid protocatechuic 20 μ M	1,875 $\pm$ 0,112	+14,5

**Hình 3.20 Tế bào HEK 293 sau 24 giờ xử lý với (a) DMSO 0,1%; (b) cis 25 μ M; (c) NAC 1000 μ M; (d) cao cồn 50%; (đ) EtOAc**

Bảng 3.21 Phòng ngừa ức chế tăng trưởng tế bào HEK 293

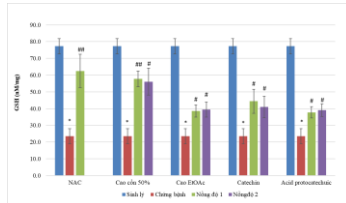
Mẫu (n=6)	OD _{570nm} trung bình $\pm$ SEM	Phòng ngừa so với chứng bệnh (%)
Sinh lý	1,638 $\pm$ 0,098	
Chứng bệnh (Cis 25 μ M)	0,997 $\pm$ 0,047**	
NAC 1000 μ M	1,213 $\pm$ 0,092**	33,7
Cao cồn 50% 100 μ g/ml	1,423 $\pm$ 0,018##	66,4
Cao cồn 50% 200 μ g/ml	1,391 $\pm$ 0,040***	61,4
Cao EtOAc 100 μ g/ml	1,390 $\pm$ 0,087#	61,2
Cao EtOAc 200 μ g/ml	1,358 $\pm$ 0,055***	56,2
Catechin 10 μ M	1,348 $\pm$ 0,039***	54,8
Catechin 20 μ M	1,329 $\pm$ 0,062***	51,8
Acid protocatechuic 10 μ M	1,288 $\pm$ 0,026***	45,4
Acid protocatechuic 20 μ M	1,226 $\pm$ 0,070**	35,8

*: p < 0,01 so với mẫu sinh lý; #: p < 0,05; ###: p < 0,01: so với mẫu chứng bệnh

Bảng 3.22 Phòng ngừa hoại tử tế bào thận HEK 293

Mẫu (n=6)	OD _{490nm} trung bình $\pm$ SEM
Sinh lý	0,712 $\pm$ 0,012
Cisplatin 25 μ M	0,848 $\pm$ 0,008**
NAC 1000 μ M	0,631 $\pm$ 0,006##
Cao cồn 50% 100 μ g/ml	0,749 $\pm$ 0,015##
Cao cồn 50% 200 μ g/ml	0,755 $\pm$ 0,012##
Cao EtOAc 100 μ g/ml	0,765 $\pm$ 0,024#
Cao EtOAc 200 μ g/ml	0,754 $\pm$ 0,021##
Catechin 10 μ M	0,821 $\pm$ 0,009#
Catechin 20 μ M	0,803 $\pm$ 0,011#
Acid protocatechuic 10 μ M	0,722 $\pm$ 0,011##
Acid protocatechuic 20 μ M	0,733 $\pm$ 0,016##

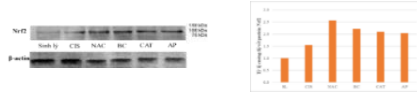
*: p < 0,01 so với sinh lý; #: p < 0,05; ###: p < 0,01: so với chứng bệnh



*: p < 0,05 so với mẫu sinh lý; #: p < 0,05; ###: p < 0,01: so với chứng bệnh

Hình 3.21 Tác động phòng ngừa tăng sinh gốc tự do của tế bào thận HEK 293 do cisplatin gây ra

NAC 1000 μM , cao còn Bí kỳ nam 100 $\mu\text{g/ml}$, catechin, acid protocatechuic làm tăng protein điều hòa chống oxy hóa Nrf2.



Hình 3.22 Tác động kích hoạt protein Nrf2 ở tế bào HEK 293

Tác động bảo vệ thận *in vivo*: Các mẫu thử không làm thay đổi trọng lượng chuột so với sinh lý. NAC và các mẫu thử làm giảm nồng độ ure và creatinin huyết, làm giảm hoạt tính LDH, giảm TNF- α , tăng GSH so với cisplatin 16 mg/kg (i.p.).

Bảng 3.23 Trọng lượng cơ thể chuột trong tác động bảo vệ thận

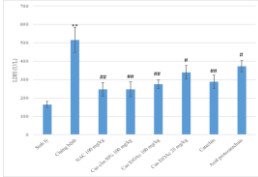
Lô (n = 10)	N1	N3	N5	N7	N9	N11	N12	N13
Sinh lý	27,08 ± 0,64	30,27 ± 0,82	31,30 ± 1,10	32,25 ± 1,47	32,68 ± 1,72	33,13 ± 1,81	34,08 ± 1,99	34,84 ± 2,15
Chứng bệnh	28,43 ± 0,63	32,53 ± 0,59	33,53 ± 0,48	34,32 ± 0,50	34,97 ± 0,58	35,87 ± 0,82	34,71 ± 0,80	32,09 ± 0,78
NAC 100 mg/kg	23,26 ± 0,80	30,01 ± 0,88	31,20 ± 0,95	32,64 ± 1,02	33,15 ± 1,12	34,29 ± 1,14	33,00 ± 1,25	30,89 ± 1,45
Cao còn 50% 100 mg/kg	26,18 ± 0,73	31,78 ± 0,85	32,74 ± 0,81	34,05 ± 0,83	34,78 ± 0,95	35,94 ± 1,02	34,65 ± 1,03	32,11 ± 0,93
Cao EtOAc 100 mg/kg	25,94 ± 0,74	31,34 ± 0,70	31,49 ± 0,91	31,96 ± 1,51	32,1 ± 1,50	32,89 ± 1,55	31,96 ± 1,71	30,02 ± 1,50
Cao EtOAc 25 mg/kg	26,58 ± 0,82	29,93 ± 0,78	31,84 ± 0,85	32,36 ± 0,86	32,45 ± 0,90	33,24 ± 0,91	31,80 ± 0,91	29,47 ± 0,90
Catechin 10 mg/kg	26,72 ± 0,70	32,71 ± 1,01	33,30 ± 0,93	34,61 ± 1,11	35,01 ± 1,17	36,16 ± 1,21	34,37 ± 1,10	31,95 ± 1,08
A. protocatechuic 10 mg/kg	25,54 ± 0,73	31,17 ± 0,64	31,53 ± 0,94	32,36 ± 1,16	33,11 ± 1,01	34,54 ± 0,83	33,38 ± 0,88	30,77 ± 0,97

Bảng 3.24 Ure và creatinin huyết trong tác động bảo vệ thận

Lô (n = 10)	Ure (mg/dL)	Creatinin ($\mu\text{mol/L}$)
Sinh lý	60,32 ± 3,70	0,10 ± 0,01
Chứng bệnh	260,47 ± 49,48***	0,80 ± 0,26***
NAC 100 mg/kg	62,31 ± 4,93###	0,14 ± 0,01###
Cao còn 50% 100 mg/kg	82,01 ± 10,05##	0,17 ± 0,02##

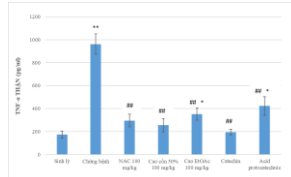
Cao EtOAc 100 mg/kg	71,20 ± 8,16 ^{###}	0,16 ± 0,02 ^{###}
Cao EtOAc 25 mg/kg	89,78 ± 9,16 ^{##@}	0,19 ± 0,02 ^{##}
Catechin 10 mg/kg	96,13 ± 15,02 ^{##}	0,20 ± 0,03 ^{##@}
Acid protocatechuic 10 mg/kg	85,04 ± 10,12 ^{##}	0,20 ± 0,03 ^{##}

^{***}: p < 0,001 sv lô sinh lý; ^{###}: p < 0,001; ^{##}: p < 0,01 sv lô chứng bệnh;
[@]: p < 0,05 so với chứng dương NAC



^{**}: p < 0,01; sv sinh lý; [#]: p < 0,05;
^{##}: p < 0,01; sv chứng bệnh

Hình 3.23 Nồng độ LDH trong tác động bảo vệ thận



^{*}: p < 0,05; ^{**}: p < 0,01; sv sinh lý;
^{##}: p < 0,01; sv chứng bệnh

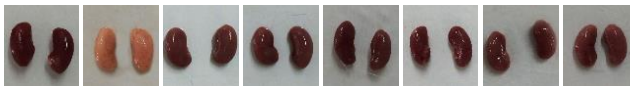
Hình 3.24 Hoạt tính TNF-α trong tác động bảo vệ thận

Bảng 3.25 Hàm lượng GSH thận trong tác động bảo vệ thận

Lô (n = 10)	GSH (nmol/mg)
Sinh lý (SL)	121,5 ± 5,5
Chứng bệnh (CB)	77,4 ± 10,5 ^{**}
NAC 100 mg/kg (NAC100)	122,2 ± 10,4 ^{##}
Cao cón 50% 100 mg/kg (BC100)	143,3 ± 6,4 ^{###*}
Cao EtOAc 100 mg/kg (BE100)	103,4 ± 10,7
Cao EtOAc 25 mg/kg (BE25)	124,9 ± 9,6 ^{##}
Catechin 10 mg/kg (CAT)	126,0 ± 10,0 ^{##}
Acid protocatechuic 10 mg/kg (AP)	104,6 ± 10,6

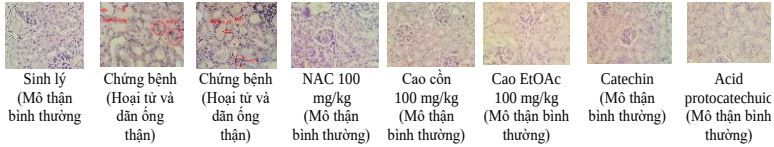
^{**}: p < 0,01 sv sinh lý; [#]: p < 0,05 và ^{##}: p < 0,01 sv chứng bệnh

Thận chuột sinh lý, chất đối chứng hay mẫu thử có màu đỏ thẫm bình thường, không tổn thương và không xung huyết. Ở lô chứng bệnh, thận nhạt màu, có những chấm xung huyết, hoại tử ống thận gần – xa, rải rác có các ống thận giãn rộng.



Sinh lý Chứng bệnh NAC Cao cón EtOAc 100 EtOAc 25 CAT AP

Hình 3.25 Đại thể thận chuột trong tác động bảo vệ thận



Hình 3.26 Vi thể thận chuột trong tác động bảo vệ thận
Bảng 3.26 Vi thể thận chuột trong tác động bảo vệ thận

Lô (n=6)	Kết quả phân tích vi thể
Sinh lý	6/6 mẫu: mô thận bình thường
Chứng bệnh	6/6 mẫu: hoại tử ống thận gần – xa, có các ống thận dẫn rộng.
NAC 100 mg/kg	6/6 mẫu: mô thận bình thường
Cao cồn 50% 100 mg/kg	6/6 mẫu: mô thận bình thường
Cao EtOAc 100 mg/kg	6/6 mẫu: mô thận bình thường
Catechin 10 mg/kg	6/6 mẫu: mô thận bình thường
Acid protocatechuic 10 mg/kg	6/6 mẫu: mô thận bình thường

3.8. ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN ĐƯỜNG UỐNG:

Trong 60 ngày, cao cồn 50% Bí kỳ nam liều 100 mg/kg không gây bất thường, không làm thay đổi trọng lượng và không có chuột nào chết, không gây sự khác biệt về chỉ số hồng cầu, tiểu cầu, bạch cầu, chức năng gan, thận chuột so với lô sinh lý.

Bảng 3.27 Trọng lượng chuột trong độc tính bán trường diễn

Lô (n = 6 - 8)	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6	Tuần 7	Tuần 8	Ngày 60
Sinh lý	31.99 ± 0.38	34.66 ± 0.49	36.39 ± 1.01	37.76 ± 1.04	38.37 ± 1.02	39.37 ± 1.28	39.83 ± 1.37	41.23 ± 1.23	41.80 ± 1.27
Cao cồn 50% 100 mg/kg	31.87 ± 0.42	33.79 ± 0.85	36.06 ± 0.96	37.32 ± 0.99	38.06 ± 1.05	39.16 ± 1.44	39.61 ± 1.33	40.47 ± 1.26	41.66 ± 1.23
Cao cồn 50% 200 mg/kg	31.62 ± 0.29	32.92 ± 0.83	34.65 ± 1.10	36.40 ± 0.80	37.01 ± 0.88	37.97 ± 1.26	39.19 ± 1.3	40.36 ± 1.06	41.16 ± 1.01

Bảng 3.28 Chỉ số hồng cầu trong độc tính bán trường diễn

Chỉ số	30 ngày			60 ngày		
	Sinh lý	Cao 100 mg/kg	Cao 200 mg/kg	Sinh lý	Cao 100 mg/kg	Cao 200 mg/kg
Số lượng hồng cầu (RBC) ($10^{12}/L$)	8,48 ± 0,18	8,28 ± 0,56	9,32 ± 0,15*	9,68 ± 0,31	9,17 ± 0,20	9,40 ± 0,35
Số lượng huyết sắc tố (Hb) (g/dL)	14,36 ± 0,34	13,50 ± 0,87	15,35 ± 0,27*	16,25 ± 0,42	15,14 ± 0,34	14,60 ± 0,44*

Khối hồng cầu (HCT) (%)	47,39 ± 1,27	46,34 ± 0,98	49,20 ± 0,55	46,70 ± 1,11	44,33 ± 1,07	43,50 ± 1,33
Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) (fL)	55,94 ± 1,35	52,65 ± 1,82	52,86 ± 0,41	48,23 ± 0,55	47,43 ± 0,72	48,28 ± 0,54
Lượng hemoglobin trung bình hồng cầu (MCH) (pg)	16,95 ± 0,18	16,31 ± 0,44	16,49 ± 0,21	16,77 ± 0,14	16,38 ± 0,25	16,23 ± 0,3
Nồng độ Hemoglobin trung bình hồng cầu (MCHC) (g/dL)	30,4 ± 0,73	31,06 ± 0,39	31,20 ± 0,33	34,77 ± 0,14	34,36 ± 0,25	33,59 ± 0,36*
Độ phân bố hồng cầu (RDW) (%)	14,86 ± 0,21	14,6 ± 0,30	14,99 ± 0,37	12,48 ± 0,23	12,19 ± 0,22	12,98 ± 0,23

Bảng 3.29 Chỉ số bạch cầu trong độc tính bán trường diễn

Chỉ số	30 ngày			60 ngày		
	Sinh lý	Cao 100 mg/kg	Cao 200 mg/kg	Sinh lý	Cao 100 mg/kg	Cao 200 mg/kg
Số lượng bạch cầu (WBC) ($10^9/L$)	7,70 ± 0,84	7,96 ± 0,74	9,55 ± 0,58	10,88 ± 0,68	9,94 ± 0,80	11,28 ± 1,46
Tỷ lệ bạch cầu trung tính (%)	4,88 ± 0,95	5,19 ± 2,13	5,60 ± 1,66	13,97 ± 4,11	18,71 ± 4,88	13,06 ± 2,65
Tỷ lệ bạch cầu Lympho (%)	77,03 ± 2,16	76,84 ± 3,01	80,74 ± 2,36	75,00 ± 3,91	65,01 ± 3,29	79,06 ± 2,50
Tỷ lệ bạch cầu Mono (%)	18,10 ± 2,73	17,98 ± 1,72	13,66 ± 1,04	11,02 ± 3,87	16,25 ± 3,41	7,88 ± 1,95
Số lượng bạch cầu trung tính	0,43 ± 0,10	0,39 ± 0,14	0,50 ± 0,16	1,48 ± 0,38	1,54 ± 0,41	1,52 ± 0,44
Số lượng bạch cầu Lympho ($10^9/L$)	6,05 ± 0,74	6,31 ± 0,71	7,71 ± 0,55	8,13 ± 0,58	7,40 ± 0,55	8,99 ± 1,27
Số lượng bạch cầu Mono ($10^9/L$)	1,31 ± 0,17	1,43 ± 0,15	1,34 ± 0,14	1,28 ± 0,49	1,51 ± 0,19	0,74 ± 0,13

Bảng 3.30 Chỉ số tiểu cầu trong độc tính bán trường diễn

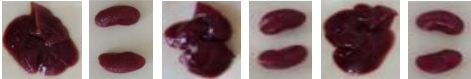
Chỉ số	30 ngày			60 ngày		
	Sinh lý	Cao 100 mg/kg	Cao 200 mg/kg	Sinh lý	Cao 100 mg/kg	Cao 200 mg/kg
Số lượng tiểu cầu (PLT) ($10^9/L$)	965,75 ± 88,41	926,88 ± 56,80	888,00 ± 76,6	604,83 ± 29,43	611,63 ± 41,34	660,63 ± 28,13
Thể tích trung bình tiểu cầu (MPV) (fL)	2,90 ± 0,33	2,63 ± 0,18	2,40 ± 0,38	2,33 ± 0,17	2,14 ± 0,14	2,50 ± 0,15
Khối tiểu cầu (PCT) (%)	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01

Độ phân bố tiểu cầu (PDW) (fL)	17,38 ± 0,23	16,94 ± 0,11	17,11 ± 0,33	17,40 ± 0,21	17,30 ± 0,20	17,78 ± 0,23
-----------------------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Bảng 3.31 Chức năng gan và thận trong độc tính bán trường diễn

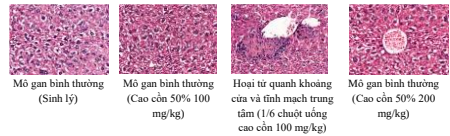
Chỉ số	30 ngày			60 ngày		
	Sinh lý	Cao 100 mg/kg	Cao 200 mg/kg	Sinh lý	Cao 100 mg/kg	Cao 200 mg/kg
AST (U/L)	104,63 ± 11,47	86,29 ± 4,38	109,28 ± 10,88	69,93 ± 9,29	65,40 ± 4,29	226,66 ± 56,08*
ALT (U/L)	46,28 ± 7,43	46,09 ± 4,54	49,58 ± 7,51	59,07 ± 7,26	53,75 ± 3,11	230,94 ± 72,59*
Ure (mmol/L)	4,84 ± 0,45	4,94 ± 0,4	4,70 ± 0,32	5,77 ± 0,5	5,13 ± 0,43	6,20 ± 0,75
Creatinin (μmol/L)	35,04 ± 1,05	37,14 ± 1,64	36,40 ± 0,84	41,87 ± 0,88	43,45 ± 1,08	39,9 ± 1,03

*: p < 0,05 so với lô sinh lý



Sinh lý Cao BKN 100 mg/kg Cao BKN 200 mg/kg

Hình 3.27 Gan và thận chuột trong độc tính bán trường diễn

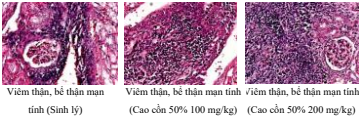


Mô gan bình thường (Sinh lý) Mô gan bình thường (Cao còn 50% 100 mg/kg) Hoại tử quanh khoảng cửa và tĩnh mạch trung tâm (1/6 chuột uống cao còn 100 mg/kg) Mô gan bình thường (Cao còn 50% 200 mg/kg)

Hình 3.28 Vi thể gan trong độc tính bán trường diễn

Bảng 3.32 Vi thể gan, thận trong độc tính bán trường diễn

Lô (n=6)	Vi thể gan	Vi thể thận
Sinh lý	6/6 mẫu: mô gan bình thường	5/6 mẫu: viêm thận, bể thận mạn tính ; 1/6 mẫu: bình thường
Cao còn 50% 100 mg/kg	5/6 mẫu: mô gan bình thường 1/6 mẫu: viêm gan tối thiểu	6/6 mẫu: viêm thận, bể thận mạn tính
Cao còn 50% 200 mg/kg	6/6 mẫu: mô gan bình thường	5/6 mẫu: viêm thận, bể thận mạn tính; 1/6 mẫu: mô thận bình thường



Viêm thận, bể thận mạn tính (Sinh lý) Viêm thận, bể thận mạn tính (Cao còn 50% 100 mg/kg) Viêm thận, bể thận mạn tính (Cao còn 50% 200 mg/kg)

Hình 3.29 Vi thể thận trong độc tính bán trường diễn

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu đã mô tả đặc điểm thực vật, vi phẫu, mã vạch ADN, định danh loài Bí kỳ nam thu hái tại Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang; đã khảo sát thành phần hóa thực vật, các tiêu chuẩn độ ẩm, độ tro toàn phần, độ tro không tan trong acid, định tính và định lượng polyphenol của dược liệu.

Nghiên cứu đã chiết xuất các cao toàn phần, khảo sát các tác động dược lý *in vitro* chống oxy hóa, tác động sự tăng trưởng các dòng tế bào Hela, MCF-7, NCI-H460, RD, HepG2, LLC-PK1, Vero; đã khảo sát chất lượng và độ vô khuẩn cao cồn 50% Bí kỳ nam; đã phân lập 2 chất catechin và acid protocatechuic.

Nghiên cứu đã đánh giá tác động dược lý phòng ngừa oxy hóa, bảo vệ gan *in vitro*, *in vivo* của cao Bí kỳ nam với tác nhân CCl₄; tác động bảo vệ thận *in vitro*, *in vivo* với cisplatin. Lần đầu tiên, các kết quả về tác động dược lý bảo vệ gan, thận *in vitro*, *in vivo* được báo cáo. Nghiên cứu đã khảo sát độc tính cấp và độc tính bán trường diễn đường uống của cao cồn 50% Bí kỳ nam.

KIẾN NGHỊ

Các kết quả đạt được là cơ sở khoa học để thực hiện các hướng nghiên cứu tiếp theo: Nghiên cứu tác động bảo vệ gan, thận của Bí kỳ nam với các tác nhân khác như acetaminophen, rượu, gentamycin, vancomycin...; Nghiên cứu tác động trên các mô hình bệnh lý khác do stress oxy hóa, có liên quan đến con đường hoạt hóa Nrf2/ARE như thoái hóa thần kinh, tim mạch, đái tháo đường; Nghiên cứu ứng dụng dược liệu Bí kỳ nam trong hỗ trợ điều trị các bệnh mãn tính.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN

1. Mai Nguyen Ngoc Trac, Pham Thu Ha, Do Thi Hong Tui (2020), “Subacute oral toxicity evaluation of the ethanolic extract of *Hydnophytum formicarum* Jack. tubers in Phu Quoc, Viet Nam”, *MedPharmRes*, vol 4 (1), 1-6.
2. Mai Nguyen Ngoc Trac, Truong Thi Dep, Tran Thi Van Anh, Do Thi Hong Tui (2019), “Botanical, genetic characteristics and preliminary screening of the phytochemical constituents of *Hydnophytum formicarum* Jack. in Phu Quoc forest, Vietnam”, *MedPharmRes*, vol 3(2), 8-14.
3. Mai Nguyễn Ngọc Trác, Nguyễn Hoàng Quân, Huỳnh Thị Kim Loan, Đỗ Thị Hồng Tươi (2017), “Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và tác động trên sự tăng trưởng tế bào *in vitro* của Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.)”, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, 21(6), 175-180.
4. Mai Nguyễn Ngọc Trác, Phạm Thu Hà, Nguyễn Phương Dung, Đỗ Thị Hồng Tươi (2017), “Khảo sát tác động bảo vệ gan của cao cồn 50% từ Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.) trên mô hình chuột nhắt trắng gây tổn thương gan bằng cyclophosphamide”, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, 21(6), 131-137.
5. Mai Nguyễn Ngọc Trác, Nguyễn Ngọc Anh Thơ, Nguyễn Phương Dung, Đỗ Thị Hồng Tươi (2017), “Khảo sát tác động chống oxy hóa, bảo vệ gan *in vivo* của cao cồn 50% từ thân củ Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack. tubers) trên mô hình gây tổn thương gan chuột bằng CCl₄”, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, 21(2), 16-22.
6. Mai Nguyễn Ngọc Trác, Đỗ Thị Hồng Tươi (2016), “Khảo sát độc tính cấp và tác động kháng viêm, giảm đau *in vivo* của cao cồn 50% từ thân củ Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack. rhizomes)”, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh* (2016), 20(2), 204-209.
7. Mai Nguyễn Ngọc Trác, Nguyễn Ngọc Anh Thơ, Trần Thị Vân Anh, Đỗ Thị Hồng Tươi (2015), “Sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* và khả năng độc tế bào ung thư gan HepG2 của cao chiết Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.)”, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, 19 (3), 38-44.

