

ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN CỦA CHIẾT XUẤT ETANOL VỎ QUẢ *Annona squamosa* L. QUA NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN MÃN TÍNH TRÊN CHUỘT

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG^{1*}, NGUYỄN THỊ TRANG¹, TRẦN THỊ THANH NHÃ², NGUYỄN
NGỌC BẢO TRÂN¹, NGUYỄN THỊ YẾN NHI¹, NGUYỄN DUY KHANG¹, ĐINH THỊ DIỄM¹,
NGUYỄN THU VIÊN¹, PHAN THỊ TUYẾT MAI¹, LÊ CHI NA¹, VÕ QUÍ NHƯ¹, MAI NGUYỄN
NGUYỄN THẢO¹, LÊ TRÚC TIÊN¹, NGUYỄN THỊ HỒNG TRÂM¹

¹Viện Công nghệ sinh học và thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh,

²Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

Tóm tắt. *Annona squamosa* L. (họ Annonaceae) là một loài cây bụi thường xanh lớn, được trồng ở nhiều vùng khác nhau của Việt Nam. Nhiều chất chuyển hóa trong *A. squamosa* L. đã cho thấy các hoạt động chống oxy hóa và kháng khuẩn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tính an toàn của chiết xuất nước từ vỏ quả *A. squamosa* L. (EaAS) bằng cách sử dụng các thử nghiệm độc cấp tính và bán mãn tính ở chuột Swiss albino. Độc tính cấp tính (1000, 3000, 5000 và 7000 mg/kg thể trọng) và độc tính bán mãn tính (100, 300, 500 và 700 mg/kg thể trọng) được xác định bằng đường uống và kiểm tra liên tục trong 14 và 90 ngày. Các dấu hiệu nhiễm độc, thay đổi hành vi, tỷ lệ tử vong, thay đổi khối lượng cơ thể và nội tạng, huyết học, sinh hóa, phân tích nước tiểu, mô bệnh học của nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm độc cấp tính và bán mãn tính của EaAS đã được khảo sát. Kết quả kiểm tra cho thấy không có bất thường ở các nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng. EaAS không gây độc cấp tính hoặc bán mãn tính ở chuột.

Từ khóa: *Annona squamosa* L., độc tính cấp, độc tính bán mãn tính

SAFETY EVALUATION OF ETHANOL EXTRACT OF FRUIT PEEL *Annona squamosa* L. BY ACUTE AND SUB-CHRONIC TOXICITY STUDIES IN MICE

Abstract. *Annona squamosa* Linn. (family Annonaceae) is a large evergreen shrub, cultivated in various regions of Vietnam. Many metabolites in *A. squamosa* L. have shown antioxidant and antimicrobial activities. This study, we investigate the safety of an aqueous extract of fruit peel *A. squamosa* L. (EaAS) employing acute and subchronic assays of toxicity in Swiss albino mice. The acute toxicity (1000, 3000, 5000, and 7000 mg/kg body weight) and subchronic toxicity (100, 300, 500, and 700 mg/kg body weight) were determined by oral administration and examined daily for 14 and 90 days continuously. Control groups and the satellite group test were analyzed by signs of toxicity, behavioral changes, mortality rate, changes in the body and organ weights, examining hematology, biochemistry, urine analysis, and histopathology. The examinations showed no abnormalities in the test groups compared to the controls. The results indicated that EaAS do not cause acute or subchronic toxicities in mice.

Keywords: *Annona squamosa* L., acute toxicity, subchronic toxicity

1. GIỚI THIỆU

Annona squamosa L. (hay còn gọi là măng cầu ta hoặc na) là loại thực vật có hoạt tính dược lý, được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền. Trong thành phần của *A. squamosa* L. chứa các hợp chất hóa học như ancaloit, xeton hydroxyl isomeric từ lá, acetogenin, samaquasin, methonaxin và methonastatin từ hạt, axetogenin, squamone từ vỏ cây [1]. Các bộ phận khác nhau của *A. squamosa* L. đã được nghiên cứu và báo cáo với tác dụng dược lý như giảm đau, chống viêm, bảo vệ gan và diệt côn trùng [2]. Chiết xuất etanol từ lá *A. squamosa* L. chứa hợp chất chống ung thư [3, 4], điều trị chứng cuồng loạn, ngất xỉu, cảm lạnh, ho, nhiễm trùng đường ruột và ợ chua [5], lá *A. squamosa* L. già nát được sử dụng đắp lên vết thương bên ngoài, nước sắc dùng điều trị viêm dạ dày [1]. Nước chiết xuất từ trái cây *A. squamosa* L. trị cảm lạnh, sốt, tẩy giun sán, tiêu chảy, kiết lỵ, tăng sữa cho mẹ sau khi sinh [6]. Hạt già nát dùng chống nội, ngoại ký sinh trùng, chấy, giun. Vỏ cây là vị thuốc an thần, bổ trợ thần kinh. Rễ chứa axetogenin chống ung thư [7] và co

giật [8]. Chiết xuất etanol vỏ quả *A. squamosa* L. chứa các hợp chất như ancaloit, flavonoit, hợp chất phenol, saponin [9], phytosteron, glycosit [10], terpenoit, protein, cacbonhydrat, tannin [11], giúp giảm đau, tăng cảm thụ, chống oxy hóa (tổng hoạt tính chống oxy hóa là 206 μg α -tocopherol/g) [12], kháng khuẩn, kháng viêm [9]. Chiết xuất nước từ vỏ quả *A. squamosa* L. cũng chứa các hợp chất như 1H- cycloprop [e] azulen-7-ol decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene- [1ar- (1a α , 4a α , 7 β , 7 a, β , 7b α)], [13]. Trong những năm gần đây, đã có hơn 13.000 loài thực vật được nghiên cứu và khoảng 10.000 loài trong số này được ghi nhận về tác dụng dược lý [14]. Giá trị dược lý của chiết xuất từ cây *A. squamosa* L. cũng được ghi nhận trong số đó [1]. Tuy nhiên, ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy nhiều loại thảo dược gây ra độc tính nghiêm trọng cho đối tượng sử dụng. Mô hình độc tính cấp từ chiết xuất etanol hạt *A. squamosa* L. đã thực hiện cho kết quả LD₅₀ tìm thấy ở liều uống 5000 mg/kg thể trọng [15]. Xác định khả năng gây độc cấp tính qua đường miệng của chiết xuất nước lá *A. squamosa* L. không tìm thấy LD₅₀ ở liều 5000 mg/kg thể trọng trên chuột thí nghiệm [16]. Chưa có nghiên cứu khảo sát độc tính chiết xuất nước vỏ quả *A. squamosa* L. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá độc tính cấp và bán mãn tính qua đường miệng của chiết xuất nước vỏ quả *A. squamosa* L. trên chuột nhằm khẳng định tính an toàn của chiết xuất.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu thực vật

A. squamosa L. được thu hái tại thành phố Tây Ninh, tỉnh Tây Ninh, Việt Nam. Mẫu chứng được lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh. Vỏ quả *A. squamosa* L. được rửa, bóc vỏ và sấy khô ở 60°C cho đến khi đạt được độ ẩm $\leq 12\%$, nghiền thành bột có kích thước $< 0,5$ mm. Bột *A. squamosa* L. được đóng gói trong chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Chuẩn bị dịch chiết *A. squamosa* L.: Bột vỏ *A. squamosa* L. được chiết xuất với dung môi nước, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 25/1 (v/w), thời gian chiết 5 phút, công suất vi sóng là 214 W (lò vi sóng Sanyo, Nhật Bản). Thu dịch chiết xuất và lọc qua giấy Whatman số 4. Dịch lọc cuối cùng được ngưng tụ ở áp suất giảm (130 mmBar), 75°C. Sau đó chiết xuất vỏ quả *A. squamosa* L. (EaAS) được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng tiếp [11].



Hình 1. Chiết xuất nước vỏ quả *A. squamosa* L., sản phẩm có màu nâu, vị thanh nhạt. A. Vỏ quả *A. squamosa* L. sấy khô; B. Bột vỏ quả *A. squamosa* L.; C. EaAS

2.2. Phân tích hóa học

Phân tích thành phần các hợp chất hoạt tính sinh học của EaAS theo các kỹ thuật chung bao gồm các hợp chất phenol (thử nghiệm magiê và HCl) [17], ancaloit (thử nghiệm Mayer) [18], saponin (thử nghiệm froth) [19], flavonoit (thử nghiệm kiềm) [20], phytosteron (thử nghiệm Libermann-Burchard) [21], tannin (thử nghiệm clorua sắt), ditecpen (thử nghiệm axetat đồng) [22], steron và tritecpenoit (thử nghiệm Salkowski) [23], glycosit (thử nghiệm Borntrager) [24], cacbonhydrat (thử nghiệm Molishs), protein và axit amin (thử nghiệm Biuret) [21], dầu và chất béo (thử nghiệm Saponification) [25].

2.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng Swiss albino (23 - 25g) được thu mua tại Viện Pasteur, Tp. HCM. Chuột được nuôi tại nhà động vật, vườn thực nghiệm Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm, Tp. HCM, được duy trì ở nhiệt độ $(29 \pm 2)^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối $(50 \pm 10)\%$ [26], chu kỳ sáng/tối là 12h/12h [27]. Lồng nuôi chuột được làm bằng kính, kích thước 15cm x 30cm. Máng treo bằng inox móc vào thành lồng để đựng thức ăn và nước uống. Nước uống sạch chứa trong bình có vòi uống, sử dụng thức ăn viên nhân tạo dành cho động vật gặm nhấm [28]. Sau 7 ngày nuôi thích nghi, 60 con chuột đực được phân bố ngẫu nhiên thành các nhóm (n = 6). Quy trình thử nghiệm được tuân thủ nghiêm ngặt theo Tuyên bố Helsinki (2007) [29].

2.4. Nghiên cứu độc tính

Nghiên cứu được thiết kế dựa trên các khuyến nghị của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) [30] và theo hướng dẫn đánh giá độc tính thảo dược của tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) [31], hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu theo quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 của Cục trưởng Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo, Bộ Y tế, Việt Nam [32]. Các khuyến nghị đã được tuân theo về số lượng và giới tính của động vật được sử dụng [33].

Thử nghiệm độc tính cấp tính

Nghiên cứu độc tính cấp tính qua đường miệng của EaAS được đánh giá theo hướng dẫn 423 của Tổ chức Hợp tác Kinh tế và Phát triển (OECD) trên chuột Swiss albino đực ($23 \pm 2g$) [34] trong đó liều thử nghiệm giới hạn là 7000 mg/kg thể trọng. Liều lượng được tính bằng cách đánh giá hàm lượng chất khô trong chiết xuất (cao chiết sử dụng cho chuột uống được pha loãng trong nước cất). Động vật được cho nhịn ăn qua đêm trước mỗi thí nghiệm. 30 chuột đực được chia thành 5 nhóm ($n = 6$). Nhóm 1 là đối chứng âm, nhóm 2,3,4,5 là nhóm được thử nghiệm uống EaAS với liều 1000, 3000, 5000, 7000 mg/kg thể trọng. Trước khi chuột được uống EaAS, khối lượng cơ thể từng con được xác định và liều lượng EaAS được tính theo khối lượng cơ thể. Các con vật được quan sát trong 24 giờ đầu sau khi uống EaAS. Sau đó các động vật tiếp tục được uống EaAS trong 7 ngày liên tục và theo dõi đến 14 ngày về những biểu hiện hành vi, nhiệt độ, hô hấp, co giật, run, màu mắt, da, khối lượng cơ thể, lượng thức ăn, nước uống..... [26]. Sau đó, động vật đã được gây chết bằng cách cho hít khí CO₂ và tiến hành giải phẫu [35, 36].

Thử nghiệm độc tính bán mãn tính

Nghiên cứu độc tính cấp dưới đường uống được thực hiện theo hướng dẫn 407 của OECD [37]. Chuột Swiss albino đực trưởng thành khỏe mạnh ($23 \pm 2g$) được chia thành 5 nhóm ($n = 6$) và được nuôi trong điều kiện tiêu chuẩn. Nhóm 1 là nhóm đối chứng và 4 nhóm còn lại là nhóm thử nghiệm uống EaAS với liều lượng là 100, 300, 500, 700 mg/kg thể trọng (liều lượng được tính bằng cách đánh giá hàm lượng chất khô trong chiết xuất, cao chiết được pha loãng trong nước cất trước khi cho chuột uống) trong 60 ngày liên tục và theo dõi đến 90 ngày [26]. Những con chuột được quan sát hàng ngày về các hành vi bất thường và các dấu hiệu bất lợi khác của độc tính. Mức tiêu thụ thức ăn, nước uống, khối lượng cơ thể được ghi lại hàng tuần. Vào cuối quá trình thử nghiệm, sử dụng khí CO₂ để gây chết động vật thí nghiệm trước khi giải phẫu. Mẫu máu được lấy cho các xét nghiệm huyết học, sinh hóa. Gan, thận, tim đã được thu thập, cân và phân tích mô bệnh học [35, 36].

2.5. Quan sát lâm sàng và tỷ lệ sống sót

Tác dụng độc bán mãn tính của EaAS được xác định bằng cách sử dụng phác đồ theo hướng dẫn 423 của OECD [34]. Chuột được quan sát hàng ngày trong suốt 14 ngày nghiên cứu độc tính cấp tính và 90 ngày nghiên cứu độc tính bán mãn tính. Sự thay đổi các dấu hiệu được so sánh với tình trạng cơ bản như: Hệ thần kinh trung ương: hoạt động vận động, mất điều hòa, phản xạ nghiêng, phản xạ giác mạc, liệt bàn chân, hoạt động cầm nắm, phản ứng báo động, run, giật đầu và co giật; Mắt: nhãn khoa, ngoại nhãn, giãn đồng tử, rung giật nhãn cầu, chảy nước mắt, giãn màng mi và đục giác mạc; Da: xanh xao, tím tái và sung huyết; Các dấu hiệu chung: tiết nước bọt, cương cứng ở đuôi, tiêu chảy, mất nước (thử nghiệm Robichaud), khó thở, chảy nước mũi, thụ động, hung hăng, sợ hãi [33].

2.6. Khối lượng cơ thể

Động vật được cân hàng tuần trong toàn bộ và ngày cuối cùng của quá trình thử nghiệm bằng cân điện tử GS-SHINKO (Nhật Bản) và tính mức độ tăng trọng (%) theo công thức:

$$\text{Mức độ tăng trọng (\%)} = \frac{(W_f - W_i)}{W_i} \times 100$$

Trong đó W_f = khối lượng cuối cùng; W_i = khối lượng đầu [38].

2.7. Thức ăn, nước uống tiêu thụ

Lượng thức ăn và nước uống được ghi lại hàng ngày. Lượng thức ăn và nước tiêu thụ được đo lường trước khi cung cấp cho mỗi nhóm, phần còn lại được thu nhận và tính toán vào ngày hôm sau để có được sự khác biệt. Thức ăn hàng ngày tính theo đơn vị g/ngày và lượng nước tiêu thụ là ml/ngày [39].

2.8. Phân tích huyết học và sinh hóa máu

Vào ngày cuối cùng của quá trình thí nghiệm, các con chuột được gây chết bằng khí CO₂ sau khi nhịn ăn qua đêm (8 giờ). Mẫu máu được lấy vào ống nghiệm có axit etylen diamine tetra axetic làm chất chống đông máu để phân tích huyết học. Máu đựng trong ống nghiệm không có axit ethylene diamine tetra acetic

dùng để phân tích sinh hóa, đông lại sau khi ly tâm ở 2500 v/phút trong 15 phút và thu huyết thanh. Mẫu máu được bảo quản ở 4°C và gửi đến cơ quan xét nghiệm để phân tích huyết học, sinh hóa [26]. Hồng cầu (RBC), hemoglobin (HGB), tiểu cầu (PLT), bạch cầu (WBC), bạch cầu mono (MONO), bạch cầu lympho (LYM), bạch cầu hạt (GRA) của các nhóm thử nghiệm (uống EaAS) được xác định và so sánh với nhóm đối chứng. Phân tích sinh hóa được thực hiện trên huyết thanh sau khi ly tâm máu và các thông số như tổng protein, glucose, triglycerit, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphat (ALP), creatin, urê được xác định cho nhóm đối chứng và nhóm uống EaAS.

2.9. Khối lượng cơ quan tương đối

Sau khi lấy máu, các cơ quan quan trọng như gan, thận, tim, dạ dày của nhóm uống thử nghiệm EaAS được tách ra, cân khối lượng từng cơ quan trên cân điện tử (M) và so sánh với nhóm đối chứng [40]. Khối lượng cơ quan tương đối (ROW) của mỗi con chuột được tính theo công thức:

$$ROW (\%) = \frac{\text{Khối lượng nội tạng tuyệt đối (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể chuột vào ngày phẫu thuật (g)}} \times 100 \quad [41].$$

2.10. Phân tích nước tiểu

Các con chuột được đặt riêng lẻ trong các lồng kính đã khử trùng, có sẵn nước, nhưng không có thức ăn. Nước tiểu được thu thập 0,3 ml trong 16 giờ. Sau đó đo lượng nước và lượng nước tiểu. Các thông số xét nghiệm gồm thể tích, glucose, thể xeton, pH, khối lượng riêng, tế bào máu, protein nước tiểu phân tích bằng máy phân tích nước tiểu Siemens Clinitek (Đức) [42].

2.11. Đánh giá mô học

Gan, thận, tim, dạ dày được bảo quản trong dung dịch Formandehyt 10%, cố định trong 36 - 48 giờ và trải qua các quy trình mô học thông thường để kiểm tra mô bệnh học. Các phần mô được kiểm tra dưới kính hiển vi với vật kính x 10 để kiểm tra hình thái, tình trạng tế bào và mô [43].

2.12. Phân tích thống kê

Các kết quả thực nghiệm được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Dữ liệu được phân tích thống kê bằng cách phân tích ANOVA. Mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác giữa các nghiệm thức là $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Phân tích hóa học của EaAS

Bảng 1. Thành phần hóa học của chiết xuất nước vỏ quả *A. squamosa* L.

Các hợp chất	EaAS	Các hợp chất	EaAS
Ancaloit	+	Phytosteron	+
Flavonoit	+	Ditecpen	+
Saponin	+	Glycosit	+
Phenolic	+	Protein và axit amin	+
Steron và tritecpenoit	+	Cacbonhydrat	+
Tannin	+	Dầu và chất béo	-

(+) Hiện diện trong EaAS (-) Không hiện diện trong EaAS

Phân tích sơ bộ thành phần hóa học thực vật của EaAS cho thấy sự hiện diện của ancaloit, flavonoit, tannin, hợp chất phenol, steron và tritecpenoit, saponin, ditecpen, glycosit, protein và axit amin, cacbonhydrat, không có sự hiện diện của dầu và chất béo (bảng 1). Sự hiện diện của các chất trên trong chiết xuất nước vỏ quả *A. squamosa* L. cũng được khẳng định trong kết quả nghiên cứu của Kaladhar và cộng sự (2014) [9], Venkatasathya và cộng sự (2020) [10], Ashok và cộng sự (2013) [11].

3.2. Phản ứng hành vi và ngoại hình chung

Chuột được uống EaAS ở liều cao nhất 7000 mg/kg (độc cấp tính) trong 7 ngày, quan sát đến 14 ngày và 700 mg/kg (độc bán mãn tính) trong 60 ngày, quan sát đến 90 ngày cho thấy không có hiện tượng bất thường đối với phản ứng hành vi của chuột. Quan sát những con chuột được uống EaAS ở các thử nghiệm độc tính cấp tính và bán mãn tính qua đường miệng trong suốt quá trình nghiên cứu cho kết quả bảng 2. Động vật thí nghiệm không có dấu hiệu nhiễm độc hoặc ảnh hưởng lớn nào đến hành vi. Các thông số như bồn chồn, run, di chuyển, lông, quần quai, chảy nước bọt và tử vong không khác biệt nhiều. Dấu hiệu vận động hơi chậm, run nhẹ, v.v. được phát hiện chủ yếu là do hoạt động tập tính của chuột. Các kết quả nghiên cứu cho thấy việc sử dụng liều uống lên đến 7000 mg/kg (cấp tính) và 700 mg/kg (bán mãn tính) không cho thấy bất kỳ triệu chứng nhiễm độc hoặc tử vong nào ở chuột trong suốt thời gian thử nghiệm. Do đó,

LD₅₀ của chiết xuất lớn hơn 7000 mg/kg. Kết quả trên tương tự với nghiên cứu của Farah và cộng sự (2017) [44] khi khảo sát độc tính chiết xuất lá *A. squamosa* L. trên chuột Swiss albino.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chiết xuất nước vỏ quả *A. squamosa* L. đối với chuột thí nghiệm

Phản ứng	Khảo sát độc cấp tính					Khảo sát độc bán mãn tính				
	Đối chứng	1000 mg/kg	3000 mg/kg	5000 mg/kg	7000 mg/kg	Đối chứng	100 mg/kg	300 mg/kg	500 mg/kg	700 mg/kg
Bồn chồn	Nhẹ	Không	Nhẹ	Không	Nhẹ	Không	Nhẹ	Không	Không	Không
Run	Không	Nhẹ	Không	Nhẹ	Không	Nhẹ	Không	Nhẹ	Không	Không
Di chuyển	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Hơi chậm	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Hơi chậm
Lông	Mượt, mềm	Mượt, mềm	Mượt, mềm	Mượt, mềm	Mượt, mềm	Mượt, mềm	Mượt, mềm	Mượt, mềm	Mượt, mềm	Mượt, mềm
Quần quai	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Chảy nước bọt	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Từ vong	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không

3.3. Khối lượng cơ thể và lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ

Sau 7 ngày (cấp tính) và 60 ngày (bán mãn tính) uống EaAS, lượng thức ăn và nước uống tiêu thụ của chuột hàng ngày không bị ảnh hưởng nhiều (bảng 3). Lượng thức ăn tiêu thụ hàng ngày của chuột uống EaAS liều cao có tăng lên so với đối chứng ($4,39 \pm 1,4$ g liều uống 3000 mg/kg so với $4,25 \pm 1,1$ g đối chứng) ($p < 0,01$). Tương tự, lượng nước uống hàng ngày cũng tăng lên ở chuột uống EaAS liều cao so với nhóm đối chứng ($4,83 \pm 1,4$ ml liều uống 5000 mg/kg so với $4,79 \pm 1,3$ ml đối chứng) ($p < 0,05$). Trong khi đó, ở nhóm thử độc tính bán mãn tính sự khác biệt giữa nhóm uống EaAS và nhóm đối chứng không đáng kể (lượng thức ăn $4,51 \pm 1,4$ g/ngày liều uống 300 mg/kg so với $4,47 \pm 1,3$ g/ngày đối chứng và lượng nước uống $4,79 \pm 1,5$ ml/ngày liều uống 300 mg/kg so với $4,85 \pm 1,2$ ml/ngày đối chứng) ($p > 0,05$). Tuy nhiên, lượng thức ăn và nước uống tiêu thụ hàng ngày của chuột vẫn nằm trong giới hạn nhu cầu ăn, uống của chuột Swiss albino bình thường (lượng thức ăn từ $3,1 \pm 0,1$ đến $6,3 \pm 0,3$ g/ngày; lượng nước uống từ $3,9 \pm 0,2$ đến $8,2 \pm 0,3$ ml/ngày) theo kết quả của Alexander và cộng sự (2006) đã nghiên cứu [37]. Điều đó cho thấy rằng EaAS không gây ức chế thèm ăn, không ảnh hưởng có hại đến phát triển, hoạt động sinh lý, trao đổi chất của chuột thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu trên phù hợp với kết luận của Olajide và cộng sự (2016) khi khảo sát độc tính chiết xuất nước vỏ quả *A. muricata* L. trên chuột Swiss albino [45].

Những con chuột được uống EaAS có khối lượng cơ thể đã tăng đáng kể ($p < 0,05$) sau thời gian thử nghiệm (bảng 2.2.3). Ở nhóm đối chứng khối lượng cơ thể của chuột và mức tăng trọng lần lượt là $24,02 \pm 0,8$ g và 0,11% (cấp tính), $27,98 \pm 1,2$ g và 0,59% (bán mãn tính). Đến 14 ngày và 90 ngày sau khi uống EaAS và theo dõi, khối lượng cơ thể với mức tăng trọng của chuột lần lượt là $24,51 \pm 0,8$ và 0,15% (liều uống cấp tính 7000 mg/kg), $28,99 \pm 0,9$ g và 0,71% (liều uống bán mãn tính 700 mg/kg). Sự gia tăng khối lượng cơ thể của chuột sau khi uống EaAS có thể bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của saponin trong chiết xuất. Saponin được chuyển đổi thành sapogenin aglycon (steroid hoặc tritecpen) [46] có tác dụng kích thích các trung tâm nuôi dưỡng trong não chuột làm thay đổi chất dẫn truyền thần kinh ảnh hưởng đến tiêu thụ thực phẩm, chẳng hạn như các tác nhân ảnh hưởng đến hệ thống serotonergic hoặc dopaminergic trung ương, làm tăng cảm giác ngon miệng [49]. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với báo cáo của Andini và cộng sự (2018) khi khảo sát độc tính của chiết xuất lá *A. squamosa* L. trên chuột [16].

Bảng 3. Ảnh hưởng của EaAS đến lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ và khối lượng cơ thể chuột

Thí nghiệm	Lượng thức ăn (g/ngày)	Lượng nước uống (ml/ngày)	Khối lượng cơ thể	
			Khối lượng thực tế (g)	Mức tăng trọng (%)
Thử nghiệm độc cấp tính				
Đối chứng	$4,25^a \pm 1,1$	$4,79^a \pm 1,3$	$24,02^a \pm 0,8$	$0,11^a \pm 0,02$
1000 mg/kg	$4,29^a \pm 0,9$	$4,78^a \pm 1,2$	$24,08^a \pm 0,9$	$0,12^{ab} \pm 0,01$
3000 mg/kg	$4,39^a \pm 1,4$	$4,81^a \pm 1,5$	$24,13^a \pm 1,1$	$0,13^{ab} \pm 0,01$

5000 mg/kg	4,42 ^a ± 1,2	4,83 ^a ± 1,4	24,49 ^a ± 0,7	0,15 ^b ± 0,02
7000 mg/kg	4,41 ^a ± 1,5	4,82 ^a ± 1,2	24,51 ^a ± 0,8	0,15 ^b ± 0,02
Thử nghiệm độc bán mãn tính				
Đôi chứng	4,47 ^a ± 1,3	4,85 ^a ± 1,2	27,98 ^a ± 1,2	0,59 ^a ± 0,01
100 mg/kg	4,49 ^a ± 1,6	4,84 ^a ± 1,4	28,51 ^a ± 0,9	0,61 ^a ± 0,02
300 mg/kg	4,51 ^a ± 1,4	4,79 ^a ± 1,5	28,53 ^a ± 0,8	0,65 ^b ± 0,02
500 mg/kg	4,47 ^a ± 1,2	4,81 ^a ± 1,6	28,98 ^a ± 1,1	0,66 ^b ± 0,01
700 mg/kg	4,48 ^a ± 1,2	4,83 ^a ± 1,3	28,99 ^a ± 0,9	0,71 ^c ± 0,01

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a, b, c trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$).

3.4. Huyết học và sinh hóa máu

Bảng 4. Ảnh hưởng của EaAS đến thành phần huyết học máu ngoại vi chuột thí nghiệm

Thí nghiệm	RBC (x10 ⁶ tb/mm ³)	HGB (g/dl)	PLT (x10 ³ tb/mm ³)	WBC (x10 ³ tb/mm ³)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Granulocytes (%)
Thử nghiệm độc cấp tính							
Đôi chứng	7,79 ^a ± 0,33	11,32 ^a ± 0,73	597,81 ^a ± 35,14	2,61 ^{ab} ± 0,29	40,43 ^a ± 1,41	5,81 ^a ± 0,39	52,76 ^a ± 2,43
1000 mg/kg	7,81 ^a ± 0,29	11,48 ^a ± 0,65	601,29 ^a ± 31,28	2,72 ^b ± 0,36	39,82 ^a ± 2,13	5,94 ^a ± 0,19	54,14 ^a ± 1,99
3000 mg/kg	7,95 ^a ± 0,26	11,87 ^a ± 0,71	642,34 ^{ab} ± 39,24	2,08 ^a ± 0,25	41,64 ^a ± 2,28	6,06 ^a ± 0,25	52,53 ^a ± 2,24
5000 mg/kg	8,17 ^a ± 0,31	12,28 ^a ± 0,81	676,15 ^b ± 41,03	3,15 ^b ± 0,31	39,88 ^a ± 2,31	6,14 ^a ± 0,22	53,98 ^a ± 2,19
7000 mg/kg	8,21 ^a ± 0,29	12,44 ^a ± 0,78	688,42 ^b ± 29,78	3,18 ^b ± 0,38	41,77 ^a ± 1,98	5,84 ^a ± 0,29	52,39 ^a ± 1,98
Thử nghiệm độc bán mãn tính							
Đôi chứng	7,99 ^a ± 0,21	12,12 ^a ± 0,52	603,11 ^a ± 34,22	2,78 ^a ± 0,34	39,92 ^a ± 1,32	5,59 ^a ± 0,23	54,49 ^a ± 2,46
100 mg/kg	8,06 ^a ± 0,32	12,19 ^a ± 0,43	606,23 ^a ± 41,04	2,82 ^a ± 0,41	39,99 ^a ± 1,26	5,77 ^a ± 0,37	54,24 ^a ± 2,55
300 mg/kg	8,25 ^b ± 0,42	12,57 ^a ± 0,38	669,43 ^{ab} ± 35,04	2,98 ^a ± 0,39	40,12 ^a ± 1,35	5,82 ^a ± 1,33	54,06 ^a ± 2,42
500 mg/kg	8,39 ^{ab} ± 0,34	12,66 ^a ± 0,26	684,55 ^b ± 37,32	3,17 ^a ± 0,29	40,74 ^a ± 1,80	5,52 ^a ± 1,49	53,73 ^a ± 1,69
700 mg/kg	8,41 ^{ab} ± 0,22	12,79 ^a ± 0,33	698,26 ^b ± 36,08	3,21 ^a ± 0,24	41,01 ^a ± 1,62	5,62 ^a ± 1,56	53,37 ^a ± 2,61

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a, b trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$).

Các thông số huyết học và sinh hóa máu là những chỉ số quan trọng nhất để ước tính độc tính của chiết xuất. Đó là những chỉ số dùng để đánh giá tình trạng sinh lý và bệnh lý của động vật vì nó phản ánh hoạt động của tủy xương và các tác động nội mạch [47]. Thông qua những biến động về huyết học, sinh hóa của chuột được uống EaAS với liều thử độc cấp tính lên đến 7000 mg/kg/ngày và bán mãn tính lên đến 700 mg/kg/ngày có thể đánh giá được hiệu quả tác động của EaAS.

Kết quả phân tích huyết học cho thấy có sự tăng nhẹ RBC, HGB, PLT, WBC (Bảng 4). Chẳng hạn, sự tăng nhẹ lượng RBC (8,21 ± 0,29 x10⁶tb/mm³ liều uống 7000 mg/kg so với 7,79 ± 0,33 x10⁶tb/mm³ đôi chứng trong thử độc cấp tính; 8,41 ± 0,22 x10⁶tb/mm³ liều uống 700 mg/kg so với 7,99 ± 0,21 x10⁶tb/mm³ đôi chứng trong thử độc bán mãn tính) ($p < 0,05$) (bảng 2.2.4). Sự tăng nhẹ lượng RBC, WBC, PLT gợi ý rằng việc sử dụng EaAS có thể gây ra phản ứng do tác dụng của các hợp chất hoạt tính (hợp chất phenolic, saponin, tannin,...) có mặt trong chiết xuất [48]. Tuy nhiên, hàm lượng huyết học vẫn nằm trong khoảng giới hạn bình thường của chuột Swiss albino theo báo cáo của Reste và cộng sự (2014) [49]. Điều đó chứng tỏ, những thay đổi qua trung gian về huyết học do tác dụng của EaAS là không đáng kể về mặt độc tính.

Kết quả này phù hợp với báo cáo của Andini và cộng sự (2018) khi khảo sát độc tính của chiết xuất lá *A. squamosa* L. trên chuột [16].

Bảng 5. Ảnh hưởng của EaAS đến thành phần sinh hóa máu ngoại vi chuột thí nghiệm

Thí nghiệm	Protein tổng (g/dl)	Glucose (mg/dl)	Tryglicerit (mg/dl)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Creatin (mg/dl)	Urê (mg/dl)
Thử nghiệm độc cấp tính								
Đối chứng	5,98 ^a ± 0,44	62,78 ^a ± 3,22	96,68 ^a ± 5,73	68,99 ^a ± 2,12	97,74 ^a ± 2,22	121,78 ^a ± 5,66	0,47 ^a ± 0,11	11,76 ^a ± 2,22
1000 mg/kg	6,06 ^a ± 0,35	62,94 ^a ± 5,11	97,05 ^a ± 3,99	69,23 ^a ± 2,43	98,26 ^{ab} ± 3,51	128,52 ^{ab} ± 5,92	0,49 ^a ± 0,24	12,68 ^a ± 2,03
3000 mg/kg	6,22 ^a ± 0,28	63,35 ^a ± 4,51	98,75 ^a ± 4,89	70,19 ^a ± 2,32	99,47 ^b ± 2,62	139,33 ^b ± 4,99	0,51 ^a ± 0,33	13,55 ^a ± 2,28
5000 mg/kg	6,61 ^a ± 0,25	63,74 ^a ± 4,33	99,11 ^a ± 4,43	71,44 ^a ± 2,45	101,12 ^{bc} ± 3,11	141,78 ^b ± 4,67	0,55 ^a ± 0,14	13,88 ^a ± 2,45
7000 mg/kg	6,68 ^a ± 0,33	63,97 ^a ± 3,91	99,66 ^a ± 3,56	72,77 ^a ± 2,31	102,76 ^c ± 2,77	142,65 ^b ± 5,02	0,56 ^a ± 0,19	14,19 ^a ± 2,27
Thử nghiệm độc bán mãn tính								
Đối chứng	6,18 ^a ± 0,27	62,45 ^a ± 2,34	95,31 ^a ± 2,42	69,88 ^a ± 2,86	98,18 ^a ± 2,44	125,02 ^b ± 4,89	0,46 ^a ± 0,22	12,06 ^a ± 2,32
100 mg/kg	6,24 ^a ± 0,31	62,81 ^a ± 3,24	96,62 ^a ± 2,73	70,22 ^a ± 1,44	99,23 ^a ± 2,97	128,78 ^b ± 4,39	0,47 ^a ± 0,42	12,51 ^a ± 1,88
300 mg/kg	6,41 ^a ± 0,24	64,31 ^a ± 3,55	97,99 ^a ± 3,55	71,47 ^a ± 2,54	101,37 ^b ± 3,15	138,65 ^c ± 4,66	0,51 ^a ± 0,36	13,38 ^a ± 2,33
500 mg/kg	6,85 ^a ± 0,37	65,19 ^a ± 2,44	99,01 ^a ± 4,25	72,88 ^a ± 2,71	102,51 ^{bc} ± 2,88	142,59 ^a ± 5,12	0,55 ^a ± 0,41	14,16 ^a ± 2,54
700 mg/kg	6,89 ^a ± 0,39	65,85 ^a ± 3,61	99,62 ^a ± 2,67	72,97 ^a ± 2,62	104,06 ^c ± 2,77	145,13 ^c ± 5,26	0,56 ^a ± 0,12	14,77 ^a ± 2,68

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a, b, c trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Các thông số sinh hóa huyết thanh có ý nghĩa chẩn đoán trong đánh giá lâm sàng về tình trạng sức khỏe động vật. Khảo sát biến động của các thông số ALT, AST và ALP trong huyết thanh chuột nhằm đánh giá hoạt động của gan [50]. Sau khi được uống EaAS, lượng ALT, AST và ALP có biểu hiện tăng nhẹ (chẳng hạn ALT ($72,77 \pm 2,3$ U/L nhóm 7000 mg/kg so với $68,99 \pm 2,12$ U/L nhóm đối chứng trong thử độc cấp tính; $72,97 \pm 2,62$ nhóm 700 mg/kg so với $69,88 \pm 2,86$ U/L nhóm đối chứng trong thử độc bán mãn tính) ($P < 0,05$) (Bảng 5). Sự tăng nhẹ ALT, AST và ALP được quan sát cho thấy rằng EaAS không có tác dụng gây độc cho gan. Đó là kết quả của việc ổn định màng sinh chất do bảo tồn tính toàn vẹn cấu trúc của tế bào cũng như sửa chữa các tổn thương mô gan [51]. Biến động về hàm lượng protein, glucose, triglycerit trong huyết thanh phản ánh tình trạng dinh dưỡng và thường được sử dụng để chẩn đoán các trạng thái bệnh lý của tim, thận, gan, dạ dày [50]. Sự thay đổi không đáng kể về tổng lượng protein [$6,89 \pm 0,39$ (700 mg/kg) so với $6,18 \pm 0,27$ g/dl (đối chứng) thử độc bán mãn tính], lượng glucose [$63,97 \pm 3,91$ (7000 mg/kg) so với $62,78 \pm 3,22$ mg/dl (đối chứng) thử độc cấp tính] ($p > 0,05$) ở chuột được uống không cho thấy có dấu hiệu EaAS làm suy giảm chức năng tim, thận, gan, dạ dày [52]. Urê và creatin là hai chất hóa học quan trọng trong máu giúp đánh giá tỷ lệ lọc cầu thận và chức năng thận. Urê là sản phẩm cuối cùng trong quá trình chuyển hóa các hợp chất chứa nitơ. Urê được lọc qua thận vào nước tiểu dưới dạng chất thải. Creatin là sản phẩm phân hủy của creatin photphat trong cơ và được bài tiết qua thận cùng với các phế phẩm khác. Sự cân bằng của nồng độ creatin giữa quá trình bài tiết được thận duy trì với tốc độ khá ổn định [53]. Lượng urê và creatin của chuột sau khi uống EaAS khác biệt không lớn so với nhóm đối chứng. Mức hiển thị các thông số huyết học và sinh hóa máu chuột trong thử nghiệm độc tính cấp và bán mãn tính đều nằm trong chế độ kiểm soát, không vượt ngoài khoảng giới hạn về tỷ lệ huyết học và sinh hóa máu ở chuột Swiss albino bình thường [54]. Đồng thời kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với báo cáo của Onwusonye và cộng sự (2014) khi khảo sát độc tính chiết xuất nước lá *A. squamosa* L. trên chuột Swiss albino [55].

3.5. Khối lượng cơ quan

Bảng 6. Ảnh hưởng của EaAS đến khối lượng cơ quan chuột thí nghiệm

Thí nghiệm	Khối lượng tim		Khối lượng gan		Khối lượng thận		Khối lượng dạ dày	
	M (g)	ROW (%)	M (g)	ROW (%)	M (g)	ROW (%)	M (g)	ROW (%)
Thử nghiệm độc cấp tính								
Đối chứng	0,17 ^a ± 0,01	0,69 ^a ± 0,02	1,14 ^a ± 0,3	4,75 ^a ± 0,13	0,25 ^a ± 0,03	1,05 ^a ± 0,02	0,65 ^a ± 0,14	2,69 ^a ± 0,14
1000 mg/kg	0,16 ^a ± 0,03	0,67 ^a ± 0,04	1,14 ^a ± 0,2	4,72 ^a ± 0,22	0,26 ^a ± 0,04	1,09 ^a ± 0,04	0,66 ^a ± 0,13	2,78 ^a ± 0,12
3000 mg/kg	0,17 ^a ± 0,04	0,71 ^a ± 0,05	1,16 ^a ± 0,5	4,79 ^a ± 0,14	0,27 ^a ± 0,03	1,11 ^a ± 0,03	0,68 ^a ± 0,14	2,81 ^a ± 0,18
5000 mg/kg	0,17 ^a ± 0,03	0,69 ^a ± 0,03	1,23 ^a ± 0,4	5,02 ^a ± 0,23	0,28 ^a ± 0,05	1,15 ^a ± 0,02	0,71 ^a ± 0,11	2,87 ^a ± 0,17
7000 mg/kg	0,18 ^a ± 0,05	0,72 ^a ± 0,02	1,24 ^a ± 0,5	5,04 ^a ± 0,21	0,27 ^a ± 0,04	1,12 ^a ± 0,05	0,71 ^a ± 0,13	2,88 ^a ± 0,11
Thử nghiệm độc bán mãn tính								
Đối chứng	0,21 ^a ± 0,05	0,73 ^a ± 0,04	1,31 ^a ± 0,17	4,69 ^a ± 0,23	0,29 ^a ± 0,06	1,07 ^a ± 0,01	0,83 ^a ± 0,18	2,96 ^a ± 0,17
100 mg/kg	0,23 ^a ± 0,03	0,79 ^b ± 0,03	1,34 ^a ± 0,11	4,71 ^a ± 0,18	0,31 ^a ± 0,04	1,09 ^a ± 0,04	0,85 ^a ± 0,16	2,97 ^a ± 0,22
300 mg/kg	0,24 ^a ± 0,02	0,83 ^{bc} ± 0,02	1,34 ^a ± 0,14	4,79 ^a ± 0,16	0,32 ^a ± 0,05	1,11 ^a ± 0,03	0,85 ^a ± 0,14	2,99 ^a ± 0,19
500 mg/kg	0,26 ^a ± 0,04	0,88 ^{cd} ± 0,05	1,39 ^a ± 0,17	4,82 ^a ± 0,31	0,34 ^a ± 0,04	1,19 ^b ± 0,06	0,86 ^a ± 0,15	3,02 ^a ± 0,09
700 mg/kg	0,26 ^a ± 0,02	0,89 ^d ± 0,03	1,41 ^a ± 0,15	4,85 ^a ± 0,22	0,35 ^a ± 0,03	1,22 ^b ± 0,05	0,87 ^a ± 0,17	3,01 ^a ± 0,17

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Sự thay đổi khối lượng nội tạng là một chỉ số nhạy cảm để đánh giá khả năng gây độc của chiết xuất thảo dược [56]. Tim, gan, thận và dạ dày đóng vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất. Chức năng quan trọng của các cơ quan này khiến chúng trở thành đối tượng thường xuyên bị các hợp chất độc hại tấn công [57]. Trong nghiên cứu này, khối lượng tuyệt đối và tương đối của tim, gan, thận và dạ dày được ghi nhận lúc giải phẫu chuột thí nghiệm (Bảng 6) ở nhóm được uống EaAS khác biệt không lớn so với nhóm đối chứng. Khối lượng tương đối của các cơ quan tăng nhẹ [tim 0,72% (7000 mg/kg) so với 0,69% (đối chứng); gan 4,85% (700 mg/kg) so với 4,69% (đối chứng); thận 1,12% (7000 mg/kg) so với 1,05% (đối chứng); dạ dày 2,88% (700 mg/kg) so với 2,69% (đối chứng)]. Những thay đổi này không tương quan với liều lượng EaAS chuột được uống và nằm trong giới hạn bình thường [52]. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Andini và cộng sự (2018) khi khảo sát độc tính của chiết xuất lá *A. squamosa* L. trên chuột [19].

3.6. Phân tích nước tiểu

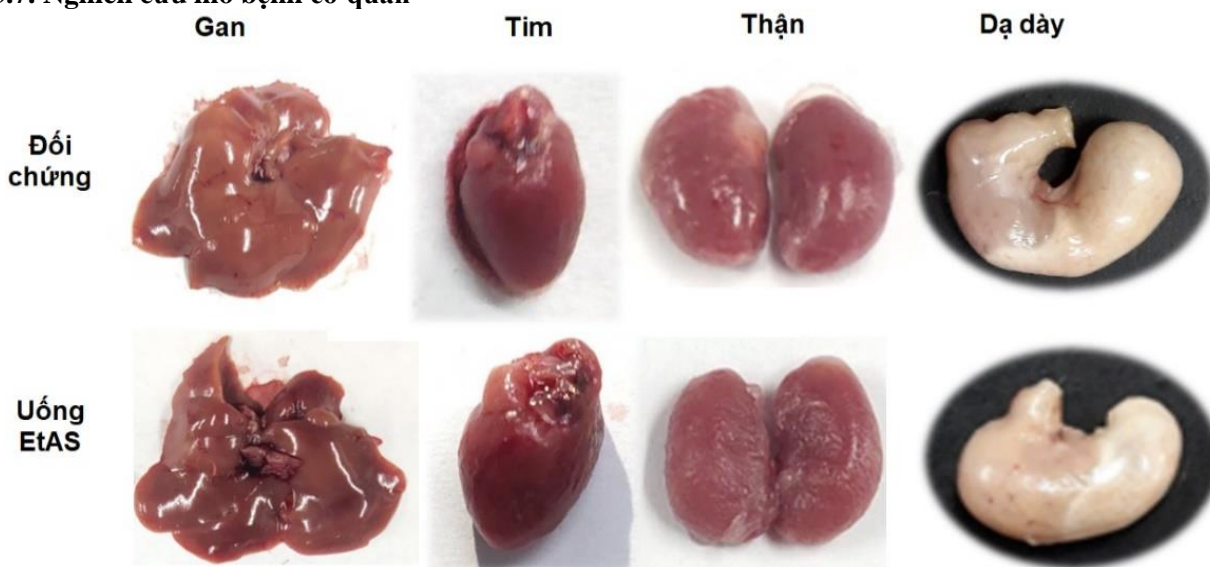
Việc xác định thành phần nước tiểu có tầm quan trọng lớn trong nghiên cứu chẩn đoán và chuyển hóa các chất [27]. Không có sự khác biệt về khối lượng riêng, pH hoặc khác biệt không đáng kể về thể tích nước tiểu giữa các nhóm được uống EaAS và nhóm đối chứng (bảng 7). Khi kết thúc uống EaAS và theo dõi đến 14 ngày, giá trị pH của nước tiểu chuột ở nhóm EaAS liều uống 3000 mg/kg ($6,8 \pm 0,4$) thấp hơn so với nhóm đối chứng ($6,9 \pm 0,3$) ($p < 0,05$) trong thử độc cấp tính. Kết thúc 90 ngày uống EaAS và theo dõi, giá trị pH của nước tiểu chuột ở nhóm liều uống 500 mg/kg ($7,0 \pm 0,1$) cao hơn so với nhóm đối chứng ($6,9 \pm 0,4$) ($p < 0,05$) trong thử độc bán mãn tính. Tuy nhiên, những thay đổi của các thông số trên có thể là kết quả dương tính giả do màu của các chất chuyển hóa trong chiết xuất làm nhiều màu của nước tiểu [42]. Đồng thời, không có sự khác biệt về pH nước tiểu ở các nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng. Vì vậy, những thay đổi này không thể hiện ý nghĩa độc tính của EaAS. Các thông số tiết niệu khác không có thay đổi rõ ràng hoặc không xuất hiện trong toàn bộ thí nghiệm. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của El Banna và cộng sự (2020) khi khảo sát độc tính chiết xuất nước lá và hạt *A. squamosa* L. trên chuột [15].

Bảng 7. Ảnh hưởng của EaAS đến thành phần nước tiểu chuột thí nghiệm

Thí nghiệm	Thể tích (ml)	Trọng lượng riêng	pH	Glucose (mg/dl)	Protein (mg/dl)	Thể xeton (mg/dl)	Tế bào máu (Tế bào/ μ l)
Thử nghiệm độc cấp tính							
Đối chứng	17,6 ^a ± 3,2	1,011 ^a ± 0,002	6,9 ^a ± 0,03	Không	Không	Không	Không
1000 mg/kg	17,3 ^a ± 6,5	1,012 ^a ± 0,001	6,9 ^a ± 0,01	Không	Không	Không	Không
3000 mg/kg	16,8 ^a ± 4,5	1,013 ^a ± 0,003	6,8 ^a ± 0,02	Không	Không	Không	Không
5000 mg/kg	16,6 ^a ± 5,7	1,014 ^a ± 0,004	6,9 ^a ± 0,03	Không	Không	Không	Không
7000 mg/kg	16,7 ^a ± 7,1	1,014 ^a ± 0,001	6,9 ^a ± 0,02	Không	Không	Không	Không
Thử nghiệm độc bán mãn tính							
Đối chứng	16,2 ^a ± 5,3	1,012 ^a ± 0,005	6,9 ^a ± 0,04	Không	Không	Không	Không
100 mg/kg	16,1 ^a ± 6,2	1,012 ^a ± 0,003	6,9 ^a ± 0,03	Không	Không	Không	Không
300 mg/kg	15,9 ^a ± 4,9	1,013 ^a ± 0,002	6,9 ^a ± 0,02	Không	Không	Không	Không
500 mg/kg	15,8 ^a ± 3,1	1,013 ^a ± 0,004	7,0 ^a ± 0,01	Không	Không	Không	Không
700 mg/kg	15,6 ^a ± 6,4	1,014 ^a ± 0,001	6,9 ^a ± 0,02	Không	Không	Không	Không

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái a trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

3.7. Nghiên cứu mô bệnh cơ quan

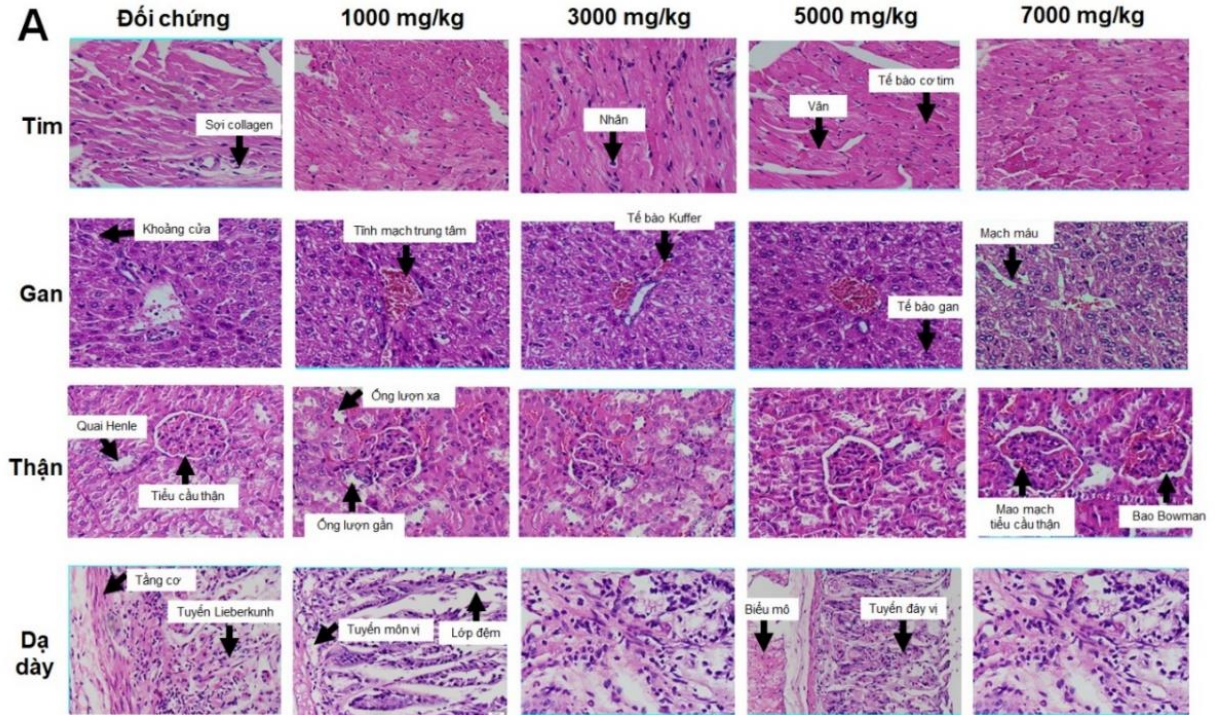


Hình 2. Hình thái ngoài tim, gan, thận và dạ dày của chuột thí nghiệm

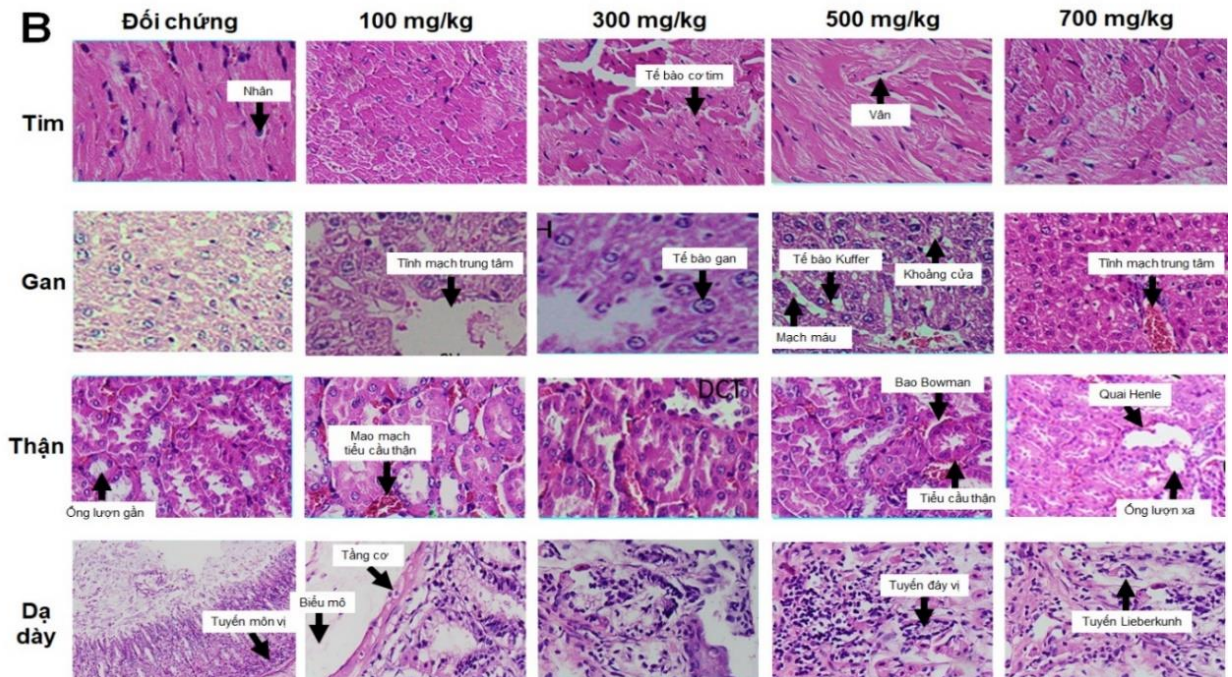
Kiểm tra vĩ mô đối với tất cả các cơ quan nội tạng như dạ dày, ruột non, ruột già, lá lách, gan, tim và thận không tìm thấy bất kỳ thay đổi nào về vị trí, hình dạng, kích thước, màu sắc, kết cấu tổng thể khi so sánh với các cơ quan của nhóm uống EaAS và nhóm đối chứng. Hình dạng, kích thước, màu sắc của cơ quan như gan, tim, thận, dạ dày của nhóm đối chứng và nhóm uống EaAS (hình 2.2.1) cũng không có khác biệt. Tim chuột có màu đỏ hồng, rắn chắc, hình tháp 3 mặt, rãnh nhĩ thất rất rõ phân chia tâm nhĩ và tâm thất. Gan có hình tam giác gồm mặt hoành lồi, mặt tạng phẳng và một bờ chu vi quây quanh mặt tạng là bờ dưới. Mặt hoành của gan có hình vòm, nhẵn, áp sát vào cơ hoành, mặt tạng có hai rãnh dọc và một rãnh ngang hình chữ H chia mặt dưới gan thành các thùy. Thận có màu nâu đỏ, bề mặt trơn láng nhờ được bọc trong một bao xơ, hình hạt đậu. Dạ dày có hình chữ J, lớp thanh mạc bao bọc dạ dày có màu hồng nhạt, bờ cong vị lớn và bé không biến đổi, thân dạ dày chiếm diện tích lớn

Các nghiên cứu mô học cho thấy không có bất thường trong mô gan, thận, tim, dạ dày ở những con chuột được uống EaAS với liều lượng cấp tính và bán mãn tính so với nhóm chuột đối chứng (Hình 3 và 4). Các tế bào gan, khoảng cửa và mạch máu có cấu trúc bình thường, có hình khối đa diện bao bọc bởi màng tế bào, giữa là nhân được bao bọc bởi màng nhân, phân biệt rõ với phần tế bào chất. Các tế bào nội mô hình “hạt đậu”, bắt màu đậm hơn, bám vào thành mao mạch, lan tỏa giữa các tế bào gan, các tế bào nội mô có

số lượng ít hơn nhiều so với số lượng các tế bào gan. Tĩnh mạch trung tâm có lòng rộng hơn động mạch gan, hình dạng không đều, thành mỏng, được lợp bởi các tế bào nội mô, phía ngoài là một áo xơ, các bề gan và tiểu thùy gan không thay đổi về cấu trúc. Ở mỗi nephron các tiểu cầu thận, ống lượn gần, ống lượn xa, quai Henle đều có cấu tạo bình thường. Bao Bowman của tiểu cầu thận hình chén với lớp biểu mô trong (lớp tạng) có các tế bào có chân ôm lấy các mao mạch của chùm mao mạch tiểu cầu thận, lớp ngoài (lớp thành) được lót bởi biểu mô lát đơn. Tiểu cầu thận có cấu trúc bình thường, các ống thận đều rõ cấu trúc, tế bào biểu mô ống thận bình thường, khe thận hẹp, mao mạch máu thành mỏng, tế bào nội mô rõ.



Hình 3. Mô bệnh học tim, gan, thận và dạ dày (H&E, 200x) của chuột thí nghiệm độc cấp tính sau 14 ngày



Hình 4. Mô bệnh học tim, gan, thận và dạ dày (H&E, 200x) của chuột thí nghiệm độc bán mãn tính sau 90 ngày

Mô tim có lớp nội tâm mạc với lớp nội mô và dưới nội mô mỏng chứa sợi collagen, sợi chun và nguyên bào sợi. Cơ tim nối với nhau thành lưới chạy theo hướng xoắn ốc. Trong tam giác xơ có các tiểu đảo sụn gồm tế bào sụn hình cầu vùi trong chất nền. Mô niêm mạc dạ dày có lớp biểu bì và lớp đệm. Lớp đệm với các dải mô liên kết mỏng nằm xen giữa các tuyến (tuyến Lieberkühn, môn vị và đáy). Tầng cơ có 3 lớp cơ trơn, lớp ngoài là bó sợi cơ trơn hướng dọc, lớp giữa là bó sợi hướng vòng và lớp trong hướng chéo. Kết quả nghiên cứu mô bệnh học chỉ ra rằng EaAS không có bất kỳ tác dụng phụ nào làm thay đổi hình thái mô. Kết quả nghiên cứu phù hợp với báo cáo của Andini và cộng sự (2019) [16] và Onwusonye và cộng sự (2014) [55] khi khảo sát độc tính chiết xuất lá *A. squamosa* L. trên chuột.

4. KẾT LUẬN

Chiết xuất nước vỏ quả *A. squamosa* L. (EaAS) không tạo ra tác dụng phụ đối với hành vi và bệnh lý tổng quát của chuột ở các liều điều trị. Do đó, LD₅₀ qua đường miệng của EaAS lớn hơn 7000 mg/kg. Trong khi đó, nghiên cứu độc tính bán mãn tính cho kết quả EaAS không ảnh hưởng xấu đến khối lượng cơ thể, khối lượng và mô bệnh học tim, gan, thận, dạ dày, các thông số huyết học, sinh hóa máu, nước tiểu ở các liều thử nghiệm. Không có dấu hiệu nhiễm độc nào được quan sát thấy ở chuột thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp tính và bán mãn tính đã thể hiện được bức tranh rõ ràng về sự an toàn của chiết xuất nước vỏ quả *A. squamosa* L.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự từ Khoa Huyết học và Sinh hóa, Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện 175 Tp.HCM, Viện Pasteur Tp.HCM, Phòng Thí nghiệm Công nghệ Động vật Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp.HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong dự án này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Bhattacharya, R. Chakraverty, "The pharmacological properties of *Annona squamosa* Linn: A Review", *Int J Pharm Eng*, 4(2), 692-699, 2016.
- [2]. C. Ma, et al., "A review on *Annona squamosa* L.: phytochemicals and biological activities", *The American journal of Chinese medicine*, 45(5), 933-964, 2017. DOI: 10.1142/S0192415X17500501.
- [3]. D. S. Wang, et al., "*Annona squamosa* Linn: cytotoxic activity found in leaf extract against human tumor cell lines", *Pak J Pharm Sci*, 27(5), 1559-1563, 2014.
- [4]. R. Al-Nemari, et al., "Selective Cytotoxic Effects of *Annona Squamosa* Leaves against Breast Cancer Cells via Apoptotic Signaling Proteins", *Medicine & pharmacology*, 9, 1-14, 2020. doi: 10.20944/preprints202005.0212.v1.
- [5]. N. Pandey, D. Barve, "Pharmacological and phytochemical review on *Annona squamosa*", *Int J Res Pharm Bio Med Sci*, 2(4), 1404-1414, 2011. ISSN: 2229-3701.
- [6]. N. Rowe, T. Speck, "Plant growth forms: an ecological and evolutionary perspective", *New phytologist*, 166(1), 61-72, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01309.x>.
- [7]. R. Bentley, H. Trimen, "Medicinal plants: Being descriptions with original figures of the principal plants employed in medicine and an account of the characters, properties, and uses of their parts and products of medicinal value", *Biodiversity Heritage Library*, 1, 1-18. DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.33542>.
- [8]. M. E. Gonzalez-Trujano, et al., "Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity", *Epilepsia*, 47(11), 10 - 18, 2006. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2006.00827.x.
- [9]. D. Kaladhar, G. R. Duddukuri, N. S. Yarla, "Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities from raw fruits peel crude extracts of *Annona squamosa* Linn", *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 1373-1380, 2014.
- [10]. V. S. A. R. Velaga, et al., "Analgesic activity of *Annona squamosa* Linn fruit peels on Swiss Albino mice", *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(7), 3199-3204, 2020. DOI: 10.5958/0974-360X.2020.00566.1.

- [11]. A. Sharma, et al., "Preliminary phytochemical screening of fruit peel extracts of *Annona squamosa* Linn", *Journal of current pharma research*, 4(1), 1038 - 1048, 2013.
- [12]. Nandhakumar, E. and P. "Indumathi, In vitro antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp", *Journal of acupuncture and meridian studies*, 6(3), 142 - 148, 2013. DOI: 10.1016/j.jams.2012.09.002.
- [13]. G. Madhumitha, et al., "Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites", *Parasitology research*, 111(5), 2189 - 2199, 2012. DOI: 10.1007/s00436-011-2671-2.
- [14]. S. Dahanukar, R. Kulkarni, N. Rege, "Pharmacology of medicinal plants and natural products", *Indian journal of pharmacology*, 32(4), S81-S118, 2000.
- [15]. H. El Banna, et al., "Some pharmacological and toxicological activities of *Annona squamosa* linn. Ethanolic extract", *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5(12), 188 - 202, 2016. DOI:10.20959/wjpps201612-8147.
- [16]. A. D. Utami, "Study on Acute Oral Toxicity of Ethanolic Extract of *Annonasquamosa* Leaves in Mice (*Musmusculus*)", *Indonesian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 1(1), 56-63, 2018. DOI: <https://doi.org/10.32734/ijdjpcr.v1i1.205>.
- [17]. A. Harborne, "*Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*", Springer science & business media, 1998.
- [18]. K. S. Banu, L. Cathrine, "General techniques involved in phytochemical analysis", *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 2(4), 25 - 32, 2015. ISSN 2349-0403.
- [19]. G. O. De Silva, A. T. Abeysundara, M. M. W. Aponso, "Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants", *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 5(2), 29 - 32, 2017. ISSN: 2321-9114.
- [20]. M. Saxena, et al., "Phytochemistry of medicinal plants", *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, vol. 1(6), 168 - 182, 2013.
- [21]. N. Raaman, *Phytochemical techniques*, New India Publishing, 2006.
- [22]. T. Prashant, et al., "Phytochemical screening and extraction: A review", *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 98 - 106, 2011.
- [23]. A. Kumar, et al., "Preliminary phytochemical analysis of leaf and bark (mixture) extract of *Ficus infectoria* plant", *The pharma innovation*, 1(5), 71 - 79, 2012. ISSN: 2277- 7695.
- [24]. W. C. Evans, *Trease and evans' pharmacognosy E-book*, Elsevier Health Sciences, 2009.
- [25]. K. R. Khandelwal, *Practical pharmacognosy*, Pragati Books Pvt. Ltd, 2008.
- [26]. M. Kifayatullah, et al., "Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice", *Journal of Acute Disease*, 4(4), 309 - 315, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.joad.2015.06.010>.
- [27]. E. H. Han, et al., "An oral toxicity test in rats and a genotoxicity study of extracts from the stems of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*", *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 1 - 10, 2019. DOI: 10.1186/s12906-019-2442-7.
- [28]. U. Albus, "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn)*", SAGE Publications Sage UK: London, England, 2012.

- [29]. M. D. Goodyear, K. Krleza-Jeric, T. Lemmens, "The declaration of Helsinki", British Medical Journal Publishing Group, 2007.
- [30]. W. H. Organization, "WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems", World Health Organization, 2004.
- [31]. O. f. E. Co-operation, and Development, "Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents", OECD Publishing, 1998.
- [32]. Bộ Y tế, Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo, "Quyết định về việc ban hành tài liệu chuyên môn "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu", Bộ Y tế, Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo, 2015.
- [33]. M. d. P. Olaya, et al., "Evaluation of the acute and subchronic oral toxicity of ethanol extract from *Valeriana pannonii* species in Wistar rats", *Colombia Médica*, 41(3), 256 - 266, 2010. ISSN 1657-9534.
- [34]. M. Jonsson, et al., "Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin", *Food and chemical toxicology*, 53, 27 - 32, 2013. DOI: 10.1016/j.fct.2012.11.023.
- [35]. A. A. Bachmanov, et al., "Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains", *Behavior genetics*, 32(6), 435 - 443, 2002. DOI: 10.1023/a:1020884312053.
- [36]. S. H. Webster, E. J. Liljegren, "Organ: Body- weight ratios for certain organs of laboratory animals. III. White Swiss mouse", *American Journal of Anatomy*, 97(1), 129 - 153, 1955. <https://doi.org/10.1002/aja.1000970105>.
- [37]. K. Yamasaki, et al., "Subacute oral toxicity study of ethynylestradiol and bisphenol A, based on the draft protocol for the Enhanced OECD Test Guideline no. 407", *Archives of toxicology*, 76(2), 65 - 74, 2002. DOI: 10.1007/s00204-001-0319-1.
- [38]. C. J. Ugwah-Oguejiofor, et al., "Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* NE Brown in mice and rats", *Heliyon*, 5(1), e01179, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01179>.
- [39]. P. Upadhyay, et al., "Toxicity assessment of the alcoholic leaves extract of *Reinwardtia indica*", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, e18224, 2019. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000118224>.
- [40]. W. K. Abotsi, et al., "Acute and sub-acute toxicity studies of the ethanolic extract of the aerial parts of *Hillieria latifolia* (Lam.) H. Walt. (Phytolaccaceae) in rodents", *West African Journal of Pharmacy*, 22(1), 27 - 35, 2011.
- [41]. H. Tabarraei, et al., "Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the black caraway seed essential oil in Wistar rats", *Toxicology reports*, 6, 869 - 874, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.010>.
- [42]. Y. Yan, et al., "Toxicity study of ethanol extract from *Oroxylum indicum* (L.) Vent in rats", *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 38(5), 714 - 725, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0254-6272\(18\)30910-5](https://doi.org/10.1016/S0254-6272(18)30910-5).
- [43]. Y. Chen, et al., "Acute and chronic toxicity of a polyherbal preparation–Jueyin granules", *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 1 - 13, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2211-z.
- [44]. F. Saeed, M. Ahmad, "Anti-diabetic and acute toxicity studies of *Annona squamosa* L. ethanolic leaves extract", *International Journal of Phytomedicine*, 9(6), 642 - 647, 2017. DOI:10.5138/09750185.2182.
- [45]. O. S. Faleye, E. O. Dada, "Effects of ethanol extract of unripe *Annona Muricata* (L.) fruits on the Haematological and Histopathological parameters in Swiss albino rats infected with salmonella Typhi", *Journal of Pharmaceutical Research International*, 9(1), 1-13, 2016. DOI: 10.9734/BJPR/2016/19971.
- [46]. F. Abdulrahman, *Studies on the chemical contents and pharmacological activities of the root-bark extract of Vitex doniana (Black Plum)*, D Thesis, University of Maiduguri, Nigeia, 2004.
- [47]. G. L. Voigt, S. L. Swist, *Hematology techniques and concepts for veterinary technicians*, John Wiley & Sons, 2011.

- [48]. A. El-Ishaq, et al., "Biochemical and toxicological effects of methanolic extract of *Asparagus africanus* Lam in Sprague-Dawley rats", *Biochemistry, biophysics and molecular biology*, 8, e9138, 2020. DOI 10.7717/peerj.9138.
- [49]. T. I. Restell, et al., "Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages", *Acta cirurgica brasileira*, 29(5), 306 - 312, 2014. DOI:10.1590/S0102-86502014000500004.
- [50]. L. Pari, P. Murugan, "Protective role of tetrahydrocurcumin against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity", *Pharmacological research*, 49(5), 481 - 486, 2004.
- [51]. D. W. Cockcroft, "Direct challenge tests: airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance", *Chest*, 138(2), 18S - 24S, 2010. DOI: 10.1378/chest.10-0088.
- [52]. T. Thierry, et al., "Subacute toxicity study of the aqueous extract from *Acanthus montanus*", *Electronic Journal of Biology*, 7(1), 11 - 15, 2011.
- [53]. R. Yudhani, et al. "Renal Function Parameter on Acute Toxicity Test of Kapulaga (*Amomum cardamom*) Seed Extract in Rat", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1 - 6, 2019. DOI:10.1088/1757-899X/578/1/012053.
- [54]. S. Wolford, et al., "Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals", *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 18(2), 161 - 188, 1986. DOI: 10.1080/15287398609530859.
- [55]. J. Onwusonye, et al., "Acute and sub-acute toxicity studies of methanol leaf extracts of *Annona squamosa* Linn. In mice", *Sky J Biochem Res*, 3(7), 53 - 59, 2014. ISSN 2315-8786
- [56]. J. Kim, et al., "Subacute toxicity evaluation of a new camptothecin anticancer agent CKD-602 administered by intravenous injection to rats", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 40(3), 356-369, 2004. DOI: 10.1016/j.yrtph.2004.09.002.
- [57]. M. Leach, "Interpretation of the full blood count in systemic disease--a guide for the physician", *JR Coll Physicians Edinb*, 44(1), 36 - 41, 2014. DOI: 10.4997/JRCPE.2014.109.

Ngày nhận bài: 03/02/2021

Ngày chấp nhận đăng: 09/06/2021