

ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH TRÍCH CÂY RAU SAM (*Portulaca oleracea* L.) LÊN SỰ ỨC CHẾ HÌNH THÀNH TINH THỂ CALCIUM OXALATE GÂY BỆNH SỎI THẬN TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO*

Nguyễn Phạm Tuấn¹, Bằng Hồng Lam³, Lê Thảo Nguyên², Trần Đức Tài²

¹ Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang

² Gachon University

³ Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Nghiên cứu “Ảnh hưởng của dịch trích cây Rau sam (*Portulaca oleracea* L.) lên sự ức chế hình thành tinh thể Calcium oxalate gây bệnh sỏi thận trong điều kiện *in vitro*” được thực hiện để đánh giá khả năng ức chế tinh thể Calcium oxalate, gồm 03 giai đoạn chính là hình thành, phát triển và ngưng tụ. Mẫu cây Rau sam được ly trích bằng phương pháp ngâm dầm với ethanol 80% để tạo cao chiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ ẩm của mẫu đạt 86,67%, và hiệu suất cao chiết đạt 3,58%. Cao chiết cây Rau sam có sự hiện diện của các hợp chất flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, tanin và phenol. Cao chiết cây Rau sam có khả năng ức chế hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate với giá trị IC_{50} là 3,69 mg/mL. Cao chiết cây Rau sam có hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate và giá trị IC_{50} của cao chiết đạt 3,09 mg/mL. Cuối cùng, Cao chiết cây Rau sam có khả năng ức chế ngưng tụ của tinh thể Calcium oxalate và giá trị IC_{50} đạt 1,31 mg/mL.

Từ khóa: Calcium oxalate, cây rau sam, ngưng tụ, phát triển, sỏi thận.

MỞ ĐẦU

Trên thế giới có khoảng 12% dân số đang gặp các vấn đề về sỏi thận (Thomas, Han, 2005). Sỏi thận là các tinh thể dạng rắn, cứng được hình thành ở thận, sỏi thận có 4 dạng: sỏi Calcium oxalate và sỏi Calcium phosphate hoặc là hỗn hợp sỏi thận của cả hai loại tinh thể (chiếm 85%), sỏi struvite, sỏi uric acid và hiếm nhất là sỏi cysteine. Trong đó tinh thể calcium oxalate là thành phần chính của hơn 60% các trường hợp sỏi thận ở người và tinh thể tồn tại ở hai dạng chính là Calcium oxalate monohydrate (COM) và Calcium oxalate dihydrate (COD). Trong cơ thể người, sỏi thận có 2 dạng kích thước: nhỏ và lớn. Sỏi có kích thước nhỏ, cơ thể người có thể thải ra ngoài mà không gây ảnh hưởng đến sức khỏe người bệnh. Ngược lại, sỏi có kích thước lớn có thể làm tắc nghẽn đường tiết niệu gây đau cho bệnh nhân (Atodariya *et al.*, 2013). Hiện nay, trên thị trường có một số tân dược có khả năng điều trị sỏi thận và tân dược có nguồn gốc tự nhiên giúp tăng cường chức năng của thận và giúp thận bài tiết sỏi thận nhưng không có khả năng điều trị sỏi thận dưới dạng sỏi Calcium oxalate. Ngoài ra, các biện pháp y khoa có hiệu quả trong việc điều trị sỏi Calcium oxalate nhưng có nguy cơ tái phát là 50% và gây nhiều tác dụng phụ như tổn thương mạch máu ở thận và các cơ quan xung quanh, tăng nguy cơ cao huyết áp,... (McAteer *et al.*, 2008; Trần Đức Tài, 2016). Trong các loại thảo dược, rau sam (*Portulaca oleracea* L.) cũng có khả năng điều trị bệnh về một thuốc hạ sốt, chống xơ cứng, sát trùng, chống co thắt, lợi tiểu, tiết niệu và sỏi thận (Gholamreza *et al.*, 2010). Xuất phát từ thực tiễn đó, đề tài: “Ảnh hưởng của dịch trích cây Rau sam (*Portulaca oleracea* L.) lên sự ức chế hình thành tinh thể Calcium oxalate gây bệnh sỏi thận trong điều kiện *in vitro*” nhằm đánh giá hiệu quả ức chế hình thành tinh thể Calcium oxalate gây sỏi thận của cây dược liệu hướng tới tạo ra sản phẩm có được tính phòng và điều trị bệnh.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu cây rau sam được thu từ vườn dược liệu của Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang, tỉnh An Giang. Hóa chất và thiết bị gồm máy đo quang phổ, máy đông khô chân không, Sodium oxalate, Sodium citrate, Tris HCl, Calcium chloride,... hóa chất và thiết bị cần thiết khác.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tạo cao chiết từ Cây Rau sam

Cây Rau sam được rửa sạch, loại bỏ những lá bị sâu bệnh hại và đông khô bằng máy đông khô chân không và nghiền thành bột mịn. 200 g mẫu lá khô ngâm với ethanol 80% với tỷ lệ dung môi và nguyên liệu là 1:10 (w/v), ở nhiệt độ phòng, trong 72 giờ và để trong tối để tránh quá trình oxy hóa. Sau đó, dịch trích được thu bằng cách lọc qua giấy lọc, thu dịch lọc, cô quay chân không dịch lọc ở 50°C để đuổi dung môi và đông khô bằng máy đông khô chân không để thu cao chiết và bảo quản ở -20°C và thực hiện các thí nghiệm.

Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết Cây Rau sam

Tiến hành định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cao chiết theo Yadav và đồng tác giả (2014) (Bảng 1).

Khảo sát khả năng ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate của cao chiết Cây Rau sam (Phatak *et al.*, 2015). Chuẩn bị CaCl_2 4 mM và $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 50 mM trong buffer gồm Tris 0,05 M và NaCl 0,15 M ở pH = 6,5. Quá trình phân tích, 950 μL CaCl_2 được trộn với 100 μL cao chiết và mẫu đối chứng là nước cất. Quá trình tạo hạt nhân sỏi Calcium oxalate được bắt đầu khi hỗn hợp phản ứng với 950 μL natri oxalate. Lắc đều hỗn hợp trong 2-3 phút và đo độ hấp thụ ở $\lambda = 620 \text{ nm}$.

$$\% \text{Ức chế} = \frac{(C-S) \times 100\%}{C}$$

Trong đó: C: OD của mẫu đối chứng; S: OD của mẫu có cao chiết.

Chất chuẩn được sử dụng để so sánh hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân, phát triển và ngưng tụ của tinh thể Calcium oxalate là chất Natri citrate. Đánh giá hiệu quả ức chế dựa vào IC_{50} .

Bảng 1. Định tính hợp chất trong cao chiết ethanol của Cây Rau sam

Hợp chất	Thực nghiệm	Hiện tượng
Alkaloid (Mayer)	1mL dịch trích + vài giọt TT Mayer	Kết tủa màu nâu
Flavonoid	1mL dịch trích + 2mL $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ 10%	Xuất hiện màu vàng
Saponin (Foam)	3mL dịch trích+ 6mL H_2O → đun nóng	Xuất hiện bọt
Steroid (Salkowski)	1mL dịch trích + 2mL CHCl_3 + 2mL H_2SO_4 đậm đặc	Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp
Tannin và phenol (Braymer)	0,5mL dịch trích + 10mL H_2O + 2-3 giọt FeCl_3 0,1%	Kết tủa xanh dương đen
Terpenoid	2mL dịch trích + 2mL $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ + 2-3 giọt H_2SO_4 đậm đặc	Xuất hiện màu đỏ đậm

Khảo sát khả năng ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate của cao chiết Cây Rau sam (Chaudhary *et al.*, 2010). Phản ứng được thực hiện bằng cách thêm lần lượt 1 mL CaCl_2 4 mM và 1 mL natri oxalate 4 mM vào 1,5 mL dung dịch buffer chứa NaCl (90 mM) và Tris HCl (10 mM) ở pH = 7,2. Sau đó, thêm vào hỗn hợp 30 μL tinh thể COM (1,5 mg/mL) chuẩn bị trong buffer natri acetate 50 mM (pH = 5,7). Mẫu đối chứng: phản ứng giữa CaCl_2 và $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ diễn ra trong 10 phút. Thêm 0,5 mL nước cất (0,5 mL cao chiết) và đo ở bước sóng $\lambda = 214 \text{ nm}$ để xác định độ giảm của gốc oxalate tự do ban đầu. Đo giá trị OD mỗi phút 1 lần và vẽ đồ thị tính hệ số góc. Trong đó: C: hệ số góc của chất ức chế; S: hệ số góc của chất đối chứng.

$$\% \text{Ức chế phát triển} = \frac{C-S}{C} \times 100\%$$

Khảo sát hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate của cao chiết Cây Rau sam (Saha *et al.*, 2013). Trộn đều hỗn hợp gồm CaCl_2 và Natri oxalate nồng độ 50 mM, ủ trong nhiệt độ 60°C trong 1 giờ nhằm tinh thể cân bằng, ổn định và làm mát ở 37°C qua đêm. Hỗn hợp được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút, thu phần cặn và được tinh thể COM và bảo quản ở 4°C . Tinh thể COM được hòa tan trong buffer gồm Tris 0,05 M và NaCl 0,15 M (pH = 6,5), nhiệt độ 37°C ở máy khuấy từ và nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL. Thêm 500 μL nước cất (0,5 mL cao chiết). Đo độ hấp thụ của mẫu ở bước sóng $\lambda = 620 \text{ nm}$ vào khoảng thời gian 30, 60, 90, 180 và 360 phút. Trong đó: Si: hệ số góc chất ức chế; Sc: hệ số góc chất đối chứng.

$$\% \text{Ức chế ngưng tụ} = 1 - \frac{\text{Si}}{\text{Sc}} \times 100\%$$

Phương pháp thống kê

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và các giá trị trung bình được trình bày dưới dạng sai số chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phương pháp tạo cao chiết từ Cây Rau sam

Quy trình trích cao được thực hiện với nguồn nguyên liệu Cây Rau sam là 400 gram (khô), độ ẩm của Cây Rau sam là 86,67% và hiệu suất chiết cao đạt 3,58% (Bảng 2). Hiệu suất trích cao của Cây Rau sam cao hơn so với nghiên cứu của Gholamreza và đồng tác giả (2010) đạt 2,57% (w/w), nguyên nhân là do sử dụng phương pháp trích ly là ngâm dầm nhưng dung môi sử dụng là nước nên hiệu suất thu hồi thấp hơn phương pháp trích ly sử dụng dung môi là ethanol 80%.

Bảng 2. Độ ẩm, hiệu suất chiết và định tính hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết cây Rau sam

Chỉ tiêu theo dõi	Kết quả	Định tính
Khối lượng mẫu tươi (g)	3.000	Saponin (+)
Độ ẩm (%)	86,67	Flavonoid (+)
Khối lượng mẫu khô (g)	400	Terpenoids (+)
Khối lượng cao khô (g)	15,39	Alkaloid (+)
Hiệu suất chiết (%)	3,58	Tanin và phenol (+)
		Steroid (-)

Ghi chú: '+' : dương tính và '-' : âm tính.

Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết cây Rau sam

Cao chiết cây Rau sam có sự hiện diện của các hợp chất alkaloid, terpenoid, saponin, triterpenes, flavonoid, tanin và phenol (Bảng 2) và tương đồng Agarwal và Varma (2014) khi định tính cao chiết cây Rau sam. Theo Saranya và đồng tác giả (2014), hợp chất saponin, flavonoid và terpenoids có khả năng ức chế sự hình thành và làm tan tinh thể Calcium oxalate.

Khảo sát khả năng ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate của cao chiết cây Rau sam

Sỏi hình thành được phải có nhân. Nhân là những dị vật (chỉ không tiêu, mảnh cao su. ống dẫn lưu, mảnh kim khí), tế bào thoái hóa, tế bào mũ, xác vi khuẩn, tổ chức hoại tử, khối máu hóa giáng... Theo Randall (1973) đưa ra thuyết mảng vôi ở biểu mô xoang thận (mảng Randall). Nếu thấp thận bình thường, sẽ khó hình thành sỏi. Ở nồng độ Natri citrate 10 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân của tinh thể Calcium oxalate đạt $88,10 \pm 0,14\%$ (sự hình thành của hạt nhân là $11,90 \pm 0,27\%$), kể đến là ở nồng độ natri citrate 8 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân của tinh thể Calcium oxalate đạt $80,62 \pm 0,48\%$ và thấp nhất ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân của tinh thể Calcium oxalate đạt 0% (Bảng 3). Tiến hành xây dựng đường thể hiện khả năng ức chế hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate và suy ra giá trị IC_{50} của Natri citrate là 1,03 mg/mL.

Bảng 3. Kết quả ức chế hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate sau khi ức chế bằng Natri citrate

Nồng độ (mg/mL)	Phần trăm ức chế hạt nhân tinh thể COM (%)	Phần trăm ức chế phát triển tinh thể COM (%)	Phần trăm ức chế ngưng tụ tinh thể COM (%)
0	0 ^l	0 ^l	0 ^l
0,25	$30,42^k \pm 0,39$	$29,29^k \pm 0,56$	$20,60^k \pm 0,65$
0,50	$39,48^h \pm 0,51$	$39,84^h \pm 0,51$	$35,13^h \pm 0,14$
0,75	$45,42^g \pm 0,42$	$44,55^g \pm 0,55$	$40,11^g \pm 0,22$
1	$49,55^f \pm 0,57$	$54,10^f \pm 0,43$	$44,77^f \pm 0,71$
2	$53,47^e \pm 0,47$	$59,70^e \pm 0,56$	$49,99^e \pm 0,80$
4	$65,16^d \pm 0,50$	$65,15^d \pm 0,22$	$53,32^d \pm 0,23$
6	$75,29^c \pm 0,46$	$69,98^c \pm 0,12$	$57,18^c \pm 0,47$
8	$80,62^b \pm 0,48$	$75,29^b \pm 0,15$	$60,47^b \pm 0,36$
10	$88,10^a \pm 0,14$	$79,97^a \pm 0,21$	$63,61^a \pm 0,13$

Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%.

Bảng 4. Kết quả hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate sau khi ức chế bằng cao chiết cây Rau sam

Nồng độ (mg/mL)	Phần trăm ức chế hạt nhân tinh thể COM (%)	Phần trăm ức chế phát triển tinh thể COM (%)	Phần trăm ức chế ngưng tụ tinh thể COM (%)
0	0 ^l	0 ^l	0 ^k
0,25	19,54 ^k ± 0,55	17,58 ^k ± 0,12	19,20 ^h ± 0,40
0,50	31,38 ^h ± 0,70	33,33 ^h ± 0,20	35,42 ^g ± 1,30
0,75	36,88 ^g ± 0,53	40,49 ^g ± 0,22	40,23 ^f ± 0,24
1	42,59 ^f ± 0,86	49,59 ^e ± 0,30	49,62 ^d ± 0,44
2	49,83 ^e ± 0,11	54,32 ^d ± 0,15	55,32 ^c ± 0,23
4	53,16 ^d ± 0,36	59,17 ^c ± 0,20	63,48 ^b ± 0,28
6	57,59 ^c ± 0,50	64,52 ^b ± 0,32	72,19 ^a ± 0,09
8	68,74 ^b ± 0,54	71,62 ^a ± 0,44	44,44 ^e ± 0,31
10	73,25 ^a ± 0,13	46,89 ^f ± 0,37	39,02 ^f ± 0,33

Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%.

Ở nồng độ cao chiết cây Rau sam 10 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân của tinh thể Calcium oxalate đạt 73,25 ± 0,13% (sự hình thành của hạt nhân là 26,75 ± 0,63%), kể đến ở nồng độ cao chiết cây Rau sam 8 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân của tinh thể Calcium oxalate đạt 68,74 ± 0,54% và thấp nhất ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân của tinh thể Calcium oxalate đạt 0% (Bảng 3). Tiến hành xây dựng đường thể hiện khả năng ức chế hình thành hạt nhân Calcium oxalate và giá trị IC₅₀ của cao chiết là 1,76 mg/mL.

Hiệu quả ức chế sự hình thành sỏi thận Calcium oxalate của cao chiết và Natri citrate được đánh giá qua giá trị IC₅₀. Kết quả, giá trị IC₅₀ của cao chiết 1,76 mg/mL cao hơn IC₅₀ của Natri citrate là 0,95 mg/mL. Nguyên nhân là do Natri citrate là một loại hợp chất hóa học kết hợp mạnh với ion Ca²⁺ tạo thành muối tan giảm mật độ của tinh thể nhanh chóng hơn so với cao chiết (Gupta *et al.*, 2011). Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Pareta và đồng tác giả (2011), cao chiết *A. indica* Linn đạt 67,36% tại mức nồng độ 20%. Nirmaladevi và đồng tác giả (2012) cho rằng dịch trích hoa *H. rosa-sinensis* Linn ức chế hình thành hạt nhân đạt khoảng 30% tại nồng độ 1.400 µg/mL. Agarwal và đồng tác giả (2015) khả năng ức chế cao nhất đạt 60,06 ± 0,19% của cao chiết *A. aspera* L. tại 1.000 µg/mL, 49,93 ± 0,07% của cao chiết *B. pinnatum* Lam. ở nồng độ 1.000 µg/mL. Trần Đức Tài (2016), giá trị IC₅₀ của cao chiết lá và thân cây Bùm sùm đạt IC₅₀ = 1,76 mg/mL cho hiệu quả ức chế hình thành hạt nhân tinh thể Calcium oxalate.

Khảo sát khả năng ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate của cao chiết cây Rau sam

Ở nồng độ Natri citrate 10 mg/mL, hiệu quả ức chế phát triển của tinh thể Calcium oxalate đạt 79,97 ± 0,21%; kể đến ở nồng độ natri citrate 8 mg/ mL, hiệu quả ức chế phát triển hiệu quả ức chế phát triển của tinh thể Calcium oxalate đạt 75,29 ± 0,15%; thấp nhất, ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể Calcium oxalate đạt 0%. Tiến hành xây dựng đường biểu diễn thể hiện khả năng ức chế sự phát triển tinh thể Calcium oxalate và suy ra giá trị IC₅₀ của Natri citrate là 0,45 mg/mL (Bảng 3).

Ở nồng độ cao chiết 8 mg/mL, hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate đạt 71,62 ± 0,44%; kể đến ở nồng độ cao chiết 6 mg/ mL, hiệu quả ức chế phát triển hiệu quả ức chế phát triển của tinh thể Calcium oxalate đạt 64,52 ± 0,32%; Thấp nhất, ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể Calcium oxalate đạt 0% (Bảng 3). Tiến hành xây dựng đường thể hiện khả năng ức chế sự phát triển tinh thể Calcium oxalate của cao chiết cây Rau sam và suy ra giá trị IC₅₀ của cao chiết là 1,5 mg/mL.

Để đánh giá được hiệu quả ức chế sự hình thành sỏi thận Calcium oxalate, giá trị IC₅₀ thường được sử dụng, Natri citrate có IC₅₀ = 0,45 mg/mL thấp hơn IC₅₀ của cao chiết là 1,5 mg/mL nên Natri citrate có khả năng ức chế mạnh quá trình phát triển là do Natri citrate hình thành các hợp chất tan với ion calcium và ion oxalate là giảm khả năng hình thành sỏi (Gupta *et al.*, 2011). Kết quả này cao hơn Nirmaladevi và đồng tác giả (2012), cao chiết nước của *H. rosa-sinensis* Linn. đạt hiệu quả ức chế sự phát triển dưới 35% ở mức nồng độ 1.400 µg/mL và Kalpana và đồng tác giả (2013), cao chiết ethanol thân cây *B. cultivar Monthan* đạt hiệu quả 70% ức chế sự phát triển hạt nhân ở nồng độ 1.600 µg/mL. Trần Đức Tài (2016), giá trị IC₅₀ của cao chiết lá và thân cây Bùm sùm đạt IC₅₀ = 1,5 mg/mL cho hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate.

Khảo sát hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate của cao chiết cây Rau sam

Ở nồng độ Natri citrate 10 mg/mL, hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể Calcium oxalate đạt 63,61 ± 0,13%; kể đến ở nồng độ Natri citrate 8 mg/mL, hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể Calcium oxalate đạt 60,47 ± 0,36%. Thấp nhất, ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate đạt 0% (Bảng 3). Tiến hành

xây dựng đường thể hiện khả năng ức chế sự ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate và suy ra giá trị IC_{50} của Natri citrate là 1,13 mg/mL.

Ở nồng độ cao chiết cây Rau sam 6 mg/mL, hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể Calcium oxalate đạt $72,19 \pm 0,09\%$; kể đến ở nồng độ cao chiết 4 mg/mL, hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể Calcium oxalate đạt $63,48 \pm 0,28\%$; Thấp nhất, ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể Calcium oxalate đạt 0% (Bảng 3). Tiến hành xây dựng đường thể hiện khả năng ức chế sự ngưng tụ tinh thể Calcium oxalate của cao chiết cây Rau sam và suy ra giá trị IC_{50} của cao chiết là 0,8 mg/mL.

Để đánh giá được hiệu quả ức chế ngưng tụ sỏi Calcium oxalate, giá trị IC_{50} thường được sử dụng để đánh giá hiệu quả của cao chiết và Natri citrate, Natri citrate có $IC_{50} = 1,13$ mg/mL cao hơn IC_{50} của cao chiết là 0,8 mg/mL. Nguyên nhân là do Natri citrate có khả năng ức chế mạnh giai đoạn phát triển của sỏi Calcium oxalate bằng cách tan với ion oxalate, còn giai đoạn ngưng tụ sỏi Calcium oxalate, hiệu quả ức chế ngưng tụ thấp hơn (Gupta *et al.*, 2011). Kết quả này cao hơn của Vyawahare và đồng tác giả (2014), cao chiết lá cây *M. Charantia* L. đạt hiệu quả ức chế hơn 30% ở nồng độ 500 μ g/mL. Nghiên cứu Agarwal và đồng tác giả (2015) *P. niruri* L. đạt mức $58,62\% \pm 0,02\%$. Trần Đức Tài (2016), giá trị IC_{50} của cao chiết lá và thân cây Bùm sụm đạt $IC_{50} = 0,8$ mg/mL cho hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể Calcium oxalate.

THẢO LUẬN

Trong quá trình tạo cao chiết, dung môi ethanol 80% được sử dụng cho quá trình ly trích, nguyên nhân là do nếu sử dụng nước làm loại dung môi duy nhất để ly trích thì dẫn đến mẫu trích nhiễm nhiều tạp chất như các acid hữu cơ, đường và các loại protein tan trong nước ảnh hưởng tới quá trình định tính hay định lượng các hợp chất thiên nhiên. Ngoài ra, nếu sử dụng cồn tuyệt đối sẽ giảm hiệu suất chiết cao do ethanol khó thấm vào mẫu. Vì vậy, sử dụng ethanol 80% làm dung môi sẽ tạo một môi trường tối ưu cho việc ly trích, tăng sự tiếp xúc mẫu và dung môi, tăng hiệu suất trích ly và cuối cùng bảo quản mẫu khỏi các loại vi sinh vật (Bandar *et al.*, 2013). Theo Saranya và đồng tác giả (2014), các hợp chất saponin, flavonoid và terpenoids có khả năng ức chế sự hình thành và làm tan sỏi Calcium oxalate. Saponin có các đặc tính chống kết tinh bằng cách ngăn cản quá trình của mucoprotein, các chất thúc đẩy quá trình kết tinh (Joshi *et al.*, 2005b). Flavonoid ức chế sự kết tinh canxi oxalate ở nước tiểu của người cũng như trong các mô hình động vật và lắng đọng tinh thể.

Các hợp chất muối citrate là các chất ức chế quá trình hình thành sỏi Calcium oxalate và Calcium phosphate. Chúng tạo thành các phức chất với các ion Calcium nên làm giảm nồng độ của tinh thể Calcium oxalate. Ngoài ra, Citrate cũng tăng hiệu quả ức chế ngưng tụ và kết tinh của sỏi bằng cách tăng hoạt tính của các urine macromolecule như là THP và giảm sự biểu hiện của urinary osteopontin, một thành phần quan trọng của hệ thống protein liên quan tới sự hình thành sỏi tiết niệu. Natri citrate hay Kali citrate giúp tăng độ hòa tan của acid uric, do đó ngăn ngừa sự kết tủa của muối Calcium oxalate (Gupta *et al.*, 2011). Vì vậy, Natri Citrate được sử dụng như chất chuẩn cho các thí nghiệm ức chế quá trình hình thành sỏi Calcium oxalate gồm ba giai đoạn chính: hạt nhân, phát triển và ngưng tụ. Cao chiết ethanol cây Rau sam có khả năng ức chế sự hình thành của sỏi Calcium oxalate. Tinh thể COD có ái lực so với màng tế bào thấp hơn so với tinh thể COM, nên khó bám vào màng tế bào gây sỏi thận, dễ dàng loại thải qua đường tiết niệu và không gây tổn thương đến hệ thống tiết niệu. Tinh thể COM có thể chuyển thành tinh thể COD hay giảm mật số là do sự hiện diện của các hợp chất thiên nhiên thuộc nhóm flavonoid (Agarwal *et al.*, 2015). Do đó, ở mẫu có cao chiết chủ yếu có sự xuất hiện của tinh thể COM với mật độ thấp là do cao chiết có chứa các hợp chất flavonoid, saponin và terpenoid.

Cao chiết ethanol cây Rau sam có khả năng ức chế sự phát triển của sỏi Calcium oxalate bằng cách bao phủ bên ngoài các hạt tinh thể nên ngăn cản khả năng kết hợp của chúng, ngoài ra các hợp chất thiên nhiên còn tương tác và ngăn cản sự kết hợp của ion Calcium và ion Oxalate, ngăn ngừa sự phát triển của sỏi (De Cógáin *et al.*, 2015). Khi tăng hiệu quả ức chế lên 6 mg/mL hiệu quả ức chế giảm là do cao chiết gia tăng sự hình thành của các tinh thể COD lên và giảm sự hình thành của COM, những tinh thể COD không có ái lực lớn nên có thể dễ dàng có thể loại thải ra ngoài, giảm nguy cơ sỏi thận nên cao chiết của rau sam có khả năng ức chế phát triển.

Ngưng tụ là một bước quan trọng trong quá trình hình thành sỏi, ở giai đoạn này các tinh thể nhỏ sẽ kết tụ lại bằng một lực liên kết hóa học hay tĩnh điện, làm kích thước sỏi lớn dần và không thể đào thải ra ngoài cơ thể, dẫn đến hình thành sỏi thận. Cao chiết cây Rau sam có khả năng ức chế mạnh giai đoạn này là do các hợp chất thiên nhiên trong cao chiết bao phủ bên ngoài các tinh thể khiến chúng không thể kết tụ lại với nhau, thêm vào đó cây rau sam có chứa các hợp chất saponin, terpenoid là những chất có khả năng ức chế sự hình thành sỏi bằng cách tương tác ức chế với các mucoprotein, nguyên nhân chính gây sự quá bão hòa của các tinh thể Calcium oxalate, khiến chúng ngưng tụ tạo nên sỏi, nên hiệu quả ức chế của cao chiết sẽ tăng lên khi được nghiên cứu ở động vật. Tuy nhiên khi tăng mức nồng độ của cao chiết lên cao, hiệu quả ức chế giảm là do cao chiết gia tăng sự hình thành của các tinh thể COD lên nhiều lần, giảm sự hình thành của COM, nhưng những tinh thể COD không có ái lực lớn nên có thể dễ dàng có thể loại thải ra ngoài, không những thế giảm sự quá bão hòa của tinh thể Calcium oxalate trong cơ thể, giảm nguy cơ sỏi thận nên cao chiết của cây rau sam có khả năng ức chế ngưng tụ (Atmani *et al.*, 2000).

Hoạt tính chống sỏi thận của chiết xuất ethanol của cây Rau sam với liều (100, 200 và 400 mg/kg trọng lượng cơ thể) đã được nghiên cứu bằng ethylene glycol (0,75% v/v) và ammonium clorua (2% w/v) gây ra mô hình sỏi tiết niệu ở chuột bạch trong 15 ngày và cystone (đối chứng). Kết quả cho thấy, điều trị bằng chiết xuất ethanol của cây Rau sam đã khôi phục tất cả các thông số sinh hóa tăng cao bao gồm huyết thanh và nước tiểu (canxi, creatinine, urê, BUN), khôi phục pH nước tiểu về mức bình thường và tăng lượng nước tiểu đáng kể ($P < 0,05$) khi so sánh với nhóm kiểm soát bệnh. Các nghiên cứu mô bệnh học đã xác nhận sự khởi phát của bệnh sỏi gan do sự lắng đọng vi tinh thể được quan sát thấy ở phần thận từ động vật được điều trị bằng ethylene glycol và ammonium clorua. Điều này đã được giảm, sau khi điều trị với chiết xuất ethanol của cây Rau sam (Kishore *et al.*, 2012).

Một số cây thuốc có thể ức chế sỏi tiết niệu bằng nhiều cơ chế bao gồm: duy trì cân bằng tinh thể-keo bằng cách giảm bài tiết canxi niệu, oxalate, uric acid, phospho và protein trong sỏi tiết niệu, cải thiện chức năng thận bằng cách tăng bài tiết urê và creatinine, hoạt động chống oxy hóa tiềm năng làm giảm tổn thương tế bào biểu mô ống thận khi tiếp xúc với oxalate hoặc CaOx, do đó, việc mất tính toàn vẹn màng sau đó tạo điều kiện cho việc giữ lại các tinh thể canxi oxalate và sự phát triển của sỏi trong ống thận và hoạt động ức chế lợi tiểu và ức chế hoạt động enzyme ACE (Ali, 2018).

KẾT LUẬN

Cao chiết ethanol của cây Rau sam có khả năng ức chế sự hình thành, phát triển, ngưng tụ và làm tan tinh thể Calcium oxalate gây bệnh sỏi thận trong điều kiện *in vitro*. Tiếp tục nghiên cứu đánh giá hiệu quả của cao chiết trong điều kiện *in vivo* và phân tách các hợp chất có khả năng ức chế tinh thể Calcium oxalate từ cao chiết cây Rau sam.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh An Giang và Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang đã tạo điều kiện và hỗ trợ về kinh phí, thời gian để nhóm thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agarwal K, Varma R (2014). Investigating Antiuroliathatic Potential of *Phyllanthus niruri* L. A Member of the Family Euphorbiaceae. *Ame J Phytomed Clin Therapeut* 2(7): 823-831.
- Agarwal K, Varma R (2015). In-vitro Calcium oxalate crystallization inhibition by *Achyranthes aspera* L. and *Bryophyllum pinnatum* Lam. *Brit J Pharma Res* 5(2): 146.
- Atmani F, Khan SR (2000). Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Bju Int* 85(6): 621-625.
- Atodariya U, Barad R, Upadhyay S, Upadhyay U (2013). Anti-Urolithiatic Activity of *Dolichos Biflorus* Seeds. *J Pharmacog Phytochem* 2(2): 209-213.
- Bandar H, Hijazi A, Rammal H, Hachem A, Saad AZ, Badran B (2013). Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese *Urtica Dioica*. *Ame J Phytomed Clin Therapeut* 6: 507-513.
- Chaudhary A, Singla SK, Tandon C (2010). In vitro evaluation of *Terminalia arjuna* on calcium phosphate and calcium oxalate crystallization. *Ind J Pharma Sci* 72(3): 340.
- De Cógáin MR, MP Linnes, Lee HJ, Krambeck AE, Mendonça Uchôa JC, Kim SH, Lieske JC (2015). Aqueous extract of *Costus arabicus* inhibits calcium oxalate crystal growth and adhesion to renal epithelial cells. *Urolithiasis* 43(2): 119-124.
- Gupta M, Bhayana S, Sikka SK (2011). Role of urinary inhibitors and promoters in calcium oxalate crystallisation. *Int J Res Pharm Chem* 1: 793-8.
- Kalpna S, Nirmaladevi R, Rai TS, Karthika P (2013). Inhibition of Calcium oxalate crystallization *in vitro* by extract of *Banana cultivar monthan*. *Int J P Pharma Sci* 5(4): 649-653.
- Thomas B, Han J (2005). An overview on Urolithialis. *Urothilialis Surgery* (Oxford): 23: 129-133.
- McAteer JA, Evan AP (2008). The acute and long-term adverse effects of shock wave lithotripsy. *In Seminars in nephrology* 28(2): 200-213.
- Nirmaladevi R, Kalpna S, Kavitha D, Padma PR (2012). Evaluation of antilithiatic potential of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn, *in vitro*. *J Pharma Res* 5(8): 4353-4356.
- Pareta SK, Patra KC, Harwansh R (2011). In-vitro Calcium oxalate crystallization inhibition by *Achyranthes indica* linn. Hydroalcoholic extract: An approach to antilithiasis. *Int J Pharma Bio Sci* 2: 432-437.
- Phatak RS, Hendre AS (2015). In-vitro antiuroliathatic activity of *Kalanchoe pinnata* extract. *Int J Pharmacog Phytochem Res* 7: 275-279.

- Saha S, Ramtej JV (2013). Inhibition of calcium oxalate crystallisation *in vitro* by an extract of *Bergenia ciliata*. *Arab J Urol* 11: 187-192.
- Saranya R, Geetha N (2014). Inhibition of Calcium Oxalate (Caox) Crystallization In Vitro by The Extract of Beet Root (*Beta Vulgais* L.). *Int J Pharma Pharma Sci* 6(2): 361-365.
- Gholamreza K, Alireza K, Abbas O, M Kalantari, J Babaei, E Taghiabadi, Bibi MR (2010). Protective Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Portulaca oleracea* against Cisplatin induced Nephrotoxicity. *Iran J Basic Med Sci* 13(2): 31-35.
- Trần Đức Tài (2016). Ảnh hưởng của dịch trích lá và thân cây Bìm sủm (*Carmona microphylla* L.) lên sự ức chế hình thành tinh thể Calcium oxalate gây bệnh sỏi thận trong điều kiện *in vitro*. Luận văn tốt nghiệp Đại học, ngành Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.
- Vyawahare JN, Shelke PA, Aragade PD, DG Baheti (2014). Inhibition of Calcium Oxalate Crystallization *in vitro* by Extract of *Momordica Charantia* Linn. *Int J Pharma Chem Sci* 3(2): 448-452.
- Yadav M, S Chatterji, SK Gupta, Watal G (2014). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *Int J Pharma Pharma Sci* 6(5): 539-542.

INHIBITION OF CALCIUM OXALATE CRYSTALLISATION CAUSING KIDNEY STONES IN VITRO BY AN EXTRACT OF *Portulaca oleracea* L.

Nguyen Pham Tuan¹, Bang Hong Lam³, Le Thao Nguyen² and Tran Duc Tai²

¹ Biotechnology An Giang center

² Gachon University

³ An Giang University, Viet Nam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

“Inhibition of calcium oxalate crystallisation causing kidney stones in vitro by an extract of *Portulaca oleracea*” was conducted to inhibit the formation of Calcium oxalate, including three main phases: nucleation, growth, and aggregation is conducted The plant samples were extracted by maceration method with ethanol 80%. The results showed that moisture and the yield of *Portulaca oleracea* extract were 80.2% and 6.8%. *Portulaca oleracea* extract has the presence of bioactive compounds such as alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, tannin and phenol. *Portulaca oleracea* extract has the ability to inhibit nucleation of Calcium oxalate crystallisation with an IC₅₀ value of 3.69 mg/mL. *Portulaca oleracea* extract has a significant inhibitory effect the growth of Calcium oxalate crystallisation and the IC₅₀ value of the extract extract reaches 3.09 mg/mL. Finally, *Portulaca oleracea* extract has capable of inhibiting the aggregation of Calcium oxalate crystallisation and IC₅₀ values of 1.31 mg/mL.

Keywords: Aggregation, calcium oxalate, growth, nucleation, *Portulaca oleracea*.