

# **ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH TRÍCH RAU DỆU (*Alternanthera sessilis*) LÊN SỰ ỨC CHẾ HÌNH THÀNH VÀ LÀM TAN TÍNH THỂ CANXI OXALAT GÂY BỆNH SỎI THẬN *IN VITRO***

NGUYỄN THỊ ÁI LAN <sup>(1)</sup>, NGUYỄN PHẠM TUẤN <sup>(2)</sup>

## **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Sỏi tiết niệu là quá trình hình thành sỏi trong thận, bàng quang và niệu đạo. Sự ngưng tụ của các chất hòa tan từ nước tiểu như canxi, oxalat, photphat và acid uric dẫn đến hình thành sỏi thận. Sỏi tiết niệu đã trở thành căn bệnh phổ biến thứ ba về đường tiết niệu ảnh hưởng đến khoảng 12% dân số thế giới với tỷ lệ tái phát ngày càng cao ở nam giới so với nữ giới. Canxi oxalat (CaOx) là thành phần chủ yếu của hầu hết các loại sỏi tiết niệu, chiếm hơn 80% các loại sỏi và 20% còn lại chủ yếu bao gồm struvite, cysteine và acid uric [1]. Sỏi thận xảy ra do nhiều yếu tố như dư thừa các thành phần hình thành sỏi (canxi oxalat, canxi photphat, struvit, cystine và acid uric), sự mất cân bằng giữa các chất thúc đẩy (natri urat) và các chất ức chế như glycosaminoglycans và citrat [2]. Xử trí sỏi tiết niệu phụ thuộc vào kích thước và vị trí của sỏi. Thuốc lợi tiểu thiazid và citrat kiềm được sử dụng phổ biến trong dự phòng tái phát sỏi niệu. Sỏi lớn hơn 5 mm hoặc sỏi không đi qua được nên được điều trị bằng các thủ thuật can thiệp, chẳng hạn như lấy sỏi qua nội soi, tán sỏi bằng sóng xung kích ngoài cơ thể, nội soi niệu quản hoặc cắt thận qua da,... Các thủ thuật này tốn kém cho bệnh nhân và có liên quan đến tỷ lệ tái phát cao, thường lên đến 60% và có dẫn đến các biến chứng như: chấn thương thận cấp. Xu hướng hiện nay là tìm kiếm các loại thảo dược có khả năng điều trị sỏi thận, ít tác dụng phụ, dễ tìm và giá cả phù hợp trong việc hỗ trợ và điều trị các bệnh liên quan đến sỏi tiết niệu. Rau dệu (*Alternanthera sessilis*) là dược liệu được sử dụng để hỗ trợ và điều trị một số bệnh như kháng khuẩn, kháng viêm, kháng virus, kháng ung thư, sỏi tiết niệu,...[3]. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả ức chế và làm tan tính thể CaOx gây bệnh sỏi thận; góp phần tạo nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất các sản phẩm có khả năng hỗ trợ và điều trị bệnh.

## **2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu**

Rau dệu được thu thập tại vùng trồng rau màu của huyện Chợ Mới, An Giang. Hóa chất và thiết bị gồm máy đo quang phổ UV-Vis (Human, Hàn Quốc), máy đông khô chân không (Eyala, Nhật Bản), natri oxalat (Sigma, Mỹ), natri citrat, Tris. HCl (hydroxymethyl amino methan hydro clorua), natri clorua, canxi clorua (Merck, Mỹ)... hóa chất và thiết bị cần thiết khác.

Rau dệu được tiến hành thu mẫu vào tháng 6/2022, khi cây rau dệu được 2 tháng tuổi và tiến hành phân loại hình thái học theo Đỗ Huy Bích [4].

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Phương pháp tạo cao chiết rau dệu**

Rau dền được tiến hành rửa sạch và loại bỏ phần bị bệnh, sấy khô ở 50°C trong 96 giờ và nghiền thành bột mịn. 300 g mẫu bột được ngâm dầm với ethanol 70% với tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1:10 (w/v), ở nhiệt độ 50°C, trong 72 giờ và để trong tối để tránh quá trình oxy hóa. Sau đó, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Whatman có đường kính 0,45 µm, thu dịch lọc và bỏ phần cặn. Phần dịch lọc được cô quay chân không để đuổi dung môi và đông khô để thu cao chiết và bảo quản ở -20°C.

### 2.2.2. Định tính các hợp chất sinh học của cao chiết rau dền

**Bảng 1.** Định tính hợp chất trong cao chiết rau dền theo Yadav [5]

| Hợp chất                   | Thực nghiệm                                                                                                | Hiện tượng                       |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Alkaloid (Mayer)           | 1mL dịch trích + vài giọt TT Mayer                                                                         | Kết tủa màu nâu                  |
| Flavonoid                  | 1mL dịch trích + 2mL Pb(OAc) <sub>4</sub> 10%                                                              | Xuất hiện màu vàng               |
| Saponin (Foam)             | 3mL dịch trích + 6mL H <sub>2</sub> O → đun nóng                                                           | Xuất hiện bọt                    |
| Steroid (Salkowski)        | 1mL dịch trích + 2mL CHCl <sub>3</sub> + 2mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc                        | Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp |
| Tannin và phenol (Braymer) | 0,5mL dịch trích + 10mL H <sub>2</sub> O + 2-3 giọt FeCl <sub>3</sub> 0,1%                                 | Kết tủa xanh dương đen           |
| Terpenoid                  | 2mL dịch trích + 2mL (CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O + 2-3 giọt H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đậm đặc | Xuất hiện màu đỏ đậm             |

### 2.2.3. Phân tích hàm lượng flavonoid và phenolic của cao chiết rau dền

Hàm lượng flavonoid tổng theo Pieme *et al.* (2014) [6]: hút 0,1 mL quercetin, thêm vào 0,3 mL nước cất, 0,03 mL NaNO<sub>2</sub> 5%. Ủ 5 phút ở 25°C, thêm 0,03 mL AlCl<sub>3</sub> 10%. Ủ thêm 5 phút, thêm 0,2 mL NaOH 1 mM và nước cất để tổng thể tích là 1 mL. Đo mật độ hấp thụ trên máy quang phổ UV-Vis ở bước sóng 510 nm. Hàm lượng flavonoid tổng theo công thức:  $C = c * V/m$ .

Trong đó: C: hàm lượng flavonoid tổng (mg quercetin/g cao chiết); c: giá trị x được xác định từ đường chuẩn với quercetin (mg/mL); V: thể tích dịch chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong V (g).

Hàm lượng phenolic tổng theo Yadav và Agarwala (2011) [7]: 1 mL dung dịch acid gallic vào 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và để phản ứng trong 5 phút; thêm tiếp vào 2 mL dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%. Sau 45 phút phản ứng ở nhiệt độ phòng, đo mật độ hấp thụ trên máy quang phổ UV-Vis ở bước sóng 765 nm. Hàm lượng phenolic tổng theo công thức:  $P = a * V/m$ .

Trong đó: P: hàm lượng phenolic tổng (mg acid gallic /g cao chiết); a: giá trị x được xác định từ đường chuẩn (µg/mL); V: thể tích dung dịch cao chiết (mL); m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

#### 2.2.4. Khả năng ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx [8]

Dung dịch  $\text{CaCl}_2$  ở nồng độ 4 mM và  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  ở nồng độ 50 mM trong dung dịch đệm gồm Tris 0,05 M và NaCl 0,15 M ở pH = 6,5. Phản ứng 950  $\mu\text{L}$  canxi clorua trộn với 100  $\mu\text{L}$  cao chiết và mẫu đối chứng (nước cất). Quá trình tạo hạt nhân sỏi CaOx được bắt đầu khi hỗn hợp phản ứng với 950  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ . Lắc đều trong 2-3 phút và sự tạo thành tinh thể CaOx. % ức chế hạt nhân =  $[(C-S)/C] \times 100$ .

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

#### 2.2.5. Khả năng ức chế sự phát triển của tinh thể CaOx [9]

Phản ứng 1 mL  $\text{CaCl}_2$  4 mM và 1 mL  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  4 mM vào 1,5 mL dung dịch đệm chứa NaCl (90 mM) và Tris HCl (10 mM) ở điều kiện pH = 7,2. Sau đó, thêm vào hỗn hợp 30  $\mu\text{L}$  tinh thể CaOx (1,5 mg/mL) chuẩn bị trong dung dịch đệm natri acetat 50 mM (pH = 5,7). Phản ứng giữa  $\text{CaCl}_2$  và  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  với tinh thể hạt nhân dẫn tới sự phân bố CaOx trên bề mặt tinh thể, trong 10 phút, thêm 0,5 mL cao chiết và đo ở bước sóng  $\lambda = 214$  nm. Đo giá trị OD mỗi phút 1 lần và vẽ đồ thị tính hệ số góc. Thực hiện tương tự với natri nitrat. % ức chế phát triển =  $[(C-S)/C] \times 100$ .

Trong đó: C: hệ số góc chất ức chế; S: hệ số góc chất đối chứng.

#### 2.2.6. Hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx [10]

Trộn đều hỗn hợp gồm  $\text{CaCl}_2$  và  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  cùng ở nồng độ 50 mM, ủ ở nhiệt độ 60°C trong 1 giờ nhằm tạo ra các tinh thể đồng đều và ổn định, làm mát ở 37°C qua đêm, ly tâm với tốc độ 5.000 vòng/phút và trong 10 phút, thu phần cặn (tinh thể CaOx) và bảo quản tinh thể ở nhiệt độ 4°C. Tinh thể CaOx hòa tan trong dung dịch đệm gồm Tris HCl 0,05 M và canxi clorua 0,15 M được chuẩn bị ở pH = 6,5, nhiệt độ 37°C và nồng độ cuối cùng là 1 mg/mL. Thêm 500  $\mu\text{L}$  nước cất và đo độ hấp thụ ở  $\lambda = 620$  nm vào khoảng thời gian 30, 60, 90, 180 và 360 phút. % ức chế ngưng tụ =  $(1-S_i/S_c) \times 100$ .

Trong đó:  $S_i$ : hệ số góc chất ức chế;  $S_c$ : hệ số góc chất đối chứng.

#### 2.2.7. Khả năng làm tan tinh thể CaOx bằng phương pháp chuẩn độ [11]

Chuẩn bị sỏi CaOx dạng viên: Trộn 500  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  0,1 M pH = 6 (ở 25°C) và 500  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  0,1 M vào ống eppendorf (1,5 mL), giữ trong 30 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng, ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút và loại bỏ phần dịch, thu phần cặn, rửa bằng 1 mL nước cất, lắc đều hỗn hợp và ly tâm lần 2. Cuối cùng, loại bỏ phần dịch và sấy các ống ở tủ sấy ở 70°C trong 3 giờ và cân khối lượng các ống nhựa lần 2 để tính khối lượng CaOx tinh thể.

Màng bán thấm của vỏ trứng gà được loại bỏ phần vỏ canxi bên ngoài bằng cách ngâm trong dung dịch HCl 2M qua đêm, rửa sản phẩm với nước cất và đục một lỗ nhỏ trên phần đỉnh vỏ để loại bỏ phần dung dịch bên trong. Rửa sạch với nước cất và ngâm trong dung dịch amoniac trong 1 giờ, rửa với nước cất. Trữ lạnh ở 4°C ở pH = 7-7,4.

Cân 20 mg tinh thể CaOx và 100 mg cao chiết (hoặc natri citrat), cho vào màng bán thấm và ngâm vào trong bình tam giác chứa 100 ml dung dịch đệm Tris 0,1 M. Đối chứng âm chỉ gồm 20 mg tinh thể CaOx được gói trong màng bán thấm, ủ nhiệt độ 37°C trong 7-8 giờ. Sau đó, chuyển toàn bộ dung dịch trong màng bán thấm vào trong ống nghiệm, thêm 2 mL dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N và chuẩn độ bằng KMnO<sub>4</sub> 0,01N cho đến khi màu hồng nhạt không đổi xuất hiện. Theo Zarrow [12], 1 mL dung dịch KMnO<sub>4</sub> 0,01N tương đương với 0,2 mg canxi còn lại trong dung dịch. Phần trăm lán tan tinh thể CaOx được tính theo công thức: % tinh thể tan = (M1-M2)/M1 x 100%.

Trong đó: M1: khối lượng tinh thể ban đầu; M<sub>2</sub>: khối lượng tinh thể sau khi lán tan.

### 2.3. Phương pháp thống kê

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và thống kê bằng phần mềm Statgraphics plus 16.0. Phân tích sự khác biệt giữa các giá trị trung bình theo phép thử LSD hoặc Duncan. Phân tích Anova một nhân tố ở mức ý nghĩa p=0,05%. Số liệu được trình bày dưới dạng  $\pm$  sai số chuẩn.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Kết quả tạo cao chiết rau dệu

Độ ẩm của rau dệu là 63,45% và hiệu suất chiết cao đạt 6,09% (bảng 2). Trong quá trình tạo cao chiết, dung môi ethanol 80% được sử dụng, nguyên nhân là do nếu sử dụng nước làm loại dung môi để ly trích thì mẫu trích nhiễm nhiều tạp chất như các acid hữu cơ, đường và protein tan trong nước ảnh hưởng tới quá trình định tính hay định lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học. 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 bảo quản mẫu khỏi các vi sinh vật [13].

**Bảng 2.** Độ ẩm và hiệu suất chiết của cao chiết rau dệu.

| Chỉ tiêu theo dõi                       | Kết quả |
|-----------------------------------------|---------|
| Khối lượng mẫu tươi (g)                 | 2000    |
| Độ ẩm (%)                               | 64,87   |
| Khối lượng mẫu khô sử dụng trích ly (g) | 200     |
| Khối lượng cao khô (g)                  | 11,42   |
| Hiệu suất chiết (%)                     | 5,71    |

### 3.2. Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết rau dệu

Cao chiết rau dệu có sự hiện diện của các hợp chất alkaloid, terpenoid, saponin, flavonoid, tannin và phenol (bảng 1) và tương tự nghiên cứu Ravi [14]. Theo Saranya [15], các hợp chất saponin, flavonoid và terpenoids có khả năng ức chế sự hình thành và làm tan tinh thể CaOx. Saponin có các đặc tính chống kết tinh bằng cách ngăn cản quá trình của mucoprotein, các chất thúc đẩy quá trình kết tinh. Flavonoid ức chế sự kết tinh CaOx ở nước tiểu của người cũng như trong các mô hình động vật và lắng đọng tinh thể.

### 3.3. Phân tích hàm lượng flavonoid và phenolic

Hàm lượng phenolic và flavonoid của cao chiết rau dệu được tính dựa vào phương trình đường chuẩn gallic acid ( $y = 0,0049x + 0,0127$  với hệ số  $R^2 = 0,9985$ ) và quercetin ( $y = 0,0054x + 0,0185$  với hệ số  $R^2 = 0,9992$ ). Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng của cao chiết rau dệu đạt lần lượt là 69,45 mg gallic acid/g cao chiết và 47,89 mg quercetin/cao chiết. Kết quả nghiên cứu thấp hơn nghiên cứu của Soon và Lee [16], cao chiết rau dệu với dung môi là nước và ethanol 90%. Hàm lượng phenolic và flavonoid của rau dệu trích ly bằng nước là 116,50 mg gallic acid/g cao chiết và 31,80 mg quercetin/cao chiết. Hàm lượng phenolic và flavonoid của rau dệu trích ly bằng ethanol 90% là 140,10 mg gallic acid/g cao chiết và 43,09 mg quercetin/cao chiết.

### 3.4. Hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx

Sự hình thành sỏi gồm 3 bước quan trọng là hình thành hạt nhân (Nucleation), phát triển (Growth) và ngưng tụ (Aggregation) và 3 bước này có thể tiến hành trong điều kiện *in vitro* [17]. Do đó phương pháp phân tích CaOx sẽ gồm 3 thí nghiệm phân tích: hạt nhân (Nucleation assay), sự phát triển (Growth assay) và sự ngưng tụ (Aggregation Assay) [18]. Trong phản ứng phân tích hạt nhân, phương pháp phân tích được thực hiện theo Nirmaladevi [17], NaOx sẽ được trộn với cao chiết, nước cất hoặc chất đối chứng dương natri citrat và sẽ được bổ sung  $\text{CaCl}_2$  sau đó. Phản ứng nhằm để đánh giá khả năng của cao chiết ức chế sự hình thành hạt nhân canxi oxalat monohydrat (COM) và chuyển hóa COM đã hình thành thành tinh thể canxi oxalat dihydrat (COD).

Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx của natri citrat, phương trình đường chuẩn:  $y = 18,098x + 24,015$ ;  $R^2 = 0,9523$  và suy ra giá trị  $\text{IC}_{50}$  của natri citrat là 1,44 mg/mL (bảng 3).

Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx của cao chiết rau dệu, phương trình đường chuẩn,  $y = 5,1315x + 32,99$ ;  $R^2 = 0,9656$  và suy ra giá trị  $\text{IC}_{50}$  của cao chiết là 3,31 mg/mL (bảng 3).

Các hợp chất muối citrat là các chất ức chế quá trình hình thành sỏi canxi oxalat và canxi phosphat. Chúng tạo thành các phức chất với các ion canxi nên làm giảm nồng độ của tinh thể canxi oxalat. Ngoài ra, citrat cũng tăng hiệu quả ức chế ngưng tụ và kết tinh của sỏi bằng cách tăng hoạt tính của các urin đại phân tử như là THP và giảm sự biểu hiện của osteopontin tiểu, một thành phần quan trọng của hệ

thống protein liên quan tới sự hình thành sỏi tiết niệu. Natri citrat hay kali citrat giúp tăng độ hòa tan của acid uric, do đó ngăn ngừa sự kết tủa của muối canxi oxalat [19]. Vì vậy, natri citrat là chất chuẩn cho thí nghiệm ức chế quá trình hình thành và làm tan tinh thể CaOx.

**Bảng 3.** Phần trăm ức chế hình thành hạt nhân tinh thể CaOx (%) bằng natri citrat và cao chiết rau dệu

| Nồng độ<br>(mg/mL)       | Phần trăm ức chế hạt nhân tinh thể CaOx (%) |                           |
|--------------------------|---------------------------------------------|---------------------------|
|                          | Natri citrat                                | Cao chiết rau dệu         |
| 0                        | 0 <sup>l</sup>                              | 0 <sup>l</sup>            |
| 0,25                     | 25,56 <sup>k</sup> ± 0,13                   | 20,23 <sup>k</sup> ± 0,19 |
| 0,50                     | 32,69 <sup>h</sup> ± 0,19                   | 27,83 <sup>h</sup> ± 0,03 |
| 0,75                     | 39,19 <sup>g</sup> ± 0,03                   | 33,68 <sup>g</sup> ± 0,14 |
| 1,0                      | 45,89 <sup>f</sup> ± 0,12                   | 39,26 <sup>f</sup> ± 0,21 |
| 2,0                      | 58,19 <sup>e</sup> ± 0,08                   | 45,68 <sup>e</sup> ± 0,08 |
| 4,0                      | 64,57 <sup>d</sup> ± 0,14                   | 54,11 <sup>d</sup> ± 0,15 |
| 6,0                      | 72,02 <sup>c</sup> ± 0,04                   | 62,78 <sup>c</sup> ± 0,09 |
| 8,0                      | 80,19 <sup>b</sup> ± 0,18                   | 69,56 <sup>b</sup> ± 0,13 |
| 10,0                     | 88,65 <sup>a</sup> ± 0,22                   | 74,15 <sup>a</sup> ± 0,17 |
| IC <sub>50</sub> (mg/mL) | 1,44                                        | 3,31                      |

**Ghi chú:** Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ( $p=0,05\%$ ).

Hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx của cao chiết rau dệu và chất chuẩn natri citrat được đánh giá qua giá trị IC<sub>50</sub>. Giá trị IC<sub>50</sub> của cao chiết (IC<sub>50</sub> = 3,31 mg/mL) cao hơn IC<sub>50</sub> của natri citrat (IC<sub>50</sub> = 1,44 mg/mL). Nguyên nhân là do cao chiết rau dệu có chứa các hợp chất (flavonoid, saponin và terpenoid) có khả năng kết hợp với ion Ca<sup>2+</sup> tạo thành muối tan làm giảm mật độ của tinh thể chậm hơn so với chất chuẩn natri citrat [18]. Kết quả nghiên cứu cao hơn Nirmaladevi [17] cho rằng, dịch trích hoa *H. rosa-sinensis* Linn có khả năng ức chế hình thành hạt nhân tinh thể CaOx đạt khoảng 30% tại nồng độ 1400 µg/mL. Agarwal [19] khả năng ức chế hạt nhân tinh thể CaOx cao nhất đạt 60,06±0,19% của cao chiết *A. aspera* L. tại nồng độ 1000 µg/mL, 49,93±0,07% của cao chiết *B. pinnatum* Lam. ở nồng độ 1000 µg/mL. Trần Đức Tài [1], cao chiết cây Bùm sùm hiệu quả ức chế hình thành hạt nhân tinh thể CaOx với giá trị IC<sub>50</sub> = 1,76 mg/mL.

### 3.5. Hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể CaOx

Theo Agarwal [19], bước tiếp theo là sự phát triển của tinh thể (Growth) theo phản ứng:  $\text{CaCl}_2 + \text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 \rightarrow \text{CaC}_2\text{O}_4 + \text{NaCl}$ . Bởi vì phản ứng của CaCl<sub>2</sub> và Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> với mầm tinh thể khiến cho các tinh thể CaOx bao phủ lên bề mặt tinh thể.

Đối với phân tích sự phát triển, do phản ứng giữa canxi clorua và natri oxalat dưới sự hiện diện của tinh thể hạt nhân canxi oxalat monohydrat dẫn đến độ giảm của góc oxalat tự do và độ giảm này được phát hiện bằng bước sóng 214 nm [18].

Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể CaOx của natri citrat, phương trình đường:  $y = 42,032x + 10,1$ ;  $R^2 = 0,9968$  và suy ra giá trị  $IC_{50}$  của natri citrat là 0,95 mg/mL (bảng 4).

Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể CaOx của cao chiết rau dệu, phương trình đường chuẩn  $y = 21,345x + 17,349$ ;  $R^2 = 0,9128$  và suy ra giá trị  $IC_{50}$  của cao chiết là 1,53 mg/mL (bảng 4).

**Bảng 4.** Phần trăm ức chế phát triển của tinh thể CaOx (%)  
bằng natri citrat và cao chiết rau dệu

| Nồng độ<br>(mg/mL)   | Phần trăm ức chế phát triển tinh thể CaOx (%) |                           |
|----------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
|                      | Natri citrat                                  | Cao chiết rau dệu         |
| 0                    | 0 <sup>l</sup>                                | 0 <sup>l</sup>            |
| 0,25                 | 21,19 <sup>k</sup> ± 0,20                     | 18,79 <sup>k</sup> ± 0,13 |
| 0,50                 | 30,01 <sup>h</sup> ± 0,06                     | 26,56 <sup>h</sup> ± 0,02 |
| 0,75                 | 42,09 <sup>g</sup> ± 0,15                     | 34,97 <sup>g</sup> ± 0,08 |
| 1,0                  | 52,19 <sup>f</sup> ± 0,02                     | 45,69 <sup>f</sup> ± 0,14 |
| 2,0                  | 61,12 <sup>e</sup> ± 0,23                     | 56,79 <sup>e</sup> ± 0,16 |
| 4,0                  | 69,79 <sup>d</sup> ± 0,28                     | 61,07 <sup>d</sup> ± 0,22 |
| 6,0                  | 75,65 <sup>c</sup> ± 0,11                     | 70,04 <sup>c</sup> ± 0,17 |
| 8,0                  | 82,55 <sup>b</sup> ± 0,09                     | 76,65 <sup>b</sup> ± 0,06 |
| 10,0                 | 89,90 <sup>a</sup> ± 0,12                     | 82,09 <sup>a</sup> ± 0,03 |
| $IC_{50}$<br>(mg/mL) | 0,95                                          | 1,53                      |

**Ghi chú:** Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ( $p=0,05\%$ ).

Chất chuẩn natri citrat có  $IC_{50} = 0,95$  mg/mL có hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể CaOx thấp hơn  $IC_{50}$  của cao chiết là  $IC_{50} = 1,53$  mg/mL nên cao chiết có khả năng ức chế mạnh quá trình phát triển của tinh thể CaOx do có khả năng hình thành các hợp chất tan với ion canxi và ion oxalat làm giảm khả năng hình thành sỏi [18]. Cao chiết rau dệu có khả năng ức chế sự phát triển của sỏi CaOx 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 canxi và ion oxalat, ngăn ngừa sự phát triển của sỏi [19]. Khi tăng hiệu quả ức chế, 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 canxi oxalat dihydrat (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 rau dệu có khả năng ức chế phát triển. Kết quả này thấp hơn Nirmaladevi [17], cao chiết nước của *H. rosa-sinensis* Linn. đạt hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể CaOx dưới 35% ở mức nồng độ 1400 µg/mL và Kalpana [17], cao chiết ethanol thân cây *B. cultivar* (Monthan) đạt hiệu quả 70% ức chế sự phát triển hạt nhân tinh thể CaOx ở nồng độ 1600 µg/mL. Trần Đức Tài [1], cao chiết cây Bùm sùm ức chế sự phát triển của tinh thể CaOx với  $IC_{50} = 1,5$  mg/mL.

### 3.6. Hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx

Bước cuối cùng của quá trình hình thành sỏi thận là ngưng tụ (aggregation), các tinh thể canxi oxalat sẽ tụ lại một khối nhờ các lực liên kết hóa học, tĩnh điện và sẽ ổn định lại cấu trúc và kích thước của sỏi [14]. Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx của natri citrat, phương trình đường chuẩn:  $y = 20,166x + 19,397$ ;  $R^2 = 0,9012$  và giá trị  $IC_{50}$  là 1,52 mg/mL (bảng 5). Tương tự, tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx của cao chiết rau dệu, phương trình đường chuẩn:  $y = 20,598x + 13,755$ ;  $R^2 = 0,9219$  và giá trị  $IC_{50}$  là 1,76 mg/mL (bảng 5).

**Bảng 5.** Phần trăm ức chế ngưng tụ của tinh thể CaOx (%) bằng natri citrat và cao chiết rau dệu

| Nồng độ<br>(mg/mL) | Phần trăm ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx (%) |                           |
|--------------------|---------------------------------------------|---------------------------|
|                    | Natri citrat                                | Cao chiết rau dệu         |
| 0                  | 0 <sup>l</sup>                              | 0 <sup>l</sup>            |
| 0,25               | 20,56 <sup>k</sup> ± 0,15                   | 16,02 <sup>k</sup> ± 0,11 |
| 0,50               | 28,99 <sup>h</sup> ± 0,19                   | 21,69 <sup>h</sup> ± 0,07 |
| 0,75               | 34,54 <sup>g</sup> ± 0,25                   | 31,02 <sup>g</sup> ± 0,24 |
| 1,0                | 47,06 <sup>f</sup> ± 0,20                   | 40,68 <sup>f</sup> ± 0,20 |
| 2,0                | 56,58 <sup>c</sup> ± 0,08                   | 52,06 <sup>e</sup> ± 0,14 |
| 4,0                | 63,56 <sup>d</sup> ± 0,13                   | 62,03 <sup>d</sup> ± 0,05 |
| 6,0                | 74,05 <sup>c</sup> ± 0,08                   | 70,19 <sup>c</sup> ± 0,23 |
| 8,0                | 81,09 <sup>b</sup> ± 0,17                   | 78,98 <sup>b</sup> ± 0,07 |
| 10,0               | 88,13 <sup>a</sup> ± 0,16                   | 86,67 <sup>a</sup> ± 0,18 |
| $IC_{50}$ (mg/mL)  | 1,52                                        | 1,76                      |

**Ghi chú:** Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ( $p=0,05\%$ ).

Chất chuẩn natri citrat ( $IC_{50} = 1,52$  mg/mL) có hiệu quả thấp hơn khi so sánh hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx với cao chiết rau dệu ( $IC_{50} = 1,76$  mg/mL). Cao chiết rau dệu có khả năng ức chế mạnh giai đoạn ngưng tụ 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 và rau dệu 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 protein do tế bào ống thận bị tổn thương tiết ra và protein từ huyết tương lọc qua cầu thận, nguyên nhân chính gây sự quá bão hòa của các tinh thể canxi oxalat, 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. Kết quả nghiên cứu cao hơn Vyawahare [20], cao chiết lá cây *M. charantia* L. đạt hiệu quả ức chế ngưng tụ sỏi CaOx hơn 30% ở nồng độ 500 µg/mL. Nghiên cứu của Agarwal [19], *P. niruri* L. hiệu quả ức chế ngưng tụ sỏi CaOx đạt mức  $58,62\% \pm 0,02\%$ . Trần Đức Tài [1], cao chiết cây Bùm sùm cho hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể CaOx với  $IC_{50} = 0,8$  mg/mL.

### 3.7. Khả năng làm tan tinh thể CaOx

Natri citrat đạt giá trị làm tan tinh thể CaOx cao nhất ở mức nồng độ 50 mg/mL đạt hiệu quả  $83,06 \pm 0,08\%$  và thấp nhất, ở nồng độ natri citrat 5 mg/mL, hiệu quả tan tinh thể CaOx là  $24,45 \pm 0,13\%$  (bảng 6). Cao chiết rau dệu 50 mg/mL có khả năng làm tan tinh thể CaOx cao nhất với hiệu quả  $54,06 \pm 0,1\%$  và thấp nhất, ở nồng độ cao chiết 5 mg/mL, hiệu quả tan tinh thể CaOx là  $10,23 \pm 0,16\%$  (bảng 6).

**Bảng 6.** Hiệu quả làm tan tinh thể CaOx của cao chiết rau dệu và natri citrat

| Nồng độ<br>(mg/mL) | Phần trăm làm tan tinh thể canxi oxalat (%) |                    |
|--------------------|---------------------------------------------|--------------------|
|                    | Natri citrat                                | Rau dệu            |
| 0                  | 0,0 <sup>g</sup>                            | 0,0 <sup>g</sup>   |
| 5                  | $24,45^f \pm 0,13$                          | $10,23^f \pm 0,16$ |
| 10                 | $33,02^e \pm 0,12$                          | $16,54^e \pm 0,13$ |
| 20                 | $44,01^d \pm 0,14$                          | $22,36^d \pm 0,23$ |
| 30                 | $53,46^c \pm 0,31$                          | $34,56^c \pm 0,11$ |
| 40                 | $65,79^b \pm 0,26$                          | $42,26^b \pm 0,06$ |
| 50                 | $83,06^a \pm 0,08$                          | $54,06^a \pm 0,31$ |

**Ghi chú:** Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ( $p=0,05\%$ ).

Trong nghiên cứu, hiệu quả làm tan tinh thể CaOx của cao chiết rau dệu ( $54,06\%$ ; ở nồng độ 50 mg/mL) cao hơn chất chuẩn natri citrat ( $83,06\%$ ; ở nồng độ 50 mg/mL). Cao chiết rau dệu có khả năng hòa tan tinh thể CaOx là do rau dệu chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như phenolic, flavonoid, tannin,... Đồng thời, rau dệu có hiệu quả ức chế quá trình hình thành tinh thể CaOx gây sỏi thận trong điều kiện phòng thí nghiệm cho hiệu quả ức chế 03 giai đoạn chính gồm: ức chế hạt nhân, phát triển và ngưng tụ dựa vào thí nghiệm trên. Giá trị  $IC_{50}$  của cao chiết rau dệu chế quá trình hình thành tinh thể CaOx đạt lần lượt 3,31 mg/mL; 1,53 mg/mL và 1,76 mg/mL. Đồng thời, hiệu quả làm tan là do sự hiện diện của các hợp chất phân cực trong cao chiết rau dệu (polyphenol, flavonoid và tannin). Hàm lượng phenolic và flavonoid tổng của cao chiết rau dệu đạt hàm lượng 101,77 mg acid gallic/100g

cao chiết và 76,83 mg quercetin/100g cao chiết. Các hợp chất này có thể hoạt động thông qua khả năng hình thành các chất hóa học dễ hòa tan sẽ làm giảm nguy cơ ngưng tụ hoặc bằng cách hấp phụ các anion điện tích trên bề mặt của tinh thể của chúng và do đó ức chế sự phát triển và ngưng tụ tinh thể. Ngoài ra, sự cố định của chúng trên các tinh thể dẫn đến sự thay đổi hiện tượng lực hút điện giữa các nguyên tử nằm trên bề mặt tinh thể và các ion có trong dung dịch. Ngoài ra, Saso [10], với khả năng làm tan của EDTA ở nồng độ 0,25M chỉ đạt mức làm tan 25% tinh thể CaOx. Hàm lượng phenol và flavonoid được phân lập từ cao chiết ethanol của *Orthosiphon stamineus* và polysaccharid được phân lập từ cao chiết nước trong việc hòa tan các tinh thể canxi oxalat trong mô hình *in vivo* [20]. Kết quả cho thấy, phenol, flavonoid và polysaccharid từ chiết xuất của *O. stamineus* có hiệu quả trong việc hòa tan các tinh thể CaOx và polysaccharid đã ức chế đáng kể sự hình thành và tích tụ của các tinh thể canxi oxalat. Hiệu quả hòa tan sỏi CaOx và sỏi canxi phosphat của cao chiết *Piper nigrum*. Kết quả, các chất trong cao chiết từ dung môi nước và còn có tác dụng cao hơn so với dung môi ethyl acetat và ether dầu mỏ trong việc ngăn ngừa sự hình thành, kết tinh và tích tụ của sỏi CaOx và sỏi canxi phosphat. Hiệu ứng này có thể là do sự hiện diện của alkaloid trong chiết xuất ethanol và nước [19,20].

#### 4. KẾT LUẬN

Cao chiết rau dền có khả năng ức chế và làm tan tinh thể CaOx trong *in vitro* với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 3,31 mg/mL; 1,53 mg/mL và 1,76 mg/mL và hiệu quả làm tan đạt 54,06% (50 mg/mL).

**Lời cảm ơn:** Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang và trường Đại học Trà Vinh đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Đức Tài, *Ảnh hưởng của dịch trích lá và thân cây Bùm sụm (Carmona microphylla L.) lên sự ức chế hình thành tinh thể canxi oxalat gây bệnh sỏi thận trong điều kiện in vitro*. Luận văn tốt nghiệp Đại học, Đại học Cần Thơ, 2016.
2. Evan A. P., Lingeman J. E., Coe F. L., Parks J. H., Bledsoe S. B., Shao Y., Sommer A. J., Paterson R. F., Kuo R. I. and Grynpas M., *Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle*, J. Clin. Invest., 2003, **111**:607-616.
3. Babu M., K. H. Uma, S. Joseph, A. Sree, S. Scariya, K. A. Shibina and J. Hameed., *In-vitro evaluation of anti-urolithiatic and larvicidal activity of Alternanthera sessilis*, Biomedical & Pharmacology Journal, 2021, **14**(2):671-680.
4. Đỗ Huy Bích, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật, 2006.
5. Yadav M., S. Chatterji, Gupta S. K. and Watal G., *Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine*, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014, **6**(5):539-542.

6. Pieme C. A., Kumar S.G., Dongmo M. S., Ngogang J. Y. and Saxena A. K., *Antiproliferative activity and induction of apoptosis by Annona muricata (Annonaceae) extract on human cancer cells*, BMC complementary and alternative medicine, 2014, **14**(1):1-10.
7. Yadav R. N. S. and Agarwala M., *Phytochemical analysis of some medicinal plants*, Journal of Phytology, 2011, **3**:10-14.
8. Phatak R. S., and Hendre A. S., *In-vitro antiurolithiatic activity of Kalanchoe pinnata extract*, International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 2015, **7**:275-279.
9. Chaudhary A., Singla S. K. and Tandon C., *In vitro evaluation of Terminalia arjuna on canxi phosphate and canxi oxalate crystallization*, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, **72**(3):340-345.
10. Saha S., and Ramtej J. V., *Inhibition of canxi oxalate crystallisation in vitro by an extract of Bergenia ciliate*, Arab J. of Urology, 2013, **11**:187-192.
11. Saso L., G. Valentini and B. Silvestrini., *Development of an in vitro assay for the screening of substances capable of dissolving canxi oxalate crystals*, Urologia internationalis, 1999, **61**(4):210-214.
12. Zarrow M. X., *Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques*, Elsevier, 2012, p. 387-389.
13. Bandar H., A. Hijazi, H. Rammal, A. Hachem, A., Z. Saad & Badran B., *Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese Urtica Dioica*, American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 2013, **1**(6):507-513.
14. Ravi S., Kaleena P. K., Babu M., Janaki A., Velu K. and Elumalai D., *Phytochemical screening, antioxidant and anticancer potential of Imperata cylindrica (L.) raeusch against human breast cancer cell line (MCF-7)*, International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 2018, **8**(3):938-945.
15. Saranya R., and Geetha N., *Inhibition of canxi oxalate (CaOx) crystallization in vitro by the extract of beet root (Beta vulgaris L.)*, International J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014, **6**(2):361-365.
16. Soon-suk L., K. Kwang, Lee., *Composition and contents of free amino acids and phenolic acid and flavonoids of Imperata cylindrica Beauvois var. koenigii root extracts*, Journal of Digital Convergence, 2020, **18**(7):397-403.
17. Nirmaladevi R., D. Kavitha, & Padma P. R., *Evaluation of antilithiatic potential of Hibiscus rosa-sinensis Linn, in vitro*, Journal of Pharmacy Research, 2012, **5**(8):4353-4356.
18. Kalpana S., T. S. Rai & R. Nirmaladevi, *Effect of Tridax procumbens extract on canxi oxalate crystallization under in vitro conditions*, Advances in Applied Science Research, 2014, **5**(3):411-416.
19. Agarwal K., & Varma R., *In-vitro Canxi oxalate crystallization inhibition by Achyranthes aspera L. and Bryophyllum pinnatum Lam*, British Journal of Pharmaceutical Research, 2015, **5**(2):146-153.

20. Vyawahare J. N., Shelke P. A., & Baheti D. G., *Inhibition of canxi oxalate crystallization in vitro by extract of Momordica charantia* Linn, *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences*, 2014, **3**(2):448-452.

### SUMMARY

#### INHIBITION OF THE FORMATION AND DISSOLUTION OF CANXI OXALATE CRYSTALS CAUSING KIDNEY STONES BY AN EXTRACT OF *Alternanthera sessilis* IN VITRO

This study on using *Alternanthera sessilis* extract to inhibit the formation and to dissolve of canxi oxalate (CaOx) was conducted *in vitro*. The plant samples were extracted with ethanol 70% v/v. The content of phenolic and flavonoid of *Alternanthera sessilis* extract was determined by UV- Vis spectrophotometer at 510 nm and 765 nm. The inhibitory percentage of nucleation, growth and aggregation of CaOx was determined by UV- Vis spectrophotometer at 620 nm and 214 nm. Efficiencies in the dissolution of the canxi oxalat crystals of *A. sessilis* extract was determined by titration method. The results showed that moisture and the yield of *Alternanthera sessilis* extract were 15.98% and 7.22%, respectively. The extract of *Alternanthera sessilis* had the presence of bioactive compounds such as alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, tannin and phenol. The phenolic and flavonoid content of *Alternanthera sessilis* extract were 167.79-320.65 mg gallic acid/g and 128.01-247.64 mg quercetin/g, respectively. The extract *Alternanthera sessilis* had the ability to inhibit nucleation, growth and aggregation of CaOx crystals and IC<sub>50</sub> value of extract was 3.17 mg/mL; 2.48 mg/mL and 1.57 mg/mL, respectively. At 50 mg/mL of extract, *Alternanthera sessilis* extract have the ability to dissolve of the CaOx crystals reach 58.97%.

**Keywords:** *Aggregation, dissolution, canxi oxalat, growth, kidney stone, nucleation, Alternanthera sessilis, rau dệu, sỏi thận, ngưng tụ, làm tan.*

Nhận bài ngày 29 tháng 7 năm 2022

Phản biện xong ngày 19 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 18 tháng 11 năm 2022

<sup>(1)</sup> Trường Đại học Trà Vinh

<sup>(2)</sup> Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang

Liên hệ: **ThS. Nguyễn Phạm Tuấn**

Trung tâm công nghệ sinh học tỉnh An Giang.

Tỉnh lộ 941, ấp Vĩnh Phước, Thị trấn Vĩnh Bình, huyện Châu Thành, tỉnh An Giang

Điện thoại: 0988.202055. Email: ngphamtuan1983@gmail.com