

NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN MÃN TÍNH CHIẾT XUẤT ETHANOL THÔ CỦA QUẢ *Caryota urens* L. (CỌ ĐUÔI CÁ) TRÊN CHUỘT SWISS ALBINO

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG

Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh
tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v59i05.4595>

Tóm tắt. *Caryota urens* L. phân bố rộng rãi ở các vùng rừng núi Việt Nam. Quả *C. urens* chứa các hợp chất như ancaloit, flavonoid, phenol, cacbonhydrat ... có tác dụng điều trị loét dạ dày, đau nửa đầu, viêm khớp ... Nghiên cứu này nhằm đánh giá tính an toàn của chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* (EtCU) trên chuột Swiss albino qua thử nghiệm độc cấp và bán mãn tính. Thử nghiệm độc cấp tính, chuột được uống các liều 1000, 3000, 5000 mg EtCU/kg một lần duy nhất, theo dõi liên tục trong 4h đầu tiên kể từ sau khi uống, không liên tục đến 24h, và theo dõi hàng ngày trong 14 ngày. Những hành vi bất thường, các triệu chứng nhiễm độc và tử vong được quan sát. Thử nghiệm độc bán mãn tính, chuột được uống EtCU với liều 100, 300, và 500 mg EtCU/kg trong 90 ngày. EtCU không gây ra sự khác biệt đáng kể về lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ, khối lượng cơ thể, thành phần nước tiểu, huyết học, sinh hóa, khối lượng tương đối và mô học gan, thận so với đối chứng. Kết quả chỉ ra rằng EtCU không gây độc cấp tính (1000-5000 mg/kg) hoặc bán mãn tính (100-500 mg/kg) ở chuột.

Từ khóa: *Caryota urens* L., độc tính cấp và bán mãn tính, Swiss albino

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, nhiều loại thảo dược đang được sử dụng trong điều trị các bệnh khác nhau do chi phí thấp, phù hợp với khả năng chi trả, an toàn và hiệu quả cao [1]. Bên cạnh đó, việc sử dụng thuốc thảo dược trong điều trị bệnh ngày một tăng bởi vì niềm tin mạnh mẽ rằng các sản phẩm thảo dược là tự nhiên, an toàn và không gây độc [2]. Tuy nhiên, các chế phẩm thảo dược được cho là an toàn có thể chứa chất gây ô nhiễm, gây độc, ... cho cơ thể [3] do cách thức chế biến hoặc thu nhận [4, 5]. Chính vì vậy, sản phẩm dược liệu trước khi đưa vào sử dụng cần được nghiên cứu, khảo sát tác dụng phụ bất lợi hoặc độc tính [6].

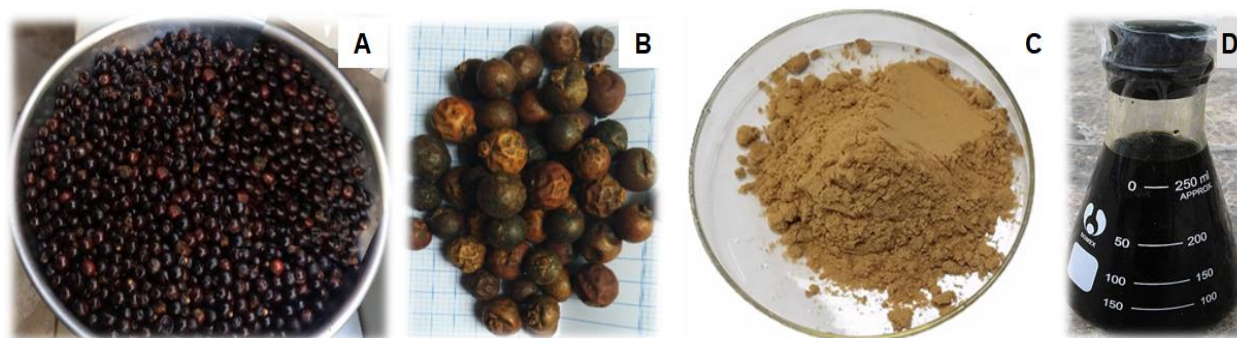
Caryota urens L. (hay còn gọi là cây cọ đuôi cá) là một loài cây thuộc họ Arecaceae, được trồng nhiều ở các nước Châu Á như Ấn Độ, Miến Điện, Myanmar và một số đảo thuộc Sri Lanka [7]. Ở Việt Nam cây *C. urens* phân bố nhiều ở các vùng núi Bắc và Trung bộ [8]. Nhựa của cây *C. urens* có vị ngọt tự nhiên, vì vậy được sử dụng để sản xuất đường (đường thốt nốt) và làm rượu [9]. *C. urens* được biết đến với vai trò y học và thuốc cổ truyền như nước ép quả được sử dụng điều trị yếu tinh trùng và rối loạn tiết niệu; hoa *C. urens* được dùng để chữa viêm loét dạ dày, đau nhức đầu [10]; rễ và bẹ có thể điều trị thấp khớp, rắn cắn; vỏ cây và hạt được dùng để chữa mụn nhọt [11]. Y học cổ truyền khuyến cáo hoa của *C. urens* được sử dụng cải thiện tóc. Chiết xuất lá của *C. urens* nổi tiếng với hoạt động chống oxy hóa. Chiết xuất quả *C. urens* có hoạt tính kháng khuẩn, chống viêm, điều trị thấp khớp, viêm loét dạ dày... [12]. *C. urens* là một loại thảo dược tiềm năng với nhiều công dụng trong y học cổ truyền. Tuy nhiên, tính an toàn *in vivo* của chiết xuất quả *C. urens* vẫn chưa được khẳng định. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là đánh giá độc cấp và bán mãn tính của EtCU trên chuột Swiss albino nhằm khẳng định tính an toàn của chiết xuất quả *C. urens* làm cơ sở cho các nghiên cứu và ứng dụng tiếp theo về tác dụng của chiết xuất quả *C. urens* trong điều trị các bệnh như viêm khớp dạng thấp, viêm dạ dày....

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu thực vật

C. urens thu hái tại Tây Giang, Quảng Nam. Mẫu chứng được lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh. Quả *C. urens* 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 quả *C. urens* được đóng gói chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* (EtCU)

A. Quả *C. urens* tươi; B. Quả *C. urens* khô; C. Bột quả *C. urens*; D. EtCU

Chuẩn bị chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* (EtCU): Quy trình chiết xuất được thực bằng cách sử dụng máy vi sóng (Sanyo, Nhật Bản). Bột quả được chiết bằng ethanol 60%, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 25/1 (v/w), 5 phút và công suất vi sóng là 214 W. Thu lấy dịch chiết và lọc qua giấy Whatman số 4. Phần dịch lọc cuối cùng được cô đặc ở áp suất (130 mmBar), 60°C. Chiết xuất ethanol thô từ quả *C. urens* (EtCU) sau đó được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo [13].

2.2. Phân tích định tính hóa thực vật

Phân tích định tính hóa thực vật được thực hiện để xác định các hợp chất có hoạt tính hiện diện trong chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn sau: *Nhận dạng tannin*: 1 ml EtCU, thêm 2 ml clorua sắt 5%. Hình thành màu xanh đậm hoặc xanh lục đen cho thấy sự hiện diện của tannin [14]. *Nhận dạng phlobatannin*: Thêm vài giọt HCl 2% vào 1ml EtCU. Xuất hiện kết tủa màu đỏ chứng tỏ sự có mặt của phlobatannin [14]. *Nhận dạng saponin*: 2 ml EtCU, 2 ml nước cất được thêm vào và lắc trong ống đong chia độ trong 15 giây theo chiều dọc. Hình thành lớp bọt dày 1cm cho thấy sự hiện diện của saponin [14]. *Nhận dạng steroid*: trộn 1 ml EtCU và 1ml chloroform, sau đó thêm vài giọt H₂SO₄ đậm đặc. Xuất hiện vòng màu nâu cho thấy sự hiện diện của steroid [14]. *Nhận dạng tecpenoit*: 0,5 ml EtCU được trộn với 2 ml chloroform và vài giọt H₂SO₄. Sự hình thành màu nâu đỏ ở bề mặt phân cách cho thấy sự hiện diện của tecpenoit [14]. *Nhận dạng flavonoid*: 2 ml EtCU, thêm 1 ml NaOH 2N. Xuất hiện màu vàng cho thấy sự hiện diện của flavonoid [15]. *Nhận dạng ancaloit*: Thêm 2 ml HCl đậm đặc vào 2 ml EtCU. Sau đó, thêm vào vài giọt thuốc thử của Mayer. Sự hiện diện của màu xanh lục hoặc kết tủa trắng cho thấy sự có mặt của các ancaloit [16]. *Nhận dạng glycosit*: Trộn 2 ml EtCU, 3ml chloroform và vài giọt NH₃ 10%. Sự hình thành màu hồng cho thấy sự hiện diện của glycosit [16]. *Nhận dạng phenol*: 2 ml nước cất, sau đó thêm vài giọt clorua sắt 10% vào 1ml EtCU. Sự hình thành màu xanh lam hoặc xanh lá cây cho thấy sự hiện diện của phenol [17]. *Nhận dạng coumarin*: 1 ml NaOH 10% được thêm vào 1ml EtCU. Sự hình thành màu vàng cho thấy sự hiện diện của coumarin [17]. *Nhận dạng cacbonhydrat*: Sự hiện diện của cacbonhydrat được xác nhận khi trộn 2 ml EtCU với 1 ml thuốc thử Molisch, vài giọt H₂SO₄ đậm đặc, hình thành màu tím hoặc đỏ cho thấy sự hiện diện của cacbonhydrat [17]. *Nhận dạng protein*: Cho 2 ml EtCU, 1 ml NaOH 40% và vài giọt CuSO₄ 1%. Sự hình thành màu tím cho thấy sự hiện diện của các phân tử liên kết peptit [18].

2.3. Động vật thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành trên 60 con chuột Swiss albino khỏe mạnh, từ 8 đến 10 tuần tuổi, cân nặng từ 28 ± 3 g, được thu mua từ Viện Pasteur Tp. HCM. 60 con chuột được phân thành hai mô hình thử nghiệm (30 chuột/mô hình). Các quy trình thí nghiệm được thực hiện theo các nguyên tắc chăm sóc cho động vật trong phòng thí nghiệm. Chuột được nuôi trong lồng kính (dài x rộng x cao = 60 x 30 x 30 cm = 54cm³) và được cung cấp thức ăn, nước uống tiêu chuẩn dành cho động vật gặm nhấm. Vật liệu dăm gỗ dùng để lót chuồng đã được phun Vi sinh hữu hiệu (EM) để khử trùng và xử lý mùi hôi, được thay thường xuyên (2-3 ngày/lần). Những con chuột được tiêu thụ thức ăn viên tiêu chuẩn dành cho loài gặm nhấm và nước libitium

đã được lọc trước. Các con chuột được nuôi thích nghi 2 tuần trong nhà nuôi động vật của Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm, trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM ở nhiệt độ $29 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 60 - 70%, chu kỳ sáng/tối là 12h/12h trước khi bắt đầu các quy trình thí nghiệm. 30 con chuột/mô hình thử nghiệm độc tính được chia vào 5 nhóm (6 con chuột/nhóm) [19]. Việc điều trị động vật được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) [20]. Quy trình thử nghiệm được tuân thủ nghiêm ngặt theo Tuyên bố Helsinki (2014) [21]. Tất cả động vật được con người chăm sóc theo quy định Pháp luật Việt Nam về sử dụng và chăm sóc động vật thí nghiệm và theo Bộ Y tế Việt Nam Hướng dẫn về đạo đức trong nghiên cứu y sinh [22]. Nghiên cứu đã được phê duyệt bởi Ban Đạo đức của Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học - Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh. Tất cả các nỗ lực đã được thực hiện để giảm thiểu sự đau khổ của chuột.

2.4. Nghiên cứu độc tính cấp tính

Nghiên cứu độc tính cấp tính chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* L (EtCU) được thực hiện theo Hướng dẫn của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD 423) về nhiễm độc đường miệng cấp tính [23] và Quyết định của Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo, Bộ Y tế, Việt Nam về Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ Dược liệu [24]. 30 con chuột Swiss albino đực được phân chia ngẫu nhiên vào 5 nhóm (6 con chuột/nhóm) [25, 26]. Nhóm đối chứng chuột được uống nước bình thường trong suốt thời gian thử nghiệm. Các nhóm EtCU₁₀₀₀, EtCU₃₀₀₀, EtCU₅₀₀₀, các con chuột được uống EtCU với liều lượng tương ứng là 1000, 3000, 5000 mg/kg thể trọng EtCU, thể tích EtCU được chia nhỏ thành 8 phân số và cho uống trong 1 ngày bằng ống thông dạ dày. Lượng thể tích EtCU được tính theo công thức: Thể tích EtCU (mL) = $\frac{\text{Khối lượng cơ thể chuột (g)}}{1000} \times \text{Liều uống EtCU}$. Sau khi uống EtCU liều đầu tiên, các con vật được quan sát tỷ lệ tử vong và các dấu hiệu lâm sàng trong 24 giờ và sau đó hàng ngày trong 14 ngày. Giá trị LD₅₀ được đánh giá theo tỷ lệ tử vong ghi nhận trong suốt thời gian thử nghiệm. Động vật được kiểm tra và ghi nhận những thay đổi về da, lông, mắt, màng nhầy, di chuyển, nhịp hô hấp, tiết nước bọt, tiêu chảy. Khối lượng cơ thể động vật được ghi lại vào ngày trước khi uống EtCU (ngày 0) và hàng ngày cho đến 14 ngày. Lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ và thành phần nước tiểu cũng được phân tích, đánh giá trong thời gian thí nghiệm. Vào ngày kết thúc thí nghiệm, động vật được gây mê bằng ethyl ether và được thu nhận máu qua tĩnh mạch đuôi để phân tích huyết học và sinh hóa. Sau đó chuột được hy sinh do hít phải khí CO₂ và được giải phẫu để đánh giá khối lượng, mô bệnh học cơ quan nội tạng trong cơ thể [27].

2.5. Nghiên cứu độc tính bán mãn tính

Nghiên cứu độc bán mãn tính chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* L (EtCU) được thực hiện theo Hướng dẫn của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD 411) về nhiễm độc đường miệng bán mãn tính [28] và Quyết định của Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo, Bộ Y tế, Việt Nam về Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc Đông y, thuốc từ Dược liệu [24]. 30 con chuột Swiss albino đực được phân chia ngẫu nhiên vào 5 nhóm (6 con chuột/nhóm). Nhóm đối chứng chuột được uống nước bình thường trong suốt thời gian thử nghiệm. Nhóm EtCU₁₀₀ chuột được uống EtCU với liều lượng 100 mg/kg thể trọng, nhóm EtCU₃₀₀ chuột uống EtCU liều 300 mg/kg thể trọng, nhóm EtCU₅₀₀ chuột uống EtCU liều 500 mg/kg thể trọng. Tất cả các con chuột ở các nhóm thử nghiệm được uống EtCU trong 90 ngày. Khối lượng cơ thể, lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ, thành phần nước tiểu của chuột được phân tích và đánh giá hàng tuần. Vào ngày kết thúc thí nghiệm, tất cả các động vật được gây mê bằng ethyl ether và được thu nhận máu qua tĩnh mạch đuôi để phân tích huyết học và sinh hóa. Sau đó chuột được hy sinh do hít phải khí CO₂ và được giải phẫu để đánh giá khối lượng, mô bệnh học cơ quan nội tạng trong cơ thể [29].

2.6. Quan sát lâm sàng và tỷ lệ sống sót

Quan sát và ghi nhận hoạt động của chuột về da, lông, mắt, màng nhầy, di chuyển, nhịp hô hấp, tiết nước bọt, tiêu chảy, tử vong một lần/ngày bắt đầu từ sau khi chuột được uống EtCU. Quan sát liên tục trong 4 giờ đầu (ngay sau khi uống EtCU với các liều cấp tính), không liên tục trong 24 giờ và sau đó tiếp tục quan sát trong 14 ngày tiếp theo. Trong thử nghiệm độc bán mãn tính, việc quan sát được thực hiện mỗi ngày một lần. Tiêu chuẩn và phương pháp quan sát thực hiện theo Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng Động vật phòng thí nghiệm (2012) [30].

2.7. Khối lượng cơ thể

Sử dụng cân điện tử Entris Sartorius (Đức) đo khối lượng cơ thể động vật thí nghiệm. Khối lượng cơ thể được đo vào ngày đầu tiên trước khi uống EtCU (ngày 0). Sau khi uống EtCU, tiếp tục cân đo khối lượng cơ thể chuột vào ngày thứ 7, 14 (thử độc tính cấp) vào ngày thứ 30, 60 và 90 (thử độc bán mãn tính). Mức tăng khối lượng cơ thể (WG) được tính theo công thức sau:

$$\text{Mức độ tăng trọng (\%)} = \frac{\text{Khối lượng cơ thể cuối cùng (g)} - \text{Khối lượng cơ thể ban đầu (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể ban đầu (g)}} \times 100 \quad [25]$$

2.8. Thức ăn, nước uống tiêu thụ

Sử dụng cân điện tử Entris Sartorius (Đức) và ống đong thủy tinh Duran (Đức) để cân đo lượng thức ăn, nước uống hàng ngày. Lượng thức ăn và nước uống được cân đo và ghi nhận trước khi cung cấp cho chuột sử dụng. Phần thức ăn và nước uống còn thừa được thu nhận và cân đo sau cuối mỗi ngày. Lượng thức ăn và nước uống tiêu thụ hàng ngày được tính theo công thức:

$$\text{Mức tiêu thụ thức ăn (g)/nước uống (ml)} = \text{Lượng thức ăn (g)/nước uống (ml) ban đầu} - \text{Lượng thức ăn (g)/nước uống (ml) còn thừa}$$

Mức tiêu thụ thức ăn và nước uống được ghi nhận hàng ngày. Sau mỗi tuần tính toán mức tiêu thụ trung bình hàng tuần [29].

2.9. Phân tích huyết học và sinh hóa

Mẫu máu được thu thập từ tĩnh mạch đuôi của chuột để đo các chỉ số huyết học (ống phủ EDTA) và sinh hóa (ống khô) sau 14 ngày và 90 ngày thử nghiệm. Các thông số huyết học gồm hồng cầu (RBC), hemoglobin (HGB), bạch cầu (WBC), tiểu cầu (PLT) được xác định bằng máy phân tích huyết học tự động (Sysmex K21, Tokyo, Nhật Bản). Phân tích sinh hóa huyết thanh với các chỉ tiêu aspartate aminotransferase huyết thanh (AST), alanin aminotransferase (ALT), creatinine và urê bằng cách sử dụng bộ dụng cụ chẩn đoán Cypress (Bi) với máy phân tích hóa học máu bán tự động (Máy quang kế 4040, Rober Riele G & Cole- 2000, Đức) [31].

2.10. Khối lượng cơ quan

Vào ngày cuối cùng của quá trình thử nghiệm, tất cả các động vật đều được hy sinh vì hít khí CO₂. Chuột được giải phẫu để quan sát, thu nhận và cân đo khối lượng của gan và thận (sử dụng cân phân tích Entris Sartorius (Đức) để đo khối lượng gan và thận). Khối lượng tương đối của gan và thận (ROW) được tính theo công thức sau:

$$\text{Khối lượng tương đối của cơ quan (\%)} = \frac{\text{Khối lượng nội tạng tuyệt đối (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể chuột vào ngày phẫu thuật (g)}} \times 100 \quad [32]$$

2.11. Đánh giá mô học

Vào ngày cuối cùng của quá trình thí nghiệm, các con chuột được hy sinh vì hít phải khí CO₂. Động vật được giải phẫu, gan và thận đã được phân lập từ mỗi cá thể và được cố định trong foocmalin 10%. Sau đó mẫu gan và thận được rửa sạch bằng nước và ethanol. Tiếp tục nhúng các mẫu gan, thận vào trong sáp parafin. Các đoạn parafin (5 µm) được cắt và đặt lên trên lam kính. Tiếp tục xử lý loại bỏ paraffin bám vào mẫu mô trên lam kính bằng ethanol và xylen. Nhuộm màu mẫu mô với haematoxylin và eosin (H và E). Các mẫu mô đặt trên lam kính được quan sát dưới kính hiển vi ánh sáng (x 40, x 100). Hình ảnh của cấu trúc mô soi trên kính hiển vi được phóng đại và được chụp lại để tiếp tục nghiên cứu [33].

2.12. Phân tích nước tiểu

Xét nghiệm nước tiểu được thực hiện 1 tuần/lần (thử nghiệm độc tính cấp tính) và 2 tuần/lần (thử nghiệm độc bán mãn tính). Động vật thí nghiệm được nuôi trong lồng kính riêng lẻ, nhịn ăn nhưng vẫn được uống nước tự do. Nước tiểu được thu thập trong 16 giờ, xử lý trong vòng 2 giờ. Các thông số nước tiểu gồm trọng lượng riêng, pH, glucose, protein, RBC và WBC được phân tích bằng máy phân tích nước tiểu (CLINITEK STATUS, Erlangen, Đức) [34].

2.13. Phân tích thống kê

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. Tiến hành thực hiện kiểm tra so sánh của Tukey bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVIII. 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 định tính hóa thực vật của EtCU

Bảng 1. Thành phần hợp chất hóa học hiện diện trong chiết xuất ethanol thô quả *C. urens*

Hợp chất hóa học	EtCU	Hợp chất hóa học	EtCU
Ancaloit	+	Phlobatannin	+
Flavonoit	+	Coumarin	+
Saponin	+	Tecpenoit	+
Steroid	+	Tannin	+
Glycosit	+	Phenol	+
Cacbonhydrat	+	Protein	-

(+): Hiện diện trong EtCU; (-): Không hiện diện trong EtCU

Phân tích sơ bộ thành phần hóa học thực vật của EtCU cho thấy sự hiện diện của ancaloit, flavonoit, tannin, phenol, tecpenoit, saponin, glycosit, phlobatannin, coumarin, steroid, cacbonhydrat (Bảng 1). Sự hiện diện của các hợp chất hóa học trên trong chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* cũng được khẳng định trong các kết quả nghiên cứu của Vaishnavi và cộng sự (2013) [7], Devanesan và cộng sự (2013) [11], Amit và cộng sự (2015) [12].

3.2. Phản ứng hành vi và ngoại hình chung

Quan sát phản ứng và ngoại hình chung của chuột trong thử nghiệm độc tính EtCU cho thấy không có dấu hiệu và thay đổi bất thường về da, lông, màu sắc mắt và màng nhầy (mũi, miệng), nhịp hô hấp, hiệu ứng tự trị (tiết nước bọt, tiêu chảy) và hoạt động của hệ thống thần kinh và vận động (phản xạ, di chuyển) ở các nhóm EtCU₁₀₀₀, EtCU₃₀₀₀ và EtCU₅₀₀₀ trong thử nghiệm độc tính cấp tính (Bảng 1, Hình 2). Không có trường hợp tử vong xuất hiện ở các mức liều khảo sát.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* đối với chuột thí nghiệm

Phản ứng	Thử nghiệm độc cấp tính				Thử nghiệm độc bán mãn tính			
	Đối chứng	EtCU ₁₀₀₀	EtCU ₃₀₀₀	EtCU ₅₀₀₀	Đối chứng	EtCU ₁₀₀	EtCU ₃₀₀	EtCU ₅₀₀
Da, lông	Mướt, mềm	Mướt, mềm	Mướt, mềm	Mướt, mềm	Mướt, mềm	Mướt, mềm	Mướt, mềm	Mướt, mềm
Mắt, màng nhầy	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi
Di chuyển	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt
Phản xạ	Nhanh nhẹn	Nhanh nhẹn	Nhanh nhẹn	Nhanh nhẹn	Nhanh nhẹn	Nhanh nhẹn	Nhanh nhẹn	Nhanh nhẹn
Nhịp hô hấp	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi
Tiết nước bọt	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Tiêu chảy	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Tử vong	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không



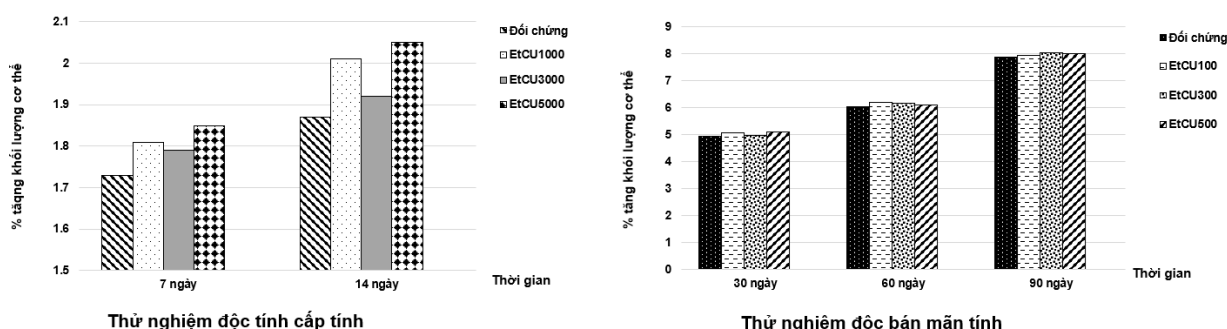
Hình 2. Phản ứng và hành vi của chuột Swiss albino trong thử nghiệm độc tính EtCU

A. Phản ứng và hành vi của chuột nhóm đối chứng; B. Phản ứng và hành vi của chuột uống EtCU liều 5000 mg/kg thể trọng; C. Phản ứng và hành vi của chuột uống EtCU liều 500 mg/kg thể trọng.

3.3. Khối lượng cơ thể

Khối lượng cơ thể được duy trì thông qua sự cân bằng phức tạp giữa năng lượng nạp vào (tiêu thụ thức ăn) và chi tiêu [35]. Thay đổi trọng lượng cơ thể là một trong những dấu hiệu quan trọng đầu tiên của nhiễm độc [36]. Chính vì vậy, dựa vào phần trăm mức tăng trung bình của khối lượng cơ thể có thể đánh giá được tác động của EtCU đến cơ thể chuột thí nghiệm. Sau khi uống EtCU, phần trăm tăng trọng (WG) của cơ thể chuột đều tăng lên trong thời gian thử nghiệm. Mức tăng trọng ở các nhóm sử dụng EtCU liều cấp và bán mãn tính không khác biệt so với nhóm đối chứng (Hình 3). Ví dụ, WG ở nhóm EtCU₅₀₀₀ là $2,05 \pm 0,1$ % không khác biệt so với nhóm đối chứng là $1,87 \pm 0,2$ % (thời điểm 14 ngày, thử nghiệm độc cấp tính); WG ở nhóm EtCU₅₀₀ là $7,99 \pm 0,2$ % không khác biệt so với nhóm đối chứng là $7,88 \pm 0,3$ % (thời điểm 90 ngày, thử nghiệm độc bán mãn tính).

Phần trăm tăng trung bình của khối lượng cơ thể của động vật ở tất cả các nhóm thí nghiệm đều tăng theo thời gian nghiên cứu và không khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng. Khối lượng tăng lên ở động vật trong thời gian thí nghiệm là dấu hiệu cho thấy chất chiết xuất không cản trở sự tăng trưởng của động vật [37]. Saponin là glycoside steroid hoặc triterpenoid phổ biến trong chiết xuất của thực vật. Saponin có đặc tính thấm qua màng ruột, kích thích miễn dịch, hạ cholesterol trong máu và ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng trưởng, khả năng tiêu thụ thức ăn, nước uống ở động vật [38]. Saponin hiện diện trong chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* saponin được cư trú lâu dài trong đường ruột của động vật, kích thích quá trình phân giải và hấp thu các chất qua màng ruột. Saponin được ví như “enzyme tiền sinh học” trong hệ tiêu hóa động vật [39]. Hoạt động của saponin trong EtCU kích thích quá trình tiêu hóa, tăng cường chuyển hóa vật chất và năng lượng, làm tăng khối lượng cơ thể [40].



Hình 3. Phần trăm mức tăng khối lượng cơ thể chuột trong thử nghiệm độc cấp và bán mãn tính EtCU

3.4. Lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ

Thức ăn và nước uống cần thiết cho sự sống và sinh trưởng và phát triển của mọi sinh vật. Lượng thức ăn và nước tiêu thụ hàng ngày cho thấy cảm giác mùi vị và sự thèm ăn của động vật [41]. Việc tăng lượng thức ăn và nước tiêu thụ hàng ngày của chuột được uống EtCU liều cấp và bán mãn tính có thể là một dấu hiệu cho thấy EtCU làm tăng cảm giác ngon miệng ở động vật. Trong nghiên cứu này, mức tiêu thụ thức

ăn và nước uống của động vật tăng nhẹ nhưng khác biệt không lớn giữa các nhóm thử nghiệm EtCU liều cấp và bán mãn tính so với nhóm đối chứng (Bảng 2). Ở mô hình thử nghiệm độc cấp tính, lượng thức ăn và nước uống tiêu thụ hàng ngày của chuột ở nhóm EtCU₅₀₀₀ lần lượt là $5,17 \pm 1,2$ (g) và $4,85 \pm 0,8$ (ml) so với nhóm đối chứng ($5,01 \pm 1,1$ g và $4,68 \pm 0,9$ ml) khác biệt không lớn. Thử nghiệm trong thời gian dài, mức tiêu thụ thức ăn và nước uống ở các nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng cũng tăng lên theo thời gian trong mô hình thử độc bán mãn tính (Ví dụ, lượng thức ăn và nước uống tiêu thụ ở nhóm EtCU₅₀₀ là $5,19 \pm 0,9$ g và $4,87 \pm 1,2$ ml, nhóm đối chứng là $5,13 \pm 1,3$ g và $4,78 \pm 0,6$ ml).

Bảng 2. Ảnh hưởng của EtCU đến việc tiêu thụ thức ăn và nước uống trong thử nghiệm độc tính cấp tính và bán mãn tính

Thử nghiệm độc tính cấp				
Chỉ tiêu	Đối chứng	EtCU ₁₀₀₀	EtCU ₃₀₀₀	EtCU ₅₀₀₀
Lượng thức ăn tiêu thụ (g/ngày)	$5,01 \pm 1,1$	$5,11 \pm 0,7$	$4,97 \pm 0,8$	$5,17 \pm 1,2$
Lượng nước uống tiêu thụ (mL/ngày)	$4,68^a \pm 0,9$	$5,03^b \pm 1,3$	$4,72^a \pm 1,4$	$4,85 \pm 0,8$
Thử nghiệm bán mãn tính				
Chỉ tiêu	Đối chứng	EtCU ₁₀₀	EtCU ₃₀₀	EtCU ₅₀₀
Lượng thức ăn tiêu thụ (g/ngày)	$5,13^a \pm 1,3$	$5,01 \pm 0,8$	$5,06 \pm 1,1$	$5,19^b \pm 0,9$
Lượng nước uống tiêu thụ (mL/ngày)	$4,78^a \pm 0,6$	$5,03 \pm 0,9$	$5,08^b \pm 0,7$	$4,87 \pm 1,2$

Dữ liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình \pm SEM. Các chữ cái trên (a, b) trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Glycosit có khả năng điều chỉnh lượng thức ăn bằng cách ảnh hưởng đến các mạch nuôi dưỡng vùng dưới đồi. Glycosit hiện diện trong EtCU có tác dụng kích thích Ikemagenin, làm tăng tiết yếu tố hướng thần kinh có nguồn gốc từ não ở hạ nguồn của các thụ thể melanocortin vùng dưới đồi thông qua hoạt động của các con đường tín hiệu melanocortin [42]. Trung khu ăn uống được kích thích khi có tín hiệu thần kinh tác động đã làm tăng phản xạ ăn và uống. Từ đó dẫn đến cảm giác ăn ngon miệng và thèm ăn ở động vật.

3.5. Huyết học và sinh hóa máu

Hệ thống tạo huyết là một trong những thông số quan trọng được sử dụng để xác định tình trạng sinh lý và bệnh lý của động vật có vú, vì nó cung cấp thông tin về phản ứng của cơ thể đối với chấn thương và nhiễm độc [43]. Hàm lượng các thông số huyết học của chuột trong thử nghiệm độc cấp và bán mãn tính EtCU khác biệt không đáng kể so với nhóm đối chứng (Bảng 3). Lượng hồng cầu (RBC), bạch cầu (WBC) và tiểu cầu (PLT) tăng nhẹ, ở nhóm EtCU₅₀₀ (RBC: $9,29 \pm 0,65 \times 10^6$ tb/mm³, WBC: $4,58 \pm 0,66 \times 10^3$ tb/mm³, PLT: $668,22 \pm 46,17 \times 10^3$ tb/mm³) nhưng không khác biệt so với nhóm đối chứng (RBC: $7,95 \pm 0,41 \times 10^6$ tb/mm³, WBC: $3,95 \pm 0,67 \times 10^3$ tb/mm³, PLT: $651,29 \pm 62,05 \times 10^3$ tb/mm³) trong thử nghiệm độc tính bán mãn tính. Mặc dù có sự gia tăng đáng kể về số lượng RBC, WBC, PLT của các động vật trong các nhóm sử dụng EtCU liều cấp và bán mãn tính, nhưng các giá trị này vẫn nằm trong phạm vi sinh lý đối với chuột Swiss albino bình thường khỏe mạnh [44]. Sự gia tăng của PLT cho thấy cho thấy tác dụng kích thích lên erythropoietin [45]. Lượng WBC tăng lên có thể gợi ý đến tác động của EtCU tăng cường miễn dịch vì WBC (tế bào lympho B, T, tế bào giết tự nhiên, nhiều loại tế bào miễn dịch khác, ... là tế bào tác động chính của hệ thống thực bào và miễn dịch cơ thể [45].

Bảng 3. Ảnh hưởng của EtCU đến thành phần huyết học trong thử độc tính cấp tính và bán mãn tính

Thử nghiệm độc tính cấp				
Chỉ tiêu	Đối chứng	EtCU ₁₀₀₀	EtCU ₃₀₀₀	EtCU ₅₀₀₀
RBC (x10 ⁶ tb/mm ³)	$7,62 \pm 0,44$	$7,91 \pm 0,72$	$8,45 \pm 0,93$	$8,27 \pm 0,48$
HGB (g/dl)	$13,95^a \pm 0,53$	$14,18 \pm 0,62$	$15,17 \pm 0,82$	$14,76^b \pm 0,74$
PLT	$622,22 \pm 31,01$	$636,21 \pm 49,05$	$661,13 \pm 54,07$	$628,11 \pm 42,04$

(x10 ³ tb/mm ³)				
WBC (x10 ³ tb/mm ³)	3,56 ^a ± 0,78	4,19 ± 0,45	3,76 ± 0,61	4,28 ^b ± 0,83
Thử nghiệm bán mãn tính				
Chỉ tiêu	Đối chứng	EtCU ₁₀₀	EtCU ₃₀₀	EtCU ₅₀₀
RBC (x10 ⁶ tb/mm ³)	7,95 ^a ± 0,41	8,74 ± 0,77	8,33 ± 0,52	9,29 ^b ± 0,65
HGB (g/dl)	14,86 ± 0,64	15,68 ± 0,47	15,19 ± 0,34	15,41 ± 0,55
PLT (x10 ³ tb/mm ³)	651,29 ^a ± 62,05	683,16 ± 59,07	694,19 ^b ± 74,03	668,22 ± 46,17
WBC (x10 ³ tb/mm ³)	3,95 ^a ± 0,67	4,34 ± 0,82	4,21 ± 0,73	4,58 ^b ± 0,66

Dữ liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình ± SEM. Các chữ cái trên (a, b) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Hoạt động chức năng gan và thận được đánh giá thông qua các chỉ tiêu sinh hóa huyết thanh. AST và ALT là các chỉ số men gan giúp phản ánh chức năng sinh lý và tình trạng tổn thương gan [46]. Ure là một hợp chất được sản xuất bởi quá trình chuyển hóa protein trong cơ thể. Creatinin là sản phẩm của sự thoái hóa creatin trong các cơ, được đào thải qua thận. Hàm lượng ure và creatinin trong huyết thanh phản ánh chức năng của thận [47]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng AST, ALT, ure và creatinin trong máu và huyết thanh chuột khác biệt không đáng kể so với nhóm đối chứng (Bảng 4). Tuy nhiên, các giá trị này vẫn nằm trong phạm vi sinh lý đối với chuột Swiss albino [44]. Chẳng hạn, lượng AST và ALT ở nhóm EtCU₅₀₀₀ lần lượt là 18,34 ± 0,66 U/l và 19,34 ± 0,44 U/l khác biệt không đáng kể so với nhóm đối chứng (AST: 17,75 ± 0,57 U/l và ALT: 18,54 ± 0,28 U/l) trong thử nghiệm cấp tính. Lượng ure và creatinin ở nhóm EtCU₅₀₀ lần lượt là 32,19 ± 0,45 mg/l và 0,44 ± 0,33 μmol/l khác biệt không đáng kể so với nhóm đối chứng (ure: 31,38 ± 0,39 mg/l, creatin: 0,42 ± 0,31 μmol/l) trong thử nghiệm độc bán mãn tính. ALT là một enzym đánh dấu của màng sinh chất cũng như lưới nội chất và có trong các tế bào nốt ống mật của gan [48]. Do đó, tăng hoạt động ALP huyết thanh có thể cho thấy sự thay đổi tính thấm của màng sinh chất và các bệnh về ứ mật như sỏi mật [49]. Trong khi những thay đổi trong hoạt động của AST huyết thanh có thể tạo ra hậu quả đối với sự chuyển hóa các axit amin và quy định sinh hóa của nó [41]. Sự thay đổi không đáng kể về nồng độ ALT và AST trong huyết thanh của chuột ở các nhóm cấp tính EtCU₁₀₀₀₋₅₀₀₀ và nhóm bán mãn tính EtCU₁₀₀₋₅₀₀ thể hiện tính an toàn của EtCU đối với gan. Đồng thời không có sự thay đổi trong tất cả các thông số chức năng thận (creatinin, ure) được phân tích trong nghiên cứu này, đây có thể là một dấu hiệu an toàn [50].

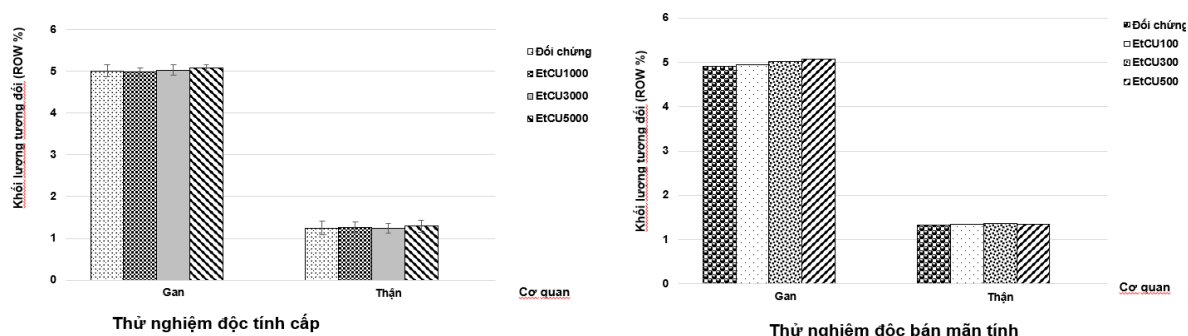
Bảng 4. Ảnh hưởng của EtCU đến thành phần sinh hóa máu trong thử nghiệm cấp tính và bán mãn tính

Thử nghiệm độc cấp				
Chỉ tiêu	Đối chứng	EtCU ₁₀₀₀	EtCU ₃₀₀₀	EtCU ₅₀₀₀
AST (U/l)	17,75 ± 0,57	18,19 ± 0,47	17,93 ± 0,38	18,34 ± 0,66
ALT (U/l)	18,54 ^a ± 0,28	19,19 ± 0,33	18,88 ± 0,19	19,34 ^b ± 0,44
Creatinin (μmol/l)	0,39 ± 0,18	0,44 ± 0,26	0,46 ± 0,18	0,41 ± 0,32
Ure (mg/l)	30,83 ^a ± 0,77	31,88 ^b ± 0,44	31,39 ± 0,46	31,59 ± 0,55
Thử nghiệm bán mãn tính				
Chỉ tiêu	Đối chứng	EtCU ₁₀₀	EtCU ₃₀₀	EtCU ₅₀₀
AST (U/l)	18,19 ± 0,52	18,44 ± 0,46	19,18 ± 0,32	19,37 ^b ± 0,45
ALT (U/l)	19,48 ± 0,26	19,93 ± 0,46	20,33 ± 0,37	19,78 ± 0,71
Creatinin (μmol/l)	0,42 ± 0,31	0,48 ± 0,17	0,51 ± 0,41	0,44 ± 0,33
Ure (mg/l)	31,38 ^a ± 0,39	31,96 ± 0,48	31,76 ± 0,58	32,19 ^b ± 0,45

Dữ liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình ± SEM. Các chữ cái trên (a, b) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

3.6. Khối lượng cơ quan

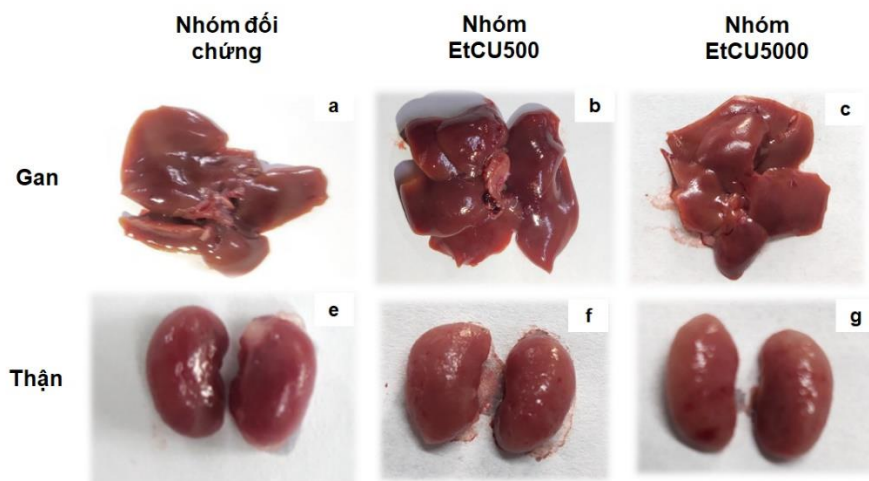
Khối lượng cơ quan tương đối (ROW) là một chỉ số nhạy cảm để đánh giá tình trạng nhiễm độc cơ quan do sử dụng chiết xuất thực vật ở liều cao hoặc trong thời gian dài [51]. So với nhóm đối chứng, chuột ở các nhóm được sử dụng EtCU với các mức liều 1000-5000 (thử nghiệm độc cấp tính) và 100-500 (thử nghiệm độc bán mãn tính) có giá trị trọng lượng cơ quan tương đối không khác biệt (Hình 4). Ở mô hình thử nghiệm độc cấp tính, ROW của gan, thận ở nhóm EtCU₅₀₀₀ lần lượt là $5,08 \pm 0,08 \%$ và $1,29 \pm 0,14 \%$ không khác biệt so với nhóm đối chứng (ROW gan và thận lần lượt là $5,01 \pm 0,14\%$ và $1,25 \pm 0,17\%$). Trong khi đó ở mô hình thử nghiệm độc bán mãn tính ROW của gan và thận ở nhóm EtCU₅₀₀ lần lượt là $5,07 \pm 0,12 \%$ và $1,35 \pm 0,11 \%$ cũng không khác biệt so với nhóm đối chứng là $4,19 \pm 0,09\%$ và $1,32 \pm 0,12 \%$. Vì không có sự giảm trọng lượng cơ thể và các cơ quan tương đối ở tất cả các con chuột được điều trị bằng chiết xuất EtCU, do đó có thể giả định rằng chiết xuất không độc đối với những cơ quan này ở các mức liều đã thử nghiệm.



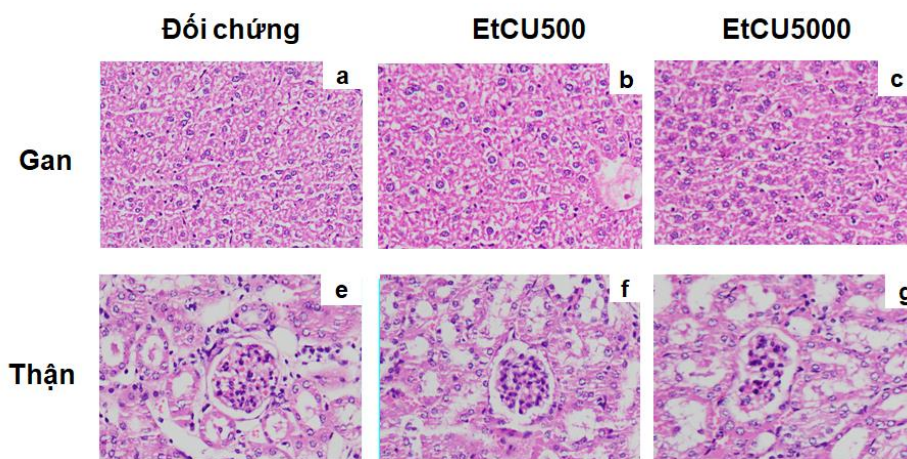
Hình 4. Khối lượng tương đối gan và thận chuột trong thử nghiệm độc cấp và bán mãn tính EtCU

3.7. Nghiên cứu hình thái và mô bệnh cơ quan

Gan và thận rất nhạy cảm với các chất độc hại. Phân tích hình thái và mô bệnh học của gan, thận sẽ đánh giá được ảnh hưởng của chiết xuất đến hoạt động sinh lý của cơ thể [52]. Hình thái giải phẫu gan, thận của chuột trong nhóm được điều trị bằng EtCU và nhóm đối chứng được mô tả ở Hình 5. Hình ảnh vĩ mô của gan, thận không cho thấy có thay đổi bất thường ở nhóm đối chứng và nhóm EtCU₅₀₀₀ và EtCU₅₀₀. Gan, thận của nhóm đối chứng và nhóm EtCU₅₀₀₀ và EtCU₅₀₀ đều có màu đỏ sẫm đồng nhất, bề mặt các cơ quan nhẵn, mô mềm, đàn hồi khi ấn xuống, không có vùng lồi lõm, không xuất hiện xuất huyết (Hình 5a, 5b, 5c, 5e, 5f, 5g). Mô học của gan, thận trong các nhóm được điều trị EtCU và nhóm đối chứng được quan sát, phân tích và đánh giá ở Hình 6. Phân tích mô học gan của những con chuột ở nhóm đối chứng và nhóm EtCU₅₀₀, EtCU₅₀₀₀ cho thấy gan bình thường về cấu trúc. Tế bào gan có kích thước và hình dạng bình thường, không có không bào được ghi nhận trong tế bào chất của chúng (Hình 6a, 6b, 6c). Tế bào Kupffer cũng bình thường về mặt hình thái. Đánh giá mô học thận của chuột ở nhóm đối chứng và nhóm EtCU₅₀₀, EtCU₅₀₀₀ cho thấy thận bình thường về cấu trúc. Các cấu trúc cầu thận và ống thận còn nguyên vẹn. Các mao mạch và Bowman cũng bình thường (Hình 6e, 6f, 6g). Gan là một tạng lớn nhất trong cơ thể. Cơ quan này đóng một vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa và một số các chức năng khác trong cơ thể như dự trữ glycogen, tổng hợp protein huyết tương và thải độc [53]. Thận thực hiện chức năng quan trọng là lọc huyết tương, loại bỏ các chất thải chuyển hóa và hóa chất lạ từ dịch lọc và bài tiết chúng qua nước tiểu [47]. So với nhóm đối chứng, sự khác biệt không đáng kể về cấu trúc mô của gan, thận ở các nhóm sử dụng EtCU₁₀₀₀₋₅₀₀₀ và EtCU₁₀₀₋₅₀₀ cho thấy rằng EtCU ở các mức liều sử dụng không gây ảnh hưởng đến các chức năng bình thường của gan và thận.



Hình 5. Hình thái ngoài gan và thận của chuột trong thử nghiệm độc cấp và bán mãn tính EtCU



Hình 6. Mô bệnh học gan và thận (H&E10x) của chuột trong thử nghiệm độc cấp và bán mãn tính EtCU

3.8. Phân tích nước tiểu

Hầu hết ở các động vật đều có hệ thống bài tiết để loại bỏ chất thải độc hại hòa tan. Chất thải hòa tan được bài tiết chủ yếu bởi hệ thống tiết niệu [53]. Trong nghiên cứu này, không có thay đổi bất thường về trọng lượng riêng, pH của nước tiểu, không xuất hiện tế bào hồng cầu, tế bào bạch cầu trong nước tiểu của chuột ở cả nhóm đối chứng và nhóm được điều trị bằng EtCU₁₀₀₀₋₅₀₀₀ và EtCU₁₀₀₋₅₀₀ trong thử nghiệm độc tính cấp và bán mãn tính (Bảng 5). Kết quả phân tích cho thấy, EtCU không gây ảnh hưởng đến cơ thể ở các mức liều thử độc tính cấp tính và bán mãn tính.

Bảng 5. Ảnh hưởng của EtCU đến thành phần nước tiểu trong thử độc tính cấp tính và bán mãn tính

Thử nghiệm độc tính cấp					
Chỉ tiêu	Đối chứng	EtCU ₁₀₀₀	EtCU ₃₀₀₀	EtCU ₅₀₀₀	
Trọng lượng riêng	1,11 ^a ± 0,004	1,12 ^a ± 0,006	1,13 ^a ± 0,003	1,09 ^a ± 0,002	
pH	7,0 ^a ± 0,19	7,0 ^a ± 0,21	6,9 ^a ± 0,18	7,0 ^a ± 0,25	
Glucose (mg/dl)	Vết	Vết	Vết	Vết	
Protein (mg/dl)	Không	Không	Không	Không	
Hồng cầu (tb/ μ l)	Không	Không	Không	Không	
Bạch cầu (tb/ μ l)	Không	Không	Không	Không	
Thử nghiệm bán mãn tính					
Chỉ tiêu	Đối chứng	EtCU ₁₀₀	EtCU ₃₀₀	EtCU ₅₀₀	
Trọng lượng riêng	1,09 ^a ± 0,005	1,11 ^a ± 0,002	1,07 ^a ± 0,004	1,12 ^a ± 0,002	1,12 ^a ± 0,001

pH	7,0 ^a ± 0,13	7,0 ^a ± 0,22	7,0 ^a ± 0,18	7,0 ^a ± 0,23	7,0 ^a ± 0,17
Glucose (mg/dl)	Vết	Vết	Vết	Vết	Vết
Protein (mg/dl)	Không	Không	Không	Không	Không
Hồng cầu (tb/ μ l)	Không	Không	Không	Không	Không
Bạch cầu (tb/ μ l)	Không	Không	Không	Không	Không

Dữ liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình \pm SEM. Chữ cái trên (a) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$)

Khi cơ thể vật nuôi tiếp xúc với chất độc hại (xenobiotics) trong thời gian dài, hệ thần kinh, miễn dịch, nội tiết, tim mạch, phổi, cơ xương khớp, gan mật, thận sẽ bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Do đó, gan và thận sẽ trở thành cơ quan giải độc chính cho cơ thể. Quá trình giải độc xenobiotics trong cơ thể rất phức tạp, chất độc được đào thải qua gan và thận bằng cách thủy phân, oxy hóa khử và thải độc. Các chất độc cuối cùng được đào thải qua nước tiểu [54]. Thành phần và nồng độ các chất trong nước tiểu của chuột được sử dụng EtCU bằng đường uống ở liều cao (thử độc tính cấp tính, EtCU₁₀₀₀₋₅₀₀₀) và trong thời gian dài (thử nghiệm độc tính dưới mãn tính, EtCU₁₀₀₋₅₀₀) không thay đổi bất thường. Điều này chứng tỏ EtCU an toàn ở các mức liều lượng được đánh giá (cấp tính là 1000, 300 và 5000 mg/kg, bán mãn tính là 100, 300, và 500 mg/kg).

4. KẾT LUẬN

Dựa trên những kết quả đã nghiên cứu (khối lượng cơ thể, lượng thức ăn, nước uống tiêu thụ, huyết học, sinh hóa máu, khối lượng cơ quan tương đối, mô bệnh học gan, thận, thành phần nước tiểu không có thay đổi đáng kể ở cả nhóm đối chứng và được điều trị) chúng tôi có thể kết luận rằng chiết xuất ethanol thô quả *C. urens* (EtCU) không độc ở các liều lượng nghiên cứu (cấp tính là 1000 - 5000 mg/kg, bán mãn tính cao nhất là 100 - 500 mg/kg). Như vậy, EtCU an toàn ở mức liều cao nhất là 5000 mg/kg (cấp tính) và 500 mg/kg (bán mãn tính).

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. Tác giả cũng gửi lời cảm ơn đến chị Lâm Thị Hoàng Mên, chị Hà Thị Luận, anh Nguyễn Ngọc Thanh Tú và anh Phạm Quang Tiến đã tham gia hỗ trợ trong dự án này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Arya, et al., "Screening for hypoglycemic activity on the leaf extracts of nine medicinal plants: in-vivo evaluation", *E-Journal of Chemistry*, 9(3), 1196-1205, 2012.
- [2]. O. Said, et al., "Ethnobotanical survey of medicinal herbs of the Middle Eastern region", *J Ethnopharmacol*, 83, 251-65, 2002.
- [3]. A.Abou-Arab, M. Abou Donia, "Heavy metals in Egyptian spices and medicinal plants and the effect of processing on their levels", *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2300-2304, 2000.
- [4]. D. Thanaboripat, et al., "Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*", *Urrent applied science and technology*, 7(1), 1-7, 2007.
- [5]. W. Kneifel, E. Czech, B. Kopp, "Microbial contamination of medicinal plants-a review". *Planta Medica*, 68(01), 5-15, 2002.
- [6]. J. M. Olaniyan, et al., "Acute and sub-acute toxicity studies of aqueous and methanol extracts of *Nelsonia campestris* in rats", *Journal of Acute Disease*, 5(1), 62-70, 2016.
- [7]. R. Vaishnavi, V. Suneetha, "Phytochemical analysis on *Caryota urens* (fishtail palm) fruit from VIT university campus for pharmaceutical use", *Der Pharmacia Lettre*, 5(3), 71-75, 2013.
- [8]. N. N. C. Phát, H. T. Sỹ, "Nghiên cứu một số hoạt tính sinh học của cao chiết ethanol từ lá và quả cây đùng đình (*Caryota mitis* L.). Đánh giá khả năng điều hòa glucose thông qua hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase", *Tạp chí Khoa học*, 16(12), 961, 2019.
- [9]. S. Namoff, et al., "Sweet drinks are made of this: conservation genetics of an endemic palm species from the Dominican Republic", *Journal of Heredity*, 102(1), 1-10, 2011.
- [10]. D. Jayaweera, *Medicinal plants*, Colombo: National Science Council of Sri Lanka, 151, 1982.
- [11]. D. A. Ananth, et al., "Chemical constituents, in vitro antioxidant and antimicrobial potential of *Caryota urens* L.", *Free Radicals and Antioxidants*, 3(2), 107-112, 2013.

- [12]. A. K. Srivastav, et al., "Identification of flavonoids in methanolic extract of *Caryota urens* (fish tail palm): a phytochemical screening involving structure analysis by FTIR spectroscopy", *Research Journal of Phytochemistry*, 9(3), 127-136, 2015.
- [13]. T. Sharmin, et al., "Biological activities of Bonsupari (*Caryota urens* L.) fruits", *Pharmacy and Pharmacology*, 14(3), 46-50, 2020.
- [14]. C. Ejikeme, C. S. Ezeonu, A. N. Eboatu, "Determination of Physical and Phytochemical Constituents of some Tropical Timbers Indigenous to nigerdelta area of Nigeria", *European Scientific Journal*, 10(18), 247-270, 2014.
- [15]. A. Harborne, *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*, Springer science & business media, 1998
- [16]. H. Hikino, et al., "Antihepatotoxic actions of flavonolignans from *Silybum marianum* fruits", *Planta medica*, 50(03), 248-250, 1984.
- [17]. R. Roghini, K. Vijayalakshmi, "Phytochemical screening, quantitative analysis of flavonoids and minerals in ethanolic extract of *Citrus paradisi*", *Int J Pharm Sci & Res*, 9(11), 4859-64, 2018.
- [18]. R. Prabhavathi, M. Prasad, M. Jayaramu, "Studies on qualitative and quantitative phytochemical analysis of *Cissus quadrangularis*", *Pelagia Res Libr Adv Appl Sci Res*, 7(4), 11-7, 2016.
- [19]. Y.J. Tan, et al., "28-day oral chronic toxicity study of arctigenin in rats", *Frontiers in pharmacology*, 9, 1077, 2018.
- [20]. W. H. Organization, *General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine*, World Health Organization, 2000.
- [21]. S. A. Hurst, "Declaration of Helsinki and protection for vulnerable research participants", *Jama*, 311(12), 1252-1252, 2014.
- [22]. M. O. H. Vietnam, *National guideline on ethics in biomedical research*, Hà Nội, 173, 2013.
- [23]. 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.
- [24]. N. N. Quang, *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu - ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015*, Bộ y tế, cục khoa học công nghệ và đào tạo, 2015.
- [25]. 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.
- [26]. J. Charan, N. Kantharia, "How to calculate sample size in animal studies?", *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 4(4), 303, 2013.
- [27]. I. Fajriaty, I. K. Adnyana, I. Fidrianny, "Acute and sub-chronic (28 days) repeated oral toxicity test of ethanol extract of lerak (*Sapindus rarak*. DC) fruits in Wistar rats", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 487-492, 2014.
- [28]. O. T. No, 411, *Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, 4*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2015.
- [29]. A. L. Aneeshkumar, et al., "Sub-chronic oral toxicity assessment (90 days) of ethanolic fraction of leaves of *Neurocalyx calycinus* (R. Br. ex Benn.) Rob. in rodents: A lesser known ethnomedicinal plant from the Cholanaickan tribal community, India", *Interdisciplinary toxicology*, 11(3), 221-235, 2018.
- [30]. U. Albus, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn)*, SAGE Publications Sage UK: London, England, 2012
- [31]. K. Donkor, et al., "Acute and Sub-Chronic Toxicity Studies of aqueous extract of root bark of *Cassia sieberiana* DC in Rodents", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(4), 084-089, 2014.
- [32]. N. Das, et al., "Evaluation of acute and subacute toxicity induced by methanol extract of *Terminalia citrina* leaves in Sprague Dawley rats", *Journal of Acute Disease*, 4(4), 316-321, 2015.
- [33]. S. L. Jothy, et al., "Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice", *Molecules*, 16(6), 5268-5282, 2011.
- [34]. J. Tian, et al., "Oral chronic toxicity study of geniposide in rats", *Journal of ethnopharmacology*, 213, 166-175, 2018.
- [35]. A. P. Coll, I. S. Farooqi, S. O'Rahilly, "The hormonal control of food intake", *Cell*, 129(2), 251-262, 2007.
- [36]. S. Sireeratawong, "Acute and subchronic toxicity study of the water extract from *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels in rats", *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 30(5), 611-619, 2008.
- [37]. M. I. Ezeja, A. O. Anaga, I. U. Asuzu, "Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats", *J Ethnopharmacol*, 151(3), 1155-1164, 2014.
- [38]. G. Francis, et al., "The biological action of saponins in animal systems: a review", *Br J Nutr*, 88(6), 587-605, 2002.
- [39]. J. N. D. Hierro, "The gastrointestinal behavior of saponins and its significance for their bioavailability and bioactivities", *Journal of Functional Foods*, 40, 484-497, 2018.

- [40]. I. A. Abdelhakim, "Botanical and biological study of the leaves of *Caryota mitis* Lour. Family arecaceae cultivated in Egypt", *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, 40(2017), 71-95, 2017.
- [41]. A. O. Ashafa, M. I. Kazeem, "Toxicopathological Evaluation of Hydroethanol Extract of *Dianthus basuticus* in Wistar Rats", *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 348519, 2015.
- [42]. S. Komarnytsky, et al., "Effects of pregnane glycosides on food intake depend on stimulation of the melanocortin pathway and BDNF in an animal model", *J Agric Food Chem*, 61(8), 1841-9, 2013.
- [43]. J. T. Mukinda, P. F. Eagles, "Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats", *J Ethnopharmacol*, 128(1), 236-40, 2010.
- [44]. S. T. Wolford, et al., "Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals", *J Toxicol Environ Health*, 18(2), 161-88, 1986.
- [45]. M. Yakubu, "Hematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem", *Research article*, 3(9), 34-38, 2007.
- [46]. G. Kasarala, "Standard liver tests", *Clin Liver Dis*, 8(1), 13-18, 2016.
- [47]. S. Gowda, "Markers of renal function tests", *N Am J Med Sci*, 2(4), 170-173, 2010.
- [48]. M. Shahjahan, et al., "Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats", *Indian J Med Res*, 120(3), 194-8, 2004.
- [49]. C. A. Burtis, *Tietz textbook of clinical chemistry*, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 1999.
- [50]. S. H. Kim, et al., "Acute oral toxicity of the ethyl acetate fraction of *Orostachys japonicus* in mice", *Pharm Biol*, 52(10), 1345-50, 2014.
- [51]. J. E. Simmons, R. S. Yang, E. Berman, "Evaluation of the nephrotoxicity of complex mixtures containing organics and metals: advantages and disadvantages of the use of real-world complex mixtures", *Environ Health Perspect*, 103(1), 67-71, 1995.
- [52]. T. Oduola, et al., "Hepatotoxicity and nephrotoxicity evaluation in Wistar albino rats exposed to *Morinda lucida* leaf extract", *N Am J Med Sci*, 2(5), 230-3, 2010.
- [53]. M. J. Lee, et al., "A 90-day repeated oral dose toxicity study of *Alismatis rhizoma* aqueous extract in rats", *Toxicological research*, 35(2), 191-200, 2019.
- [54]. R. E. Hodges, D. M. Minich, "Modulation of Metabolic Detoxification Pathways Using Foods and Food-Derived Components: A Scientific Review with Clinical Application", *J Nutr Metab*, 2015, 760689, 2015.

ACUTE AND SUB-CHRONIC TOXICITY STUDIES OF CRUDE ETHANOL EXTRACT OF *Caryota urens* L. (FISHTAIL PALM) FRUIT IN SWISS ALBINO MICE

THI PHUONG NHUNG TRAN

*Institute of Biotechnology and Food-technology, Industrial University of Ho Chi Minh city
tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn*

Abstract. *Caryota urens* L. is widely distributed in the mountainous areas of Vietnam. *C. urens* fruit contains compounds such as alkaloids, flavonoids, phenols, carbohydrates, etc. It has the effect of treating stomach ulcers, migraines, arthritis, etc. This study aimed to evaluate the safety of crude ethanol extract from the fruit of *C. urens* (EtCU) in Swiss albino mice via acute and sub-chronic toxicity tests. In the acute toxicity test, mice were oral once doses of 1000, 3000, 5000 mg EtCU/kg. After administration of the extract, the mice were monitored continuously for the first 4 h, followed by intermittent observation for 24 h. Then observed daily follow-up for 14 days. Abnormal behaviors, signs of poisoning and mortality of mice were observed and recorded. In sub-chronic toxicity test, mice were given oral EtCU at doses of 100, 300, 500 mg/kg for 90 days. EtCU does not cause significant differences in food and water intake consumed, body weight, urinalysis, hematology, biochemistry, relative weight and histology of liver and kidney versus controls. The results indicated that EtCU does not cause acute (1000-5000 mg/kg) or sub-chronic toxicities (100-500 mg/kg) in mice.

Keywords: *Caryota urens* L., acute and sub-chronic, Swiss albino

Ngày gửi bài: 02/07/2021

Ngày chấp nhận đăng: 26/10/2021