

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHỤC HỒI TỔN THƯƠNG GAN CỦA DỊCH CHIẾT TỎI TƯƠI VÀ TỎI ĐEN TRÍCH LY BẰNG CELLULASE TRÊN MÔ HÌNH XƠ GAN DO THIOACETAMIDE

TRẦN GIA BỬU^{1,*}, LÊ TRẦM NGHĨA THU¹, ĐÀM SAO MAI²

¹Viện Công nghệ sinh học-Thực Phẩm, Trường ĐH Công Nghiệp TP. Hồ Chí Minh

²Phòng Quản lý Khoa học và Hợp tác quốc tế, Trường ĐH Công Nghiệp TP. Hồ Chí Minh
trangiabuu@juh.edu.vn

Tóm tắt. Tỏi là một loại gia vị và dược liệu phổ biến trên thế giới. Tác dụng hỗ trợ điều trị các bệnh mãn tính của tỏi đen, một sản phẩm chế biến của tỏi, đã được chứng minh trong các nghiên cứu gần đây. Một nghiên cứu gần đây đã chứng minh quá trình trích ly bằng cellulase sẽ làm tăng hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết tỏi. Tuy nhiên, khả năng chữa trị xơ gan của dịch chiết tỏi đen và tỏi tươi trích ly bằng cellulase lại chưa được đánh giá. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng thioacetamide (300 mg/L trong 10 tuần) tạo mô hình xơ gan và đánh giá tác động hỗ trợ của dịch chiết tỏi đen và tỏi tươi trích ly bằng cellulase lên mô hình xơ gan. Kết quả cho thấy dịch chiết tỏi tươi và tỏi đen trích ly bằng cellulase có khả năng phục hồi tổn thương gan trên mô hình xơ gan do thioacetamide và cải thiện các thông số sinh hóa máu (ALT, AST, ALB), hình thái mô học của gan và hàm lượng hydroxyproline. Mặt khác, nghiên cứu đã chứng minh dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase có khả năng phục hồi tổn thương gan tốt hơn dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase và dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase là một nguồn dược liệu tiềm năng để chữa trị bệnh xơ gan.

Từ khóa. thioacetamide, hydroxyproline, tỏi đen, trích ly bằng cellulase, xơ gan

EVALUATION OF CURATIVE EFFECT OF CELLULASE ASSISTED EXTRACTS OF FRESH AND BLACK GARLICS ON LIVER FIBROSIS MODEL INDUCED BY THIOACETAMIDE

Abstract. Garlic is one of the most popular spices and medicinal plants over the world. Beneficial effects of black garlic, a well-known processed product of garlic, for treatment chronic disease have been proved in several recent studies. The previous study proves that cellulase assisted extraction improves the polyphenol content and antioxidant capacity of garlic extract. However, the curative effect of cellulase assisted extracts of fresh and black garlcs on liver fibrosis has not been elucidated yet. In this study, we used thioacetamide (300 mg/L for 10 weeks) to establish liver fibrosis model and evaluated beneficial effects of cellulase assisted extracts of fresh and black garlcs on hepatic fibrosis model. The results showed that both cellulase assisted extracts of fresh and black garlcs exhibited hepatoprotective effect on fibrosis model induced by thioacetamide and improved the alteration of thioacetamide on plasma biochemical parameters (ALT, AST, ALB) and liver hydroxyproline content, histological structure of liver. On the other hand, this study suggests that cellulase assisted extract of black garlic has stronger curative effect than cellulase assisted extract of fresh garlic, and cellulase assisted extract of black garlic is the prominent remedy for treatment liver fibrosis.

Keyword. thioacetamide, black garlic, hydroxyproline, cellulase-assisted extraction, liver fibrosis

1. GIỚI THIỆU

Tỏi (*Allium sativum* L) là một loại gia vị gắn liền với các món ăn của người Việt và được trồng rộng rãi ở nhiều nơi trên thế giới. Ngoài ra, tỏi còn được biết đến với vai trò là một dược phẩm chữa bệnh với nhiều hoạt tính sinh học quý báu như kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm, bảo vệ tim mạch, chống ung thư... [1]. Những năm gần đây, các nhà khoa học có xu hướng nghiên cứu và xử lý nhiệt để tạo thành tỏi đen, một sản phẩm chế biến từ tỏi tươi, và các sản phẩm chế biến từ tỏi đen nhằm ứng dụng làm thực phẩm chức năng. Bên cạnh việc khắc phục mùi, vị khó chịu của tỏi tươi, hàm lượng các hoạt chất chống oxy hóa trong tỏi đen cao gấp nhiều lần tỏi tươi. Cụ thể, tổng hàm lượng polyphenol của tỏi đen cao hơn 10 lần so với tỏi tươi và hoạt tính chống oxy hóa của tỏi đen cao hơn gần 35 nhiều lần so với tỏi tươi [2]. Ngoài ra, hàm lượng S-allyl-L-cysteine (SAC), một hoạt chất sinh học quan trọng của tỏi đen có tác dụng

chống tiểu đường, kháng viêm, kháng oxy hóa, hỗ trợ điều trị tổn thương gan,... cũng tăng lên gấp nhiều lần trong quá trình lên men. Vì vậy, tỏi đen được xem là một loại thực phẩm chức năng tiềm năng hỗ trợ điều trị các bệnh mãn tính như xơ vữa động mạch, béo phì, ung thư,... [3,4]

Gan là cơ quan chính của cơ thể chịu trách nhiệm trong việc giải độc và chuyển hóa và tổng hợp các chất trong cơ thể. Tuy nhiên việc tiếp xúc với thuốc lá, hóa chất độc hại, virus, rượu dẫn đến tổn thương gan nghiêm trọng và làm suy yếu chức năng của gan dẫn đến các bệnh về gan. Những năm gần đây, tình trạng bệnh nhân mắc các bệnh về gan như viêm gan, xơ gan, ung thư gan... vẫn phổ biến. Số liệu thống kê về số ca tử vong toàn cầu năm 2010 cho thấy khoảng 752,100 ca tử vong do ung thư gan và 307,700 do viêm gan cấp, hơn 1,030,800 ca liên quan đến xơ gan trên toàn thế giới [5]. Một trong những xu hướng nghiên cứu hiện đại là tìm ra các hợp chất oxy hóa có nguồn gốc từ động, thực vật để ứng dụng sản xuất ra các thực phẩm, dược phẩm, thực phẩm chức năng phục vụ cho đời sống. Các chất chống oxy hóa là các hợp chất có khả năng làm chậm lại, ngăn cản, hoặc đảo ngược quá trình oxy hóa các hợp chất có trong tế bào của cơ thể nên có nhiều ứng dụng trong việc phòng và chữa trị nhằm hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị tổn thương gan do độc tố hoặc các gốc oxy hóa. Một số loài được thảo luận như hoa cúc la mã, cây kế sữa, cây xương rồng nopal, cây xương rồng lê gai, tảo spirulina đã được nghiên cứu và chứng minh khả năng bảo vệ gan chống lại tác hại của các gốc oxy hóa và độc tố [6]

Gần đây một số nghiên cứu đã chứng minh khả năng bảo vệ gan của tỏi tươi và tỏi đen. Năm 2014, Shin J.H. và cộng sự (2014) đã chứng minh khả năng bảo vệ gan của dịch chiết tỏi đen trên mô hình gây độc tính gan cấp bởi CCl₄ và D-galectosamine và mô hình tổn thương gan bằng chế độ ăn giàu chất béo. Ở cả ba mô hình, dịch chiết tỏi đen đều giảm hoạt độ men gan (ALT, AST), chỉ số đánh giá tổn thương gan, cũng như giảm sự tích lũy lipid ở mô gan (mô hình chế độ ăn giàu chất béo) hoặc giảm sự xâm nhiễm của các tế bào đơn nhân vào gan (mô hình CCl₄ và D-galectosamine) [7]. Tác động hỗ trợ điều trị của tỏi đen cũng đã được khẳng định trên mô hình tổn thương gan do sử dụng cồn lâu ngày [8]. Theo Trần Gia Bửu và cộng sự, dịch chiết của tỏi đen ly trích bằng phương pháp vi sóng cũng được chứng minh có hoạt tính bảo vệ gan chống lại tác hại của carbon tetrachloride lên mỡ máu, men gan và hình thái mô học của gan trên mô hình động vật tổn thương gan [9]. Thêm vào đó, nghiên cứu của Usmani và cộng sự cũng chứng minh khả năng bảo vệ gan của dịch chiết ethanol của tỏi tươi lên mô hình viêm gan cấp do acetaminophen [10]. Theo Pan và Wu, dịch chiết tỏi tươi khi được trích ly dưới sự hỗ trợ của cellulase có hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa cao hơn so với dịch chiết tỏi không dùng cellulase [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định một số hoạt chất sinh học của dịch chiết tỏi đen và tỏi tươi trích ly bằng cellulase và đánh giá khả năng phục hồi tổn thương gan của dịch chiết tỏi tươi và tỏi đen trích ly bằng cellulase trên mô hình xơ gan do thioacetamide (TAA).

2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP

2.1. Quy trình tạo dịch tỏi đen và tỏi tươi trích ly bằng cellulase

Tỏi tươi nhiều nhánh (*Allium sativum*) được thu mua tại huyện đảo Lý Sơn, Tỉnh Quảng Ngãi vào tháng 6/2017. Sau khi thu mua tỏi, tỏi được bóc vỏ và lên men trong tủ lão hóa (Shellab, Hoa Kỳ) với nhiệt độ 75°C độ ẩm tương đối 90% sau 15 ngày [2]. Sau khi lên men, tỏi đen được nghiền trong nước với tỷ lệ 1:10 (nguyên liệu: nước) bằng máy xay sinh tố. Hỗn hợp nước tỏi đen được ủ với enzyme cellulase (Novozymes, Đan Mạch, 700 EGU/g) với tỷ lệ 0,06% ở nhiệt độ 45°C trong 3 giờ. Hỗn hợp dịch chiết được đun ở nhiệt độ 90°C trong 5 phút nhằm bất hoạt enzyme cellulase. Sau khi bất hoạt enzyme, chúng tôi tiến hành thu nhận dịch chiết bằng phương pháp lọc chân không qua giấy lọc Whatman số 1. Dịch lọc sẽ được chia nhỏ trong các ống ly tâm 50 mL và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng ở các thí nghiệm tiếp theo. Dịch chiết tỏi tươi được trích ly bằng cellulase với quy trình tương tự bằng enzyme cellulase với tỷ lệ nguyên liệu:nước là 1:10. Dịch chiết tỏi đen không xử lý với cellulase được trích theo quy trình trên nhưng không thêm cellulase vào mẫu.

2.2. Xác định hàm lượng polyphenol tổng số của dịch chiết tỏi tươi và tỏi đen trích ly bằng cellulase

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định dựa trên phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu [2]. Dịch chiết tỏi đen (2,4 mL) và trộn với thuốc thử Folin-Ciocalteu (0,15 mL) và 0,45 mL dung dịch 1M Na₂CO₃. Hỗn hợp phản ứng được đặt vào buồng tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau thời gian phản ứng, độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng sẽ được đo ở bước sóng 750 nm bằng máy đo quang UV-Vis (Genesys 20 UV-Vis, Hoa Kỳ). Hàm lượng polyphenol tổng số của mẫu được thể hiện qua mg đương lượng axit gallic trên khối lượng chất khô (mg GAE/g).

2.3. Xác định hàm lượng S-allylcysteine trong dịch chiết tỏi đen và tỏi tươi trích ly bằng cellulase

Hàm lượng SAC trong dịch chiết tỏi đen và tỏi tươi được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS) theo quy trình của Trần Gia Bửu và cộng sự [9]. Việc xác định hàm lượng SAC được tiến hành trên hệ thống HPLC 1200 hãng Agilent (Mỹ) kết nối với máy MicroTOF-Q 10187 mass spectrometer với chế độ nạp mẫu manual (thể tích 20 μ L). Điều kiện sắc ký được điều chỉnh như sau: pha tĩnh là C18 (150mm $\times$ 4,6mm $\times$ 3,5 μ m), ổn nhiệt ở 50°C, pha động gồm pha A là dung dịch nước khử ion chứa 0,1% axit formic và pha B là acetonitrile chứa 0,1% axit formic, tốc độ dòng chảy 0,3mL/phút. Điều kiện khối phổ được điều chỉnh như sau: nguồn ion hóa ESI loại ion dương, chế độ quét từ 50-3,000 m/z . Dữ liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm Bruker Compass Data Analysis 4.0 software.

2.4. Tạo mô hình chuột tổn thương gan bằng thioacetamide

Chuột đực (Swiss albino) 10 tuần tuổi có trọng lượng từ 30-32 g được cung cấp bởi Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh. Sau khi thu mua, chuột được cho ăn thức ăn thương mại (Anifood, Viện Pasteur Nha Trang) và nước máy trong 2 tuần để thích nghi với điều kiện phòng thí nghiệm. Sau giai đoạn thích nghi, chuột được chia ngẫu nhiên thành các lô thí nghiệm, với 5 con mỗi lô thí nghiệm:

- Nhóm đối chứng (ĐC): chuột được uống nước máy trong vòng 18 tuần.
- Nhóm gây bệnh (TAA): chuột được gây bệnh theo phương pháp của Zimmerman và cộng sự [12]. Chuột được cho uống nước có chứa TAA với liều lượng 300 mg/L trong 10 tuần. Sau đó, chuột tiếp tục được cho uống nước máy trong 8 tuần tiếp theo.
- Nhóm điều trị bằng tỏi tươi (TAA+TT): chuột được cho uống nước có chứa TAA với liều lượng 300 mg/L trong 10 tuần. Sau đó, chuột tiếp tục được cho uống dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase với liều lượng 200 mg/kg thể trọng mỗi ngày trong 8 tuần tiếp theo.
- Nhóm điều trị bằng tỏi đen (TAA+TD): chuột được cho uống nước có chứa TAA với liều lượng 300 mg/L trong 10 tuần. Sau đó, chuột tiếp tục được cho uống dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase với liều lượng 200 mg/kg thể trọng mỗi ngày trong 8 tuần tiếp theo.
- Nhóm điều trị bằng Silymarin (TAA+Sily): chuột được cho uống nước có chứa TAA với liều lượng 300 mg/L trong 10 tuần. Sau đó, chuột được cho uống silymarin với liều lượng 50 mg/kg thể trọng mỗi ngày trong 8 tuần [13].

Khi kết thúc thí nghiệm, chuột phải nhịn ăn qua đêm, được gây mê và giải phẫu thu nhận máu từ tim để thực hiện xét nghiệm sinh hóa. Máu chuột được đựng trong ống tráng heparin, bảo quản lạnh ở 4°C và tiến hành phân tích các chỉ số sinh hóa máu. Sau khi lấy máu, chuột được giải phẫu nhanh để thu nhận mô gan. Gan được chia 2 phần, một phần được cố định trong dung dịch formol 4% để thực hiện tiêu bản mô học (nhuộm HE và Masson's trichrome), một phần được bảo quản trong nước muối sinh lý lạnh để xác định hàm lượng hydroxyproline trong mô gan.

2.5. Đánh giá các chỉ số sinh hóa

Tổn thương gan được đánh giá thông qua hoạt độ các enzyme aspartate transaminase (AST) và alanine transaminase (ALT), hàm lượng albumin (ALB) trong huyết tương bằng máy xét nghiệm sinh hóa bán tự động.

2.6. Thực hiện tiêu bản mô học

Mô gan được cố định trong dung dịch formol 4% ít nhất 24 giờ, mẫu được tắm paraffin-xylen, đúc khuôn, cắt thành các lát cắt có độ dày 4-6 μ m. Mẫu được khử paraffin và nhuộm với hematoxylin và eosin hoặc thuốc nhuộm Masson's trichrome, quan sát dưới kính hiển vi để đánh giá mô học.

2.7. Xác định hàm lượng hydroxyproline trong mô gan chuột

Hàm lượng hydroxyproline trong mô gan được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng kết hợp đầu dò DAD (HPLC-UV). Hệ thống HPLC 1200 hãng Agilent (Mỹ) bao gồm bơm đôi hai kênh, lò cột, kết nối với đầu dò DAD, tiêm mẫu manual (thể tích tiêm mẫu 20 μ L), bước sóng hấp thụ 250nm. Điều kiện sắc ký được cài đặt như sau: pha tĩnh là C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μ m), được ổn nhiệt ở 50°C, pha động gồm pha A là dung dịch nước khử ion chứa 0,1% Trifluoroacetic (TFA) và pha B là acetonitril, tốc độ dòng chảy 1mL/phút.

2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày dưới dạng số trung bình (của 3 lần lặp lại) $\pm$ độ lệch chuẩn. Số liệu được phân tích ANOVA bằng phần mềm xử lý số liệu chuyên dụng Statgraphics

Centurion XVI (Statpoint Technologies, Hoa Kỳ). Kiểm định Multiple range test được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt giữa các giá trị với mức độ ý nghĩa là $p < 0.05$.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xác định hàm lượng polyphenol và S-allyl-cysteine trong dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase

Các hợp chất phenol là một nhóm các hợp chất bán tan trong nước, có nhiều trong trái cây và rau quả, với một hoặc nhiều vòng benzene thường được thấy dưới dạng glycoside trong tự nhiên. Tác dụng hỗ trợ điều trị của polyphenol đối với các bệnh tim mạch, ung thư, béo phì, tiểu đường và truyền nhiễm cũng được chứng minh trong nhiều nghiên cứu gần đây [14]. Theo Kim J.H. và cộng sự, quá trình lên men sẽ làm tăng hàm lượng polyphenol và SAC, một hợp chất quan trọng của tỏi đen có nhiều hoạt tính sinh học hỗ trợ điều trị bệnh [15]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng polyphenol của dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase cao hơn 13 lần so với dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase. Đồng thời dịch chiết tỏi đen trích ly bằng có hàm lượng SAC là $283,40 \pm 8,28 \mu\text{g/g}$ chất khô trong khi dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase lại không phát hiện SAC (Bảng 1). Bên cạnh đó, hàm lượng polyphenol của dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase cũng cao hơn dịch chiết tỏi đen không xử lý 1,69 lần. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Pan và Wu, trong đó dịch trích ly tỏi tươi bằng cellulase có hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa cao hơn dịch trích ly tỏi tươi không xử lý. Sự hiện diện của các hoạt chất chống oxy hóa như polyphenol và SAC trong dịch chiết tỏi đen là mở ra khả năng ứng dụng dịch chiết tỏi nhằm chống lại hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến stress oxy hóa, đặc biệt là các bệnh về tổn thương gan do các gốc tự do.

Bảng 1: Hàm lượng polyphenols và SAC trong dịch chiết tỏi tươi và tỏi đen trích ly bằng cellulase

	Dịch chiết tỏi tươi đã xử lý cellulase (n=3)	Dịch chiết tỏi đen không xử lý cellulase (n=3)	Dịch chiết tỏi đen đã xử lý cellulase (n=3)
Hàm lượng polyphenols (mg GAE/g chất khô)	$0,84 \pm 0,08^a$	$6,52 \pm 0,27^b$	$11,02 \pm 0,10^c$
S-Allyl-Cysteine ($\mu\text{g/g}$ chất khô)	KPH	$195,97 \pm 9,27^a$	$283,40 \pm 8,28^b$

Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình mang chữ cái khác nhau có giá trị khác nhau thống kê ($p < 0,05$)

KPH: Không phát hiện

3.2. Tác động của dịch chiết tỏi đen và tỏi tươi lên các chỉ số sinh hóa của máu

Theo Kwo và cộng sự, tổn thương tế bào gan được đặc trưng bởi sự gia tăng alanine aminotransferase (ALT) và aspartate aminotransferase (AST), các enzyme liên quan đến việc chuyển các nhóm amin alanine và aspartate thành axit ketoglutaric [16]. Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy các chỉ tiêu sinh hóa máu ở nhóm chuột mô hình gây bệnh như ALT và AST ($148,78 \pm 20,92 \text{ U/L}$ và $263,92 \pm 24,05 \text{ U/L}$, tương ứng) đều tăng cao so với nhóm đối chứng ($68,90 \pm 5,85 \text{ U/L}$ và $129,06 \pm 9,32 \text{ U/L}$, $p < 0,05$). Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của nhóm tác giả Mustafa H.N. và cộng sự [17]. Theo Mustafa H.N. và cộng sự, các chỉ số hoạt độ ALT, AST trong máu chuột được tiêm màng bụng TAA với liều 300 mg/kg đều tăng so với nhóm đối chứng. Bên cạnh đó, albumin là một protein huyết tương có vai trò quan trọng duy trì áp suất thẩm thấu của máu, và albumin được tạo ra chủ yếu ở gan và giảm dần khi bệnh xơ gan diễn tiến. Trong nghiên cứu này, hàm lượng albumin trong máu chuột được cho uống TAA giảm khoảng 20% so với nhóm chuột đối chứng ($21,32 \pm 0,55$ và $26,36 \pm 0,88 \text{ g/L}$, tương ứng). Trong một nghiên cứu trước đó, Ra S.H. và cộng sự đã chứng minh chuột được tiêm thioacetamide với liều 200 mg/kg thể trọng trong 3 tháng có hoạt độ ALT, AST tăng và hàm lượng ALB giảm so với chuột đối chứng [18]. Các kết quả trên cho thấy mô hình chuột tổn thương gan do thioacetamide đã được thiết lập thành công.

Ở lô chuột tổn thương được điều trị bằng dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase hoặc sylimarin, các thông số về sinh hóa (ALT, AST, ALB) đều trở lại mức bình thường (Bảng 2). Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Sukalingam K và cộng sự, trong đó sylimarin (50 mg/kg thể trọng) được chứng minh có khả năng giảm hoạt độ ALT, AST ở nhóm chuột gây tổn thương gan bằng thioacetamide và điều trị bằng sylimarin [19]. Theo Ahmed (2017), tỏi đen có khả năng bảo vệ gan chống lại tác nhân gây nhiễm độc gan như cyclophosphamide, một loại thuốc kháng ung thư và có tác dụng gây nhiễm độc gan,

đồng thời làm tăng hàm lượng ALB trong máu và giảm hoạt độ AST, ALT [20]. Kết quả nghiên cứu này củng cố bằng chứng về khả năng bảo vệ gan của dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase. Trong khi đó, dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase cải thiện một phần các chỉ số ALT, AST, ALB ($100,10 \pm 10,94$ U/L, $159,00 \pm 8,64$ U/L, $23,90 \pm 0,82$ g/L) so với chuột gây bệnh, nhưng vẫn có khác biệt thống kê với nhóm chuột đối chứng và nhóm điều trị bằng dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase. Điều này cho thấy khả năng phục hồi tổn thương gan của dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase mạnh hơn so với dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase.

Bảng 2: Ảnh hưởng của dịch chiết tỏi đen và tỏi tươi trích ly bằng cellulase lên chức năng gan

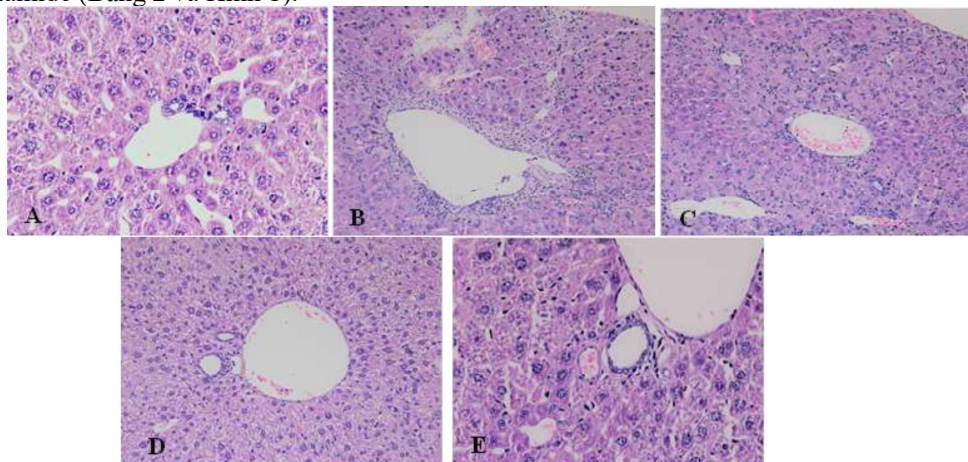
	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALB (g/L)
Nhóm đối chứng (n=5)	$68,90 \pm 5,85^c$	$129,06 \pm 9,32^c$	$26,36 \pm 0,88^c$
Nhóm gây bệnh (n=5)	$148,78 \pm 20,92^a$	$263,92 \pm 24,05^a$	$21,32 \pm 0,55^a$
Nhóm điều trị bằng tỏi tươi (n=5)	$100,10 \pm 10,94^b$	$159,00 \pm 8,64^b$	$23,90 \pm 0,82^b$
Nhóm điều trị bằng tỏi đen (n=5)	$67,70 \pm 6,54^c$	$120,66 \pm 14,37^c$	$25,70 \pm 0,91^c$
Nhóm điều trị bằng silymarin (n=5)	$70,54 \pm 1,78^c$	$129,04 \pm 7,28^c$	$25,86 \pm 0,86^c$

Trong cùng một hàng, các giá trị trung bình mang chữ cái khác nhau có giá trị khác nhau thống kê ($p < 0,05$)

3.3. Kết quả phân tích mô học

Phân tích mô học bằng phương pháp nhuộm HE giúp đánh giá tình trạng viêm và cấu trúc tế bào nhu mô gan và tình trạng tổn thương ở tĩnh mạch. Kết quả nhuộm HE cho thấy bất thường về hình thái mô học ở mô hình chuột gây bệnh bằng TAA so với nhóm chuột đối chứng. Ở chuột cho uống TAA, cấu trúc tế bào gan thay đổi, xuất hiện các tế bào viêm và các tế bào thoái hóa tập trung xung quanh khoảng cửa, có hiện tượng xuất huyết, tĩnh mạch trung tâm bị phá vỡ, các tế bào xâm nhập khoảng cửa (Hình 1). Kết quả trên tương đồng với nghiên cứu Abdul-Hamid M và cộng sự, điều đó chứng tỏ nhóm nghiên cứu đã tạo mô hình chuột tổn thương gan bằng thioacetamide thành công [21].

Mặt khác khi điều trị bằng silymarin hoặc dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase, cấu trúc của các tế bào nhu mô gan được bảo vệ, không xuất hiện tình trạng viêm ở gan (Hình 1D và 1E). Trong khi đó, mô gan ở nhóm điều trị bằng dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase vẫn còn vài vị trí có sự xâm nhiễm của tế bào viêm (Hình 1C). Từ đó, ta có thể kết luận dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase có khả năng bảo vệ gan hiệu quả hơn dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase trên mô hình tổn thương gan do thioacetamide (Bảng 2 và Hình 1).



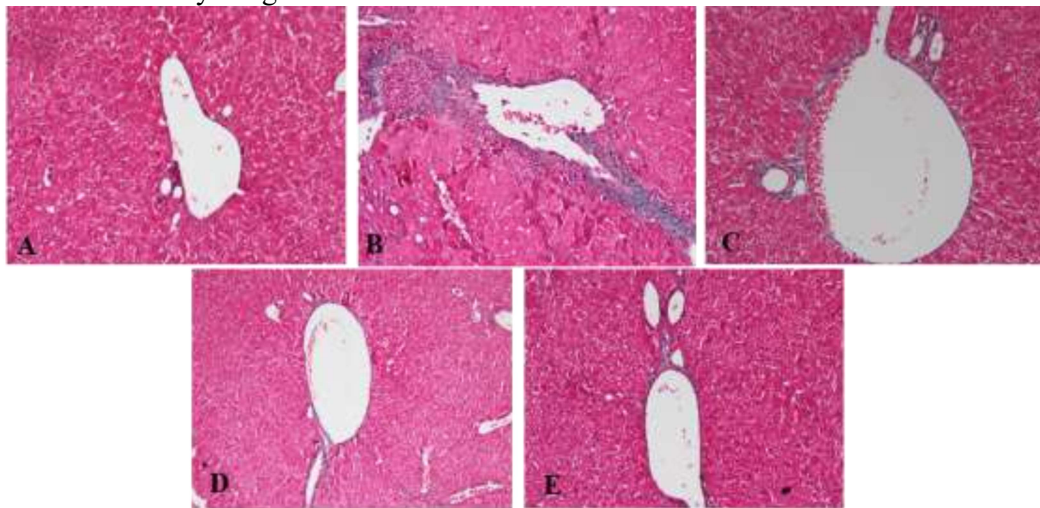
Hình 1. Hình ảnh tiêu bản vi thể gan nhuộm bằng thuốc nhuộm HE. Nhóm chuột đối chứng (A), nhóm chuột gây tổn thương gan bằng thioacetamide (B), nhóm chuột gây tổn thương bằng thioacetamide kết hợp điều trị bằng dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase (C), dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase (D), và điều trị bằng silymarin (E).

3.4. Kết quả nhuộm Masson's trichrome và hàm lượng hydroxyproline

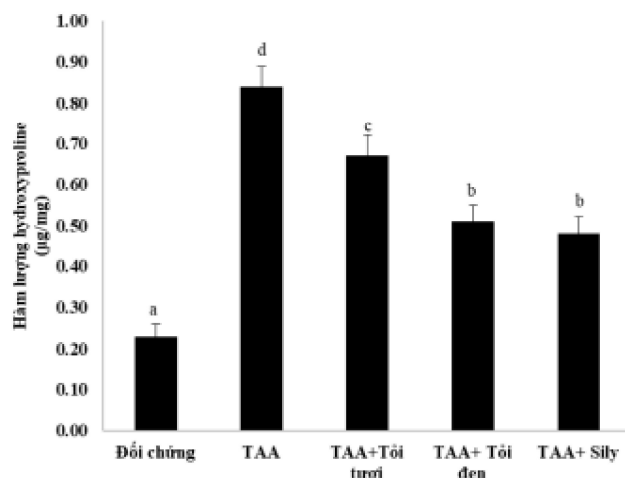
Mật độ và sự phân bố của các sợi collagen trong mô gan được đánh giá thông qua phương pháp nhuộm Masson's trichrome [21]. Kết quả nhuộm Masson's trichrome cho thấy mô gan ở chuột uống TAA có các sợi collagen dày (màu xanh dương), liên kết với nhau thành dây xơ kéo dài nổi các khoảng cửa, tạo thành các vách xơ (fibrous septa), khoảng cửa biến dạng, tĩnh mạch cửa bị phá vỡ, các tế bào gan không còn hình dạng bình thường, điều đó chứng tỏ gan có dấu hiệu bị xơ hóa (Hình 2B). Trong khi đó mô gan ở

chuột đối chứng, khoảng cửa bình thường và chỉ có một lượng nhỏ collagen tích tụ xung quanh tĩnh mạch trung tâm (Hình 2A). Kết quả phân tích mô học của mô gan chuột điều trị dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase cho thấy mô gan ở nhóm chuột điều trị bằng dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase có khoảng cửa bình thường và một ít collagen tích lũy quanh khoảng cửa và tĩnh mạch trung tâm. Hình thái mô học của gan chuột điều trị bằng dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase tương đương kết quả của nhóm chứng dương—thuốc điều trị silymarin (Hình 2D và 2E). Trong khi đó, hình thái mô học của gan chuột ở nhóm điều trị bằng dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase cho thấy sự phục hồi về hình thái khoảng cửa và tĩnh mạch trung tâm, tuy nhiên mô gan nhưng vẫn còn tình trạng xung huyết trong mạch máu và một lượng collagen tương đối tích tụ quanh khoảng cửa quanh tĩnh mạch trung tâm.

Bên cạnh đó, hàm lượng hydroxyproline trong mô gan, một trong những axit amino có nhiều nhất trong collagen và sự hiện diện của hydroxyproline ở chất nền ngoại bào được tạo ra bởi các tế bào stellate gan hoạt hóa (HSC) là một chỉ thị sinh học (biomarker) liên hệ chặt chẽ với diễn tiến quá trình xơ gan. Hàm lượng hydroxyproline trong mô gan của các nhóm chuột thí nghiệm được đánh giá và trình bày ở Hình 3 [22, 23] Trong các nhóm chuột thí nghiệm, nhóm đối chứng có hàm lượng hydroxyproline nhỏ nhất với $0,23 \pm 0,03 \mu\text{g/mg}$ trọng lượng gan trong khi nhóm chuột cho uống TAA có hàm lượng hydroxyproline lớn nhất với $0,84 \pm 0,05 \mu\text{g/mg}$ trọng lượng gan ($p < 0,05$). Hàm lượng hydroxyproline trong mô gan chuột điều trị bằng dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase và silymarin đều tương đương nhau ($0,51 \pm 0,04$ và $0,48 \pm 0,04 \mu\text{g/mg}$ trọng lượng gan, tương ứng). Hàm lượng hydroxyproline của hai nhóm đều lớn hơn chuột đối chứng nhưng nhỏ hơn nhóm chuột gây bệnh, điều này cho thấy mô gan ở nhóm chuột điều trị bằng dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase và silymarin đã phục hồi một phần và ít bị xơ hóa hơn so với nhóm gây bệnh. Hàm lượng hydroxyproline ở nhóm điều trị bằng dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase lại cao hơn nhóm điều trị với dịch chiết tỏi đen trích ly bằng tỏi đen ($0,67 \pm 0,05$ và $0,51 \pm 0,04 \mu\text{g/mg}$ trọng lượng gan, tương ứng) nhưng lại thấp hơn nhóm gây bệnh. Điều đó chứng tỏ dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase cũng có khả năng phục hồi tổn thương gan gây ra bởi thioacetamide nhưng khả năng phục hồi của dịch chiết tỏi tươi thấp hơn dịch chiết tỏi đen (Hình 3). Theo kết quả phân tích thành phần dịch chiết tỏi đen và tỏi tươi trích ly bằng cellulase, hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học như polyphenol và SAC của dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase lại cao hơn nhiều lần so với dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase, điều này góp phần giải thích khả năng bảo vệ gan và phục hồi tổn thương hiệu quả của dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase.



Hình 2. Đánh giá mô học bằng thuốc nhuộm Masson's trichrome. Nhóm chuột đối chứng (A), nhóm chuột gây tổn thương gan bằng thioacetamide (B), nhóm chuột gây tổn thương bằng thioacetamide kết hợp điều trị bằng dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase (C), dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase (D), và điều trị bằng silymarin (E).



Hình 3. Hàm lượng hydroxyproline của mô gan ở các nhóm chuột thí nghiệm

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định hàm lượng polyphenol và SAC của dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase là $11,02 \pm 0,10$ mg GAE/g chất khô và $283,40 \pm 8,28$ µg/g chất khô trong khi hàm lượng polyphenol của dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase là $0,84 \pm 0,08$ mg GAE/g chất khô. Mô hình tổn thương gan do thioacetamide được thiết lập thành công, với sự gia tăng hoạt độ ALT, AST trong máu và hàm lượng hydroxyproline của mô gan tăng cao, hàm lượng ALB trong máu giảm. Đồng thời, hình thái vi thể mô gan ở nhóm chuột sử dụng thioacetamide bất thường với khoảng cửa xơ hóa và các tế bào viêm xâm nhiễm, collagen tích tụ và kéo dài thành các dây xơ. Dịch chiết tỏi tươi và tỏi đen trích ly bằng cellulase có khả năng phục hồi tổn thương gan do thioacetamide và cải thiện các thông số sinh hóa máu (ALT, AST, ALB), hình thái mô học của gan và hàm lượng hydroxyproline trong mô gan. Bên cạnh đó, dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase có khả năng phục hồi tổn thương gan tốt hơn dịch chiết tỏi tươi trích ly bằng cellulase. Nghiên cứu này đã cho thấy dịch chiết tỏi đen trích ly bằng cellulase là một nguồn dược liệu tiềm năng để chữa trị bệnh xơ gan.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học-Thực phẩm đã hỗ trợ máy móc thiết bị để hoàn thành các nội dung nghiên cứu trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Shang, S.Y. Cao, X.Y. Xu, et al. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*, 8, 7, 246, 2019.
- [2] Nguyễn Thị Hoàng Yến, Trần Gia Bửu. Ảnh hưởng của độ ẩm và nhiệt độ lên hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính kháng oxy hóa của tỏi đen sản xuất từ tỏi tươi đã bóc vỏ. *Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ, Trường ĐH Công Nghiệp TP. HCM*, 31, tr. 88-96, 2018.
- [3] Z. Gong, H. Ye, Y. Huo, L. Wang, Y. Huang, M. Huang, X. Yuan. S-allyl-cysteine attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by targeting STAT3/SMAD3 pathway. *American journal of translational research*, 10, 5, pp.1337-1346, 2018.
- [4] S. Kimura, Y.C. Tung, M.H. Pan, Y.J. Lai, K.C. Cheng. Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application. *J Food Drug Anal*, 25, 1, pp62-70, 2017.

- [5] R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, pp. 2095–2128, 2012.
- [6] E. Madrigal-Santillán, E. Madrigal-Bujaidar, I. Álvarez-González, et al. Review of natural products with hepatoprotective effects. *World journal of gastroenterology*, 20, 40, pp. 14787-14804, 2014.
- [7] J. H. Shin, C.W. Lee, S.J. Oh et al., Hepatoprotective effect of aged black garlic extract in rodents. *Toxicol Res*, 30, 1, pp. 49–54, 2014.
- [8] M.H. Kim, M.J. Kim, J.H. Lee et al. Hepatoprotective effect of aged black garlic on chronic alcohol-induced liver injury in rats. *J Med Food*, 14, 7-8, pp. 732-738, 2011.
- [9] G.B. Tran, S.M. Dam, N.T.T. Le. Amelioration of Single Clove Black Garlic Aqueous Extract on Dyslipidemia and Hepatitis in Chronic Carbon Tetrachloride Intoxicated Swiss Albino Mice, *International Journal of Hepatology*, 2018, 9383950, pp. 1-9, 2018.
- [10] S. Usmani, H. Qureshi, A. Zaheer (2019). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Allium sativum* var. *Leshsun gulabi* on acetaminophen induced acute hepatitis in male albino rats. *Pakistan Journal of Physiology*, 15, 1, pp. 32-36, 2019.
- [11] S. Pan, S. Wu (2014). Cellulase-assisted extraction and antioxidant activity of the polysaccharides from garlic. *Carbohydrate Polymers*, 111, pp. 606-609.
- [12] T. Zimmermann, H. Franke, R. Dargel. Studies on lipid and lipoprotein metabolism in rat liver cirrhosis induced by different regimens of thioacetamide administration, *Experimental pathology*, 30, pp. 109 – 117, 1986.
- [13] M.G. Pour, N. Mirazi, H. Alaei, S. Moradkhani, Z. Rajaei, A.M. Esfahani, A. M. Effects of lactulose and silymarin on liver enzymes in cirrhotic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 95, 5, pp. 522 – 529, 2017.
- [14] H. Rasouli, M.H. Farzaei, R. Khodarahmi. Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, pp. 1700-1741, 2017.
- [15] J.H. Kim, S.H. Yu, Y.J. Cho et al. Preparation of S-allyl cysteine-enriched black garlic juice and its antidiabetic effects in streptozotocin-induced insulin-deficient mice, *J. Agric. Food Chem*, 65, 2, pp. 358-363, 2017.
- [16] P.Y. Kwo, S.M. Cohen, J.K. Lim. ACG clinical guideline: evaluation of abnormal liver chemistries. *American Journal of Gastroenterology*, 112, 1, pp. 18–35, 2016.
- [17] H.N. Mustafa, S.A. El-Awdan S.A., G.A. Hegazy. Protective role of antioxidants on thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy: biochemical and ultrastructural study. *Tissue Cell*, 45, 5, pp. 350-362, 2013.
- [18] S.H. Ra, R.H. Shin, H.C. Ri, J.H. Ri, H.C. Ri, A.J. Ri. Effect of lesimarin against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rat. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, e17821, 2019.
- [19] K. Sukalingam, K. Ganesan, B. Xu. Protective effect of aqueous extract from the leaves of *Justicia tranquebariensis* against thioacetamide-induced oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7, 7, 78, 2018.
- [20] R.A. Ahmed. Hepatoprotective and antiapoptotic role of aged black garlic against hepatotoxicity induced by cyclophosphamide. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79, 8, 2018.
- [21] M. Abdul-Hamid, R.R. Ahmed, N. Moustafa, R. Nady. The antifibrogenic effect of etanercept on development of liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *Ultrastructural pathology*, 41, 1, pp. 23-35, 2017.

- [22] Y. Toyoki, M. Sasaki, S. Narumi, S. Yoshihara, T. Morita, M. Konn. Semiquantitative evaluation of hepatic fibrosis by measuring tissue hydroxyproline. *Hepatogastroenterology*, 45, pp. 2261-4, 1998.
- [23] S.A. Gabr, A.H. Alghadir, Y.E. Sherif, A.A. Ghfar(2017) Hydroxyproline as a Biomarker in Liver Disease, in *Biomarkers in Liver Disease. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications*, V. Patel ,V. Preedy,Eds. Springer, Dordrecht, 2017.

Ngày nhận bài: 23/01/2020

Ngày chấp nhận đăng: 13/05/2020