

CAO CHIẾT LÁ CHÈ ĐẮNG CẢI THIỆN RỐI LOẠN CHỨC NĂNG KHứU GIÁC GÂY BỞI $ZnSO_4$ TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG

Phạm Thị Nguyệt Hằng^{1,2,*}, Bùi Tuấn Đạt², Trần Thị Hồng Vân¹,
Nguyễn Quang Linh³, Lê Thị Xoan¹, William R. Folk⁴

¹Viện Dược liệu; ²Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội;

³Bệnh viện Trung ương Quân đội 108; ⁴Đại học Missouri, Hoa Kỳ

*Email: nguyethangpt@nimm.org.vn

(Nhận bài ngày 19 tháng 6 năm 2023)

Tóm tắt

Chứng mất khứu giác thường là dấu hiệu sớm nhất của việc lây nhiễm SARS-CoV-2 và có thể tồn tại lâu sau khi virus bị loại bỏ, đồng thời có liên quan đến chứng trầm cảm và các khiếm khuyết về nhận thức thần kinh khác. Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá tác dụng cải thiện tình trạng mất chức năng khứu giác của cao chiết *Ilex kudingcha* C.J. Tseng (IKE) trên mô hình chuột bị tổn thương biểu mô khứu giác cấp tính và chứng mất khứu giác gây bởi $ZnSO_4$. Chuột nhắt trắng giống đực, chủng *Swiss albino* 6 tuần tuổi được nhỏ mũi liều duy nhất bằng dung dịch $ZnSO_4$ 170 mM (20 μ l/ lỗ mũi x 2 lỗ mũi) hoặc nhỏ nước muối sinh lý 0,9% (chứng sinh lý). 1 giờ sau khi nhỏ mũi, chuột được uống IKE (liều 270 và 540 mg/kg) liên tục trong 14 ngày và các thử nghiệm hành vi được thực hiện vào ngày 7 và 14 để đánh giá tác dụng cải thiện chức năng khứu giác và chống trầm cảm. Vào ngày thứ 15, chuột được gây mê bằng cloral hydrat (50 mg/kg) và mô mũi được cắt để đánh giá giải phẫu mô học bằng Hematoxylin và Eosin. Kết quả cho thấy IKE có tác dụng phục hồi đáng kể lớp biểu mô khứu giác và giảm chứng mất khứu giác (được xác định bởi thời gian tìm thấy một tờ giấy thơm bơ đậu phộng) và giảm trầm cảm (được xác định bởi thời gian bất động). Những kết quả này cho thấy lá chè đắng có thể là đối tượng tiềm năng để điều trị tổn thương chức năng khứu giác gây bởi các tác nhân hóa học và nhiễm khuẩn.

Từ khóa: Lá chè đắng, $ZnSO_4$ gây mất chức năng khứu giác, Thử nghiệm tìm kiếm mùi bơ lạc, Thử nghiệm treo đuôi chuột, biểu mô khứu giác.

Summary

Ilex kudingcha C.J. Tseng Extract Mitigates $ZnSO_4$ -Induced Olfactory Dysfunction in Mice

Anosmia is often the earliest sign of infection by SARS-CoV-2 and may persist long after the virus is eliminated, and is associated with depression and other neurocognitive deficits. This study was conducted to evaluate the ameliorating effect of anosmia by *Ilex kudingcha* C.J. Tseng extract (IKE) in a mouse model of acute olfactory epithelium damage and anosmia caused by $ZnSO_4$ instillation. Male *Swiss albino* mice 5-6 weeks old were given a single dose of either 20 μ l $ZnSO_4$ (170 mM) or normal saline solution (control) in each nostril. One hour later, mice were provided with IKE at the doses of 270 and 540 mg/kg continuously for 15 days, and tests were performed on days 7 and 14 to evaluate olfactory function and depression, respectively. On the 15th day, mice were anesthetized with chloral hydrate (50 mg/kg) and nasal tissues were sectioned and stained by Hematoxylin and Eosin to measure damage to the olfactory epithelium. The results show that IKE significantly restores the olfactory epithelial layer and reduces anosmia (determined by the time to find a peanut butter-scented paper) and reduces depression (determined by the immobilization time). These results suggest that IKE is a promising treatment for the chemosensory effects of SARS-CoV2 infection.

Keywords: *Ilex kudingcha* extract, $ZnSO_4$ -induced olfactory dysfunction, Peanut butter finding test, Tail suspension test, Olfactory epithelial layer.

1. Đặt vấn đề

Tổn thương khứu giác là tình trạng khứu giác bị tổn thương bởi nhiều nguyên nhân khác nhau gây ra (hậu nhiễm trùng đường hô hấp trên, bệnh mũi/ xoang, chấn thương đầu, tiếp xúc với hoá chất, thuốc (độc tính của thuốc), bẩm sinh), từ đó dẫn đến rối loạn, suy giảm chức năng khứu giác và thậm chí có thể gây mất khứu giác [1]. Tổn thương khứu giác có thể gây ra nguy cơ chấn thương (đặc biệt là những chấn thương liên quan đến hóa chất nguy hiểm, thức ăn ôi thiu), suy dinh dưỡng và làm suy giảm chất lượng cuộc sống của người bệnh [2]. Đặc biệt trong những năm gần đây, đại dịch SARS-CoV-2 bùng phát mạnh mẽ gây ra những tổn hại nặng nề trên toàn thế giới, và tình trạng rối loạn chức năng khứu giác một trong những biểu hiện thường gặp của dịch bệnh này với tỷ lệ gặp phải lên đến 47,85% [3].

Chè đắng có tên khoa học là *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, thuộc chi *Ilex*, họ Trâm bùi (Aquifoliaceae), phân bố chủ yếu vùng núi đá vôi thuộc tỉnh Cao Bằng và một số địa phương khác như Hoà Bình, Ninh Bình [4],[5]. Chè đắng được sử dụng trong Y học cổ truyền phương đông từ nghìn năm với khả năng tiêu đờm, đào thải độc tố, tăng cường trí nhớ, kích thích tiêu hoá,... [6]. Các nghiên cứu hiện đại trong và ngoài nước đã chứng minh được nhiều tác dụng của lá chè đắng, đặc biệt trong một nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã chứng minh cao chiết lá chè đắng có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ ngắn hạn và dài hạn trên mô hình chuột bị cắt bỏ thùy khứu giác hai bên (OBX) [7]. Bên cạnh đó, mô hình OBX cũng là một mô hình gây trầm cảm [8]. Do vậy, để tiếp tục nghiên cứu thêm những tác dụng của lá chè đắng trên mô hình tổn thương khứu giác, chúng tôi thực hiện đề tài này với mục tiêu là

đánh giá tác dụng cải thiện tổn thương khứu giác của lá chè đắng trên mô hình chuột bị tổn thương khứu giác gây bởi ZnSO_4 cấp tính.

2. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lá chè đắng (ký hiệu mẫu là IK) thu hái tại Cao Bằng (tháng 6/2022), được giám định và lưu mẫu tại Trung tâm Tài nguyên dược liệu, Viện Dược liệu. Dược liệu thu hái được sấy khô ở 50°C , đóng gói bảo quản nơi khô ráo để phục vụ nghiên cứu.

Mẫu cao chiết sử dụng trong nghiên cứu là cao chuẩn hóa được chiết theo quy trình của tiêu chuẩn First: “Hợp tác nghiên cứu sàng lọc dược liệu có tác dụng ngăn ngừa/hỗ trợ điều trị bệnh suy giảm trí nhớ và cơ chế tác dụng”, do Ngân hàng thế giới tài trợ, được nhóm nghiên cứu thuộc khoa Hoá Thực vật, Viện Dược liệu điều chế. Quy trình chiết xuất được mô tả tóm tắt như sau: Lá chè đắng được sấy khô, xay thô, ngâm với cồn 80% theo tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/10 trong 48 giờ. Lọc rút lấy dịch trong. Bã dược liệu được ngâm tiếp với cồn thêm 2 lần, mỗi lần 24 giờ. Dịch chiết của 3 lần được cô đến cao lỏng 1:2; sau đó thêm nước theo tỷ lệ 4/1, để qua đêm, lọc lấy phần tủa, sấy chân không ở nhiệt độ 60°C cho đến đạt hàm ẩm $< 5\%$. Cao chuẩn hóa lá chè đắng (IKE) có hàm lượng kudinosid E và kudinosid D lần lượt là khoảng 4,3% và 3,0%.

2.2. Động vật thí nghiệm

Động vật được sử dụng trong nghiên cứu là chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino*, giống đực, trọng lượng trung bình 18-20 g (khoảng 5 tuần tuổi), được cung cấp bởi Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương. Chuột được chăm sóc và nuôi trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ duy trì $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ăn uống đầy đủ, chu kỳ sáng tối là 12/12 h (chu kỳ sáng từ 7:00 - 19:00). Chuột được nuôi ổn định 1 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Chuột sau khi được nuôi ổn định 1 tuần được chia thành 4 lô ($n = 10 - 11$ chuột/lô thí nghiệm):

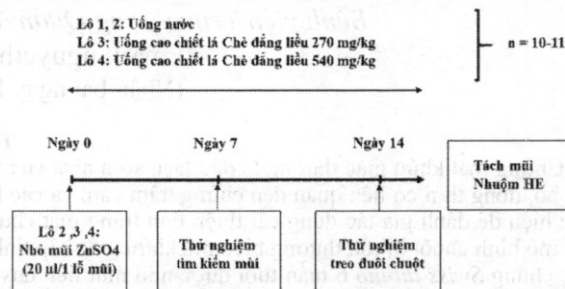
Lô chứng sinh lý: chuột được nhỏ mũi liều duy nhất bằng nước muối sinh lý 0,9% ($20 \mu\text{l}$ /lỗ mũi x 2 lỗ mũi) và uống nước trong suốt quá trình thí nghiệm.

Lô chứng bệnh lý: chuột được nhỏ mũi liều duy nhất bằng dung dịch ZnSO_4 170 mM ($20 \mu\text{l}$ /lỗ mũi x 2 lỗ mũi) và uống nước trong suốt quá trình thí nghiệm.

Lô điều trị cao chiết lá chè đắng liều 270 mg/kg và 540 mg/kg: chuột được nhỏ mũi liều

duy nhất bằng dung dịch ZnSO_4 170 mM ($20 \mu\text{l}$ /lỗ mũi x 2 lỗ mũi). 1 giờ sau khi nhỏ mũi bằng ZnSO_4 , chuột được uống cao lá chè đắng với 2 mức liều 270 mg/kg và 540 mg/kg liên tục trong 2 tuần.

Đánh giá tác dụng của lá chè đắng trên chuột bị tổn thương biểu mô khứu giác cấp tính bằng ZnSO_4 được mô tả ở Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.3.1. Đánh giá tác dụng cải thiện chức năng khứu giác của lá chè đắng trên chuột bị tổn thương khứu giác gây bởi ZnSO_4 bằng thử nghiệm tìm kiếm mùi bọt lạc:

Thử nghiệm tìm kiếm mùi được sử dụng để đánh giá tác dụng cải thiện tổn thương biểu mô khứu giác chuột gây bởi ZnSO_4 liều 170 mM. Thử nghiệm này được tiến hành theo mô tả của Ahn và cs. (2018) [9]. Chuột được nhện đói qua đêm, nước uống tự do trước khi tiến hành thử nghiệm. Thử nghiệm được tiến hành trong một hộp nhựa kích thước ($20 \times 40 \times 15 \text{ cm}$) với chất độn mới trong chuồng có độ sâu 5 cm. Một tấm giấy lọc kích thước ($4 \times 4 \text{ cm}$) được tẩm bọt lạc (nồng độ $1,2 \text{ g/mL}$) được đặt ở dưới chất độn (cách 1 cm) ở chuồng chuột, vị trí đặt ở trung tâm trong các cung phần tư của mỗi bài kiểm tra để ngăn chặn tất cả các yếu tố ngẫu nhiên chuột có thể tìm thấy thức ăn. Thời gian tiềm ẩn xác định được vị trí tấm giấy được tính trung bình của 3 lần thử nghiệm. Mỗi thử nghiệm tiến hành trong 180 giây và phân tích bằng phần mềm ANY-MAZE, Stoeling, Hoa Kỳ. Thử nghiệm này được tiến hành một lần duy nhất vào ngày thứ 7 sau khi chuột được điều trị bằng mẫu nghiên cứu.

2.3.2. Thử nghiệm treo đuôi chuột:

Thử nghiệm treo đuôi chuột được tiến hành theo mô tả của Ahn và cs. [9],[10]. Chuột được treo cao hơn sàn 30 cm bằng băng dính đặt trên khoảng 1 cm từ đầu của đuôi với thời gian treo là 10 phút. Bài kiểm tra được ghi bởi một máy ảnh kỹ thuật số và phân tích bằng phần mềm ANY-MAZE, Stoeling, Hoa Kỳ. Tổng thời gian bắt động được định nghĩa là không có chuyển động của cả bốn chân và đầu sẽ được ghi lại. Chuột

trầm cảm sẽ có thời gian bất động nhiều hơn đáng kể so với với chuột sinh lý. Thử nghiệm này sẽ được tiến hành vào ngày thứ 14 sau khi chuột được uống mẫu nghiên cứu.

2.3.3. Giải phẫu mô học mũi chuột bằng phương pháp nhuộm Hematoxylin & Eosin:

Phương pháp nhuộm Hematoxylin & Eosin (H&E) được sử dụng để quan sát đặc điểm hình thái và đo độ dày lớp biểu mô khứu giác chuột. Chuột được gây mê bằng cloral hydrat liều 50 mg/kg, đường tiêm phúc mạc. Sau khi chuột gây mê hoàn toàn, tiến hành rửa giải não chuột, tách đầu chuột (bao gồm cả não và mũi). Mẫu sau khi tách sẽ được hủy xương bằng cách ngâm trong dung dịch 0,5M EDTA pH 8,0 trong 1 tuần/ 4°C. Sau khi hủy xương, mẫu tiếp tục được cố định trong paraformaldehyd 4%/ ít nhất trong 2 giờ. Tiến hành đúc mẫu bằng paraffin, cắt và nhuộm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm H&E. Sau quá trình nhuộm H&E, tiêu bản sẽ được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược IX73 (Olympus, Đức) và chụp ảnh tại vật kính có độ khuếch đại x4 và x10 để phân tích kết quả. Đo độ dày lớp biểu mô khứu giác (OE) bằng phần mềm đi kèm của kính hiển vi soi ngược IX73. Độ lặp lại của thí nghiệm: đánh giá 5 chuột/ 1 lô thí nghiệm, mỗi chuột cắt 3 tiêu bản để nhuộm H&E và đo trung bình 5 vị trí/ 1 tiêu bản mũi [9],[10].

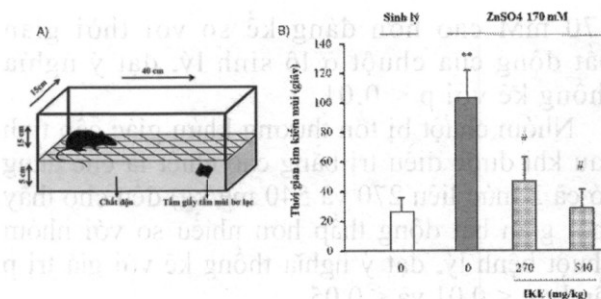
2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 23. Với các mẫu phân bố chuẩn, dữ liệu được biểu diễn dưới dạng Mean $\pm$ S.E.M, sử dụng kiểm định ANOVA kèm hậu kiểm LSD hoặc Dunnett's T3 để so sánh sự khác biệt giữa các lô, sử dụng test so sánh cặp (pair samples T test) để so sánh sự khác nhau trong cùng một lô. Với các mẫu rời rạc hoặc không tuân theo phân bố chuẩn, dữ liệu được biểu diễn dưới dạng trung vị (khoảng tứ phân vị) và sử dụng kiểm định Kruskal- wallis để so sánh sự khác biệt giữa các lô, sử dụng test Wilcoxon để so sánh sự khác biệt trong cùng một lô. Sự khác biệt giữa các lô được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Tác dụng cải thiện chức năng khứu giác của cao chiết lá chè đắng (IKE)

Để đánh giá tác dụng cải thiện chức năng khứu giác của IKE trên mô hình chuột bị tổn thương khứu giác cấp gây bởi ZnSO₄, chúng tôi tiến hành thử nghiệm tìm kiếm mùi bơ lạc.



Hình 2. Tác dụng cải thiện chức năng khứu giác của IKE được đánh giá bằng thử nghiệm tìm kiếm mùi bơ lạc.

A) Hình ảnh minh họa thử nghiệm; B) Biểu đồ đo thời gian tìm kiếm mùi bơ lạc của chuột trong các lô chuột thực nghiệm.

$n = 10-11$ / lô; ** $p < 0,01$ so với lô chứng sinh lý;

$p < 0,05$ so với lô chứng bệnh lý.

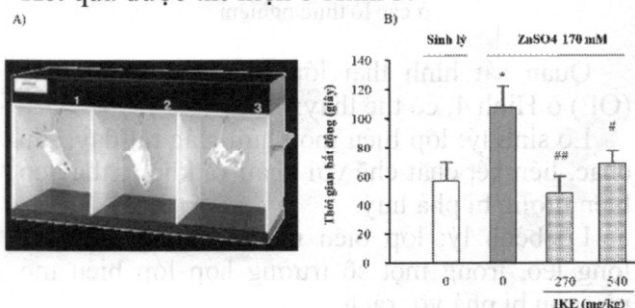
Kết quả của Hình 2 cho thấy:

Nhóm chuột ở lô bệnh lý (chuột bị tổn thương khứu giác cấp tính gây bởi ZnSO₄ 170 mM) có thời gian tìm thấy vị trí tấm giấy thấm mùi bơ lạc nhiều hơn đáng kể so với nhóm chuột ở lô sinh lý, đạt ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,01$.

Lô chuột được điều trị bằng cao chiết lá chè đắng (ở cả hai mức liều 270 và 540 mg/kg) có thời gian tìm thấy vị trí tấm giấy thấm mùi bơ lạc ít hơn đáng kể so với nhóm chuột ở lô bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Mặc dù vậy, điều trị bằng cao chiết lá chè đắng ở cả 2 mức liều thử nghiệm đều cho thấy không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý.

3.2. Tác dụng chống trầm cảm của cao chiết lá chè đắng

Thử nghiệm treo đuôi chuột để đánh giá tác dụng chống trầm cảm của lá chè đắng trên chuột bị tổn thương khứu giác cấp tính gây bởi ZnSO₄. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Tác dụng chống trầm cảm của IKE được đánh giá bằng thử nghiệm treo đuôi chuột. A) Hình ảnh minh họa thử nghiệm; B) Biểu đồ đo thời gian bất động của chuột trong các lô chuột thực nghiệm; * $p < 0,05$ so với lô chứng sinh lý; ## $p < 0,05$ và # $p < 0,01$ so với lô chứng bệnh lý.

Kết quả ở Hình 3 cho thấy:

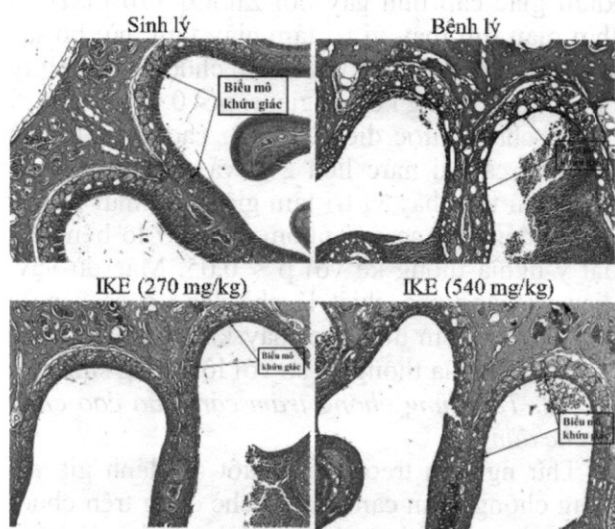
Thời gian bất động của chuột bị tổn thương khứu giác cấp tính gây bởi ZnSO₄

170 mM cao hơn đáng kể so với thời gian bất động của chuột ở lô sinh lý, đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Nhóm chuột bị tổn thương khứu giác cấp tính sau khi được điều trị bằng cao chiết lá chè đắng (ở cả 2 mức liều 270 và 540 mg/kg) đều cho thấy thời gian bất động thấp hơn nhiều so với nhóm chuột bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê với giá trị p lần lượt $< 0,01$ và $< 0,05$.

3.3. Tác dụng cải thiện tổn thương biểu mô khứu giác của lá chè đắng

Sau khi kết thúc thí nghiệm hành vi, mũi chuột được tách và nhuộm H&E. Quan sát đặc điểm lớp biểu mô khứu giác dưới kính hiển vi và chụp ảnh lại dưới vật kính x4 và x10. Một số hình ảnh minh họa biểu mô khứu giác điển hình của các lô chuột thực nghiệm được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Hình ảnh minh họa biểu mô khứu giác chuột ở các lô thực nghiệm

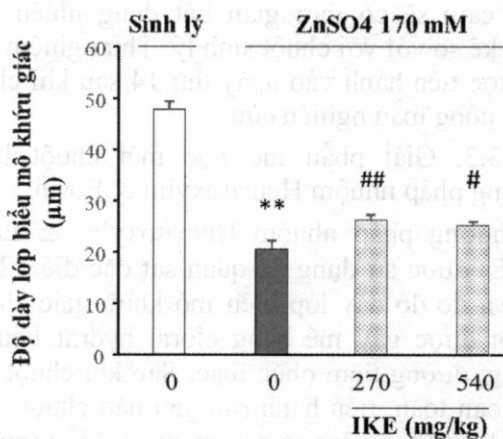
Quan sát hình thái lớp biểu mô khứu giác (OE) ở Hình 4, có thể thấy:

Lô sinh lý: lớp biểu mô khứu giác rất dày, săn chắc, liên kết chặt chẽ với nhau và không thấy có hiện tượng bị phá hủy.

Lô bệnh lý: lớp biểu mô rất mỏng, liên kết lỏng lẻo, trong một số trường hợp lớp biểu mô này còn bị phá vỡ, rách.

Lô điều trị bằng cao chiết lá chè đắng (liều 270 và 540 mg/kg): lớp biểu mô khứu giác mỏng hơn so với lô sinh lý, tuy nhiên nó lại dày hơn và liên kết chặt chẽ hơn so với lô bệnh lý.

Sau khi chụp ảnh mô khứu giác, chúng tôi tiến hành đo độ dày lớp OE và kết quả đo độ dày lớp biểu mô khứu giác được trình bày ở Hình 5.



Hình 5. Biểu đồ đo độ dày lớp biểu mô khứu giác ở các lô chuột thực nghiệm. $n=5-6$ chuột/lô. ** $p < 0,01$ so với lô chứng sinh lý; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ so với lô chứng bệnh lý.

Kết quả Hình 5 cho thấy:

Lớp OE của chuột bị tổn thương khứu giác cấp tính bằng ZnSO₄ (lô bệnh lý) nhỏ hơn đáng kể khi so sánh với lớp OE của những con chuột ở lô sinh lý, đạt ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,001$.

Lô chuột được điều trị bằng cao chiết lá chè đắng ở cả 2 mức liều 270 mg/kg và 540 mg/kg đều cho thấy mức độ cải thiện đáng kể độ dày lớp OE so với lô bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê với giá trị p lần lượt $< 0,01$ và $< 0,05$.

4. Bàn luận

Kẽm sulfat (ZnSO₄) là một hợp chất vô cơ, nó là một loại thuốc không kê đơn thường được sử dụng để điều trị tình trạng thiếu kẽm. Bên cạnh đó, ZnSO₄ cũng được sử dụng ở nhiều loài khác nhau để phá hủy biểu mô khứu giác. Việc sử dụng ZnSO₄ làm tác nhân gây mô hình tổn thương khứu giác cấp tính trên chuột nhắt trắng cũng đã được báo cáo. Nghiên cứu của Ahn và cs. (2018) đã chứng minh về việc sử dụng ZnSO₄ 170 mM liều duy nhất, đường nhỏ mũi gây ra sự phá hủy biểu mô khứu giác, làm suy giảm chức năng khứu giác, đồng thời gây trầm cảm và lo âu trên chuột nhắt trắng. Tuy nhiên, biểu mô khứu giác có thể tự bình phục sau khi tiếp xúc với ZnSO₄ và các rối loạn hành vi liên quan đến khứu giác cũng có thể tự phục hồi. Cụ thể, 3 tuần sau khi được nhỏ mũi bởi ZnSO₄, tình trạng suy giảm chức năng khứu giác và trầm cảm đã tự phục hồi thông qua đánh giá các hành vi tìm kiếm mùi và hành vi treo đuôi chuột [9]. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng ZnSO₄ gây tổn thương chức năng khứu giác chuột nhắt trắng và đánh giá tác dụng của cao chiết lá chè đắng.

Liều cao chiết lá chè đắng sử dụng trong nghiên cứu này là 270 và 540 mg/kg dựa trên các

công bố trước đây của chúng tôi đã chứng minh cao chiết lá chè đắng có tác dụng cải thiện một số hành vi thần kinh trên mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm gây bởi muối natri valproat và mô hình gây suy giảm trí nhớ chuột nhất bằng phương pháp loại bỏ thùy khứu giác 2 bên [7],[11].

Tính đến thời điểm hiện tại vẫn chưa có thuốc đặc hiệu để điều trị tổn thương khứu giác mà chỉ có những thuốc hỗ trợ điều trị tình trạng này. Do đó, trong quá trình thực hiện nghiên cứu này, chúng tôi không lựa chọn chứng dương. Thay vào đó, chúng tôi đánh giá hiệu quả của các mô hình thử nghiệm bằng cách so sánh kết quả giữa lô sinh lý với lô bệnh lý (chuột bị tổn thương khứu giác cấp tính gây bởi ZnSO_4 170 mM). Và để đánh giá tác dụng của cao chiết lá chè đắng đối với tình trạng tổn thương khứu giác, chúng tôi so sánh kết quả của lô chuột được điều trị bằng cao chiết lá chè đắng với lô chuột bệnh lý.

Kết quả của thử nghiệm hành vi tìm kiếm mùi cho thấy thời gian tìm thấy vị trí tấm giấy tẩm mùi bơ lạc của lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu đã công bố của Ahn và cs. [9]. Qua đó cho thấy nghiên cứu của chúng tôi đã gây được mô tổn thương khứu giác bằng ZnSO_4 , từ đó có thể dùng để đánh giá được tác dụng của lá chè đắng trên mô hình này. Qua kết quả đo thời gian tìm kiếm mùi của các lô chuột cho thấy cao chiết lá chè đắng có tác dụng cải thiện chức năng khứu giác trên mô hình chuột bị tổn thương khứu giác cấp tính gây bởi ZnSO_4 170 mM.

ZnSO_4 gây ra rối loạn điều hòa thụ thể glucocorticoid (GR) và hormon giải phóng corticotropin (CRH) ở vùng dưới đồi và hạch hạnh nhân từ đó dẫn đến các hành vi trầm cảm [10]. Thử nghiệm treo đuôi chuột là thử nghiệm được sử dụng rộng rãi nhất để đánh giá hành vi trầm cảm của loài gặm nhấm. Thử nghiệm này dựa trên nguyên tắc khi động vật phải chịu những căng thẳng ngắn hạn, không thể trốn thoát khi bị treo đuôi sẽ rơi vào trạng thái bất động. Chúng tôi thực hiện thử nghiệm treo đuôi chuột vào ngày thứ 14 sau khi chuột được uống mẫu nghiên cứu và kết quả cho thấy thời gian bất động của lô chuột bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô chuột sinh lý. Điều này đồng nghĩa với việc chuột có xu hướng bị trầm cảm sau khi bị gây tổn thương bởi ZnSO_4 [9]. Kết quả nghiên cứu của lô điều trị bằng cao chiết lá chè đắng cho thấy cả 2 mức liều 270 mg/kg và 540 mg/kg đều mang lại tác dụng chống trầm cảm thông qua khả năng cải thiện thời gian bất động của chuột khi thử nghiệm hành vi treo đuôi. Một số nghiên cứu trong nước và

trên thế giới đã chứng minh được tác dụng của lá chè đắng trên hệ thần kinh. Nghiên cứu của Viện Dược liệu đã chỉ ra lá chè đắng có khả năng cải thiện các hội chứng tự kỷ như chống lo âu, tăng tương tác xã hội và cải thiện suy giảm trí nhớ/nhận thức trên mô hình chuột tự kỷ thực nghiệm [11]. Hay trong một nghiên cứu khác, Kim và cs. đã báo cáo chè đắng có khả năng bảo vệ tế bào thần kinh khỏi những tổn thương do thiếu máu cục bộ thoáng qua gây ra ở chuột nhắt. Hơn nữa, lá chè đắng còn có tác dụng làm giảm đáng kể nhồi máu do tắc động mạch não giữa (MCAO), thiếu máu thần kinh và chết tế bào não [12]. Trong nghiên cứu này, chè đắng được phát hiện có khả năng chống trầm cảm, khả năng này cho thấy tiềm năng của lá chè đắng trong việc hỗ trợ/điều trị các bệnh về thần kinh.

Kết quả đo độ dày lớp biểu mô khứu giác bằng phương pháp nhuộm H&E đã cho thấy nhóm chuột bị tổn thương khứu giác có lớp OE mỏng, liên kết lỏng lẻo và đôi khi còn bị rách; trong khi lớp OE của nhóm chuột sinh lý rất dày, săn chắc và liên kết rất chặt chẽ với nhau. Các lô được điều trị bằng cao chiết lá chè đắng cho thấy tác dụng cải thiện rõ rệt tổn thương biểu mô khứu giác thông qua khả năng cải thiện độ dày của lớp OE. Như vậy, có thể thấy cao chiết lá chè đắng có tác dụng cải thiện tổn thương lớp biểu mô khứu giác trên mô hình chuột bị tổn thương khứu giác gây bởi ZnSO_4 . Trên thế giới cũng đã có một số nghiên cứu sử dụng phương pháp đo OE để đánh giá mức độ cải thiện tổn thương biểu mô khứu giác. Nghiên cứu của Noda và cs. đã đánh giá tác dụng của Tokishakuyakusan đối với khả năng tái tạo tế bào thần kinh khứu giác trên chuột. Nghiên cứu này đã sử dụng methimazol để gây mô hình tổn thương khứu giác, mô hình sử dụng methimazol giống với mô hình sử dụng ZnSO_4 về khả năng gây tổn thương lớp biểu mô khứu giác. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy: sau 14 và 28 ngày sau khi tiêm methimazol, lớp OE dày hơn đáng kể trên nhóm chuột được điều trị bằng Tokishakuyakusan so với nhóm không được điều trị [13].

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đã sử dụng mô hình gây tổn thương khứu giác bằng ZnSO_4 để đánh giá tác dụng của dược liệu. ZnSO_4 gây phá hủy lớp biểu mô khứu giác làm suy giảm chức năng khứu giác; ngoài ra, nó còn gây ra rối loạn điều hòa thụ thể glucocorticoid (GR) và hormon giải phóng corticotropin (CRH) ở vùng dưới đồi và hạch hạnh nhân từ đó dẫn đến các hành vi trầm cảm [9]. Đây mới chỉ là những nghiên cứu bước đầu chứng minh tác dụng phục hồi chức

năng khứu giác và cải thiện hành vi trầm cảm gây bởi ZnSO₄ cấp tính nên cần thiết phải có những nghiên cứu sâu hơn để chứng minh cơ chế liên quan.

5. Kết luận

Từ những kết quả trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra kết luận như sau: cao chiết lá chè đắng (liều 270 và 540 mg/kg) có tác dụng cải thiện tổn thương khứu giác trên chuột bị tổn thương khứu giác gây bởi ZnSO₄ thông qua các tiêu chí bao gồm cải thiện chức năng

khứu giác bằng thử nghiệm tìm kiếm mùi, chống trầm cảm bằng thử nghiệm treo đuôi chuột và cải thiện tổn thương biểu mô khứu giác bằng phương pháp đo độ dày lớp biểu mô khứu giác.

Lời cảm ơn: Kết quả thu được trong nghiên cứu này là sản phẩm của đề tài cấp cơ sở Viện Dược liệu: “Xây dựng mô hình tổn thương thùy khứu giác bằng ZnSO₄ định hướng nghiên cứu dược liệu có tác dụng hỗ trợ điều trị virus Corona”.

Tài liệu tham khảo

1. Nordin S., Brämerson A. (2008), Complaints of olfactory disorders: epidemiology, assessment and clinical implications, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(1), 10-15.
2. Yang J., Pinto J. M. (2016), The Epidemiology of Olfactory Disorders, *Current Otorhinolaryngology Reports*, 4(2), 130-141.
3. Saniasiaya J., Islam M. A., Abdullah B. (2021), Prevalence of Olfactory Dysfunction in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Meta-analysis of 27, 492 Patients, *The Laryngoscope*, 131(4), 865-878.
4. Nguyễn Tiến Bản, Nguyễn Khắc Khởi (1999), Tên khoa học của cây chè đắng ở Việt Nam, *Tạp chí Sinh học*, 1-3.
5. Nguyễn Văn Đậu, Lê Ngọc Thức (2006), Đóng góp vào việc nghiên cứu hoá thực vật cây chè đắng (*Ilex kaushue* S.Y. Hu (Aquifoliaceae)), *Tạp chí khoa học ĐHQHN, KHTN CN*, T.XXII, 1.
6. Li L., Xu L. J., Ma G. Z., Dong Y. M., Peng Y., Xiao P. G. (2013), The large-leaved Kudingcha (*Ilex latifolia* Thunb and *Ilex kudingcha* C.J. Tseng): a traditional Chinese tea with plentiful secondary metabolites and potential biological activities, *Journal of Natural Medicines*, 67(3), 425-437.
7. Pham T. N. H., Phi T. X., Le T. X., Nguyen M. K., Nguyen T. L., Matsumoto K., Yamaguchi M., Folk W. R. (2018), Anti-dementia Effects of *Ilex kudingcha* Leaves on Olfactory Bulbectomy-Induced Memory Impairment in Mice, *Journal of Medicinal Materials*, 23(5), 301-308.
8. Morales-Medina J. C., Iannitti T., Freeman A., Caldwell H. K. (2017), The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: The hippocampal pathway, *Behavioural Brain Research*, 317, 562-575.
9. Ahn S., Choi M., Kim H., Yang E. J., Mahmood U., Kang S. I., Shin H. W., Kim D. W., Kim H. S. (2018), Transient Anosmia Induces Depressive-like and Anxiolytic-like Behavior and Reduces Amygdalar Corticotropin-Releasing Hormone in a ZnSO₄-Induced Mouse Model, *Chemical Senses*, 43(4), 213-221.
10. Ahn S., Shin H. W., Mahmood U., Khalmuratova R., Jeon S. Y., Jin H. R., Choi J. S., Kim H. S., Kim D. W. (2016), Chronic anosmia induces depressive behavior and reduced anxiety via dysregulation of glucocorticoid receptor and corticotropin-releasing hormone in a mouse model, *Rhinology*, 54(1), 80-87.
11. Phạm Thị Nguyệt Hằng, Trần Nguyên Hồng, Nguyễn Thị Phụng, Lê Thị Xoan, Nguyễn Minh Khởi, Đỗ Thị Hà, Hà Văn Oanh, Masamitsu Yamaguchi, William R. Folk, Kinzo Matsumoto (2020), Tác dụng cải thiện hội chứng tự kỷ của lá chè đắng trên mô hình chuột nhắt tự kỷ gây bởi natri valproate, *Tạp chí Dược liệu*, 25(1), 50-55.
12. Kim J. Y., Jeong H. Y., Lee H. K., Yoo J. K., Bae K., Seong Y. H. (2011), Protective effect of *Ilex latifolia*, a major component of “kudingcha”, against transient focal ischemia-induced neuronal damage in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 558-564.
13. Noda T., Shiga H., Yamada K., Harita M., Nakamura Y., Ishikura T., Kumai M., Kawakami Z., Kaneko A., Hattai T., Sakata-Haga H., Shimada H., Miwa T. (2019), Effects of tokishakuyakusan on regeneration of murine olfactory neurons *in vivo* and *in vitro*, *Chemical Senses*, 44(5), 327-338.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 1/2024 (Trang 22 - 28)

CÁC DẪN XUẤT FLAVONOID, BENZYL, PHENYLPROPANOID GLYCOSID TỪ LOÀI *BARRINGTONIA MACROCARPA* VÀ TÁC DỤNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ *IN VITRO*

Phạm Thị Châm¹, Lê Thị Viên¹, Dương Thu Trang¹, Trần Thị Hồng Hạnh¹, Trần Hồng Quang¹, Hà Văn Oanh², Nguyễn Phương Thảo¹, Nguyễn Xuân Cường^{1,*}, Nguyễn Hoài Nam¹

¹Viện Hoá sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST);

²Trường Đại học Dược Hà Nội

*Email: cuongnx@imbc.vast.vn

(Nhận bài ngày 19 tháng 7 năm 2023)

Tóm tắt

Sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp, ba hợp chất flavonoid glycosid là quercetin 3-O-methyl ether-7-O-β-D-glucopyranosid (1), kaempferol 3-O-methyl ether-7-O-β-D-glucopyranosid (2), quercetin 3-O-methyl ether-4'-O-β-D-glucopyranosid (3), một hợp chất benzyl glycosid là benzyl O-β-D-apiofuranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosid (4) và một hợp chất phenylpropanoid glycosid là dihydrosyringin (5) đã được phân lập từ cặn chiết methanol của cây Chiết trái to - *Barringtonia macrocarpa*. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định thông qua phân tích số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (¹H và ¹³C NMR) và hai chiều (HSQC và HMBC) kết hợp so sánh với các số liệu phổ đã được công bố. Ngoài ra, các hợp chất 2 và 4 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào yếu trên ba dòng tế bào ung thư người được thử nghiệm là HepG2, LNCaP và MCF7 với giá trị IC₅₀ trong khoảng 82,89 ± 1,85 đến 99,73 ± 3,42 μM.

Từ khóa: *Barringtonia macrocarpa*, Lecythidaceae, Flavonoid glycosid, Benzyl glycosid, Phenylpropanoid glycosid.