

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG SỐT RÉT CỦA MỘT SỐ CÂY THUỐC VÙNG ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Đái Thị Xuân Trang¹, Trần Thanh Mến¹ và Nguyễn Trọng Tuấn¹

ABSTRACT

Eight medical plants in Mekong Delta were collected including *Ceiba pentandra*, *Phyllanthus urinaria*, *Phyllanthus amarus*, *Eurycoma longifolia*, *Peperomia pellucida*, *Tinospora crispa*, *Piper sarmentosum* and *Tinospora cordifolia*. Eight crude methanolic plant extracts from these species were screened antimalarial activity in vitro using inhibition of β -hematin (BH) formation assay. The results show that six methanol plant extracts have ability to inhibit in vitro β -hematin formation. The activity of *P. urinaria*, *P. amarus* and *C. pentandra* extracts is 2 mg/ml. *T. crispa* methanol extract inhibit BH formation at concentrations of 1, 0.5 and 0.25 mg/ml. *P. sarmentosum* methanol extract was inhibited heme converts to BH at 0.25 mg/ml. Meanwhile, *P. pellucida* extract showed the activity of various concentrations (2, 1, 0.5 and 0.25 mg/ml). The IC₅₀ value of *P. pellucida* extract was 0.8 mg/ml. The crude methanolic extract of *P. pellucida* was fractionated into diethyl ether and water. Finally, The compounds from crude water extract of *P. pellucida* were isolated by using high performance liquid chromatography (HPLC) method. All the crude extracts and six HPLC fractions of *P. pellucida* were tested the ability of antimalarial activity at in vitro and cell level. The results proved that they could inhibit BH formation inhibition at in vitro and cell level significantly.

Keywords: *C. pentandra*, *P. urinaria*, *P. amarus*, *E. longifolia*, *P. pellucida*, *T. crispa*, *P. sarmentosum*, *T. cordifolia*, β -hematin, hemozoin, malaria

Title: Screening of antimalarial activity of medical plants in the Mekong delta

TÓM TẮT

Tám mẫu cây được thu tại một số tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long là cây Gòn (*C. pentandra*), Chó đẻ thân hồng (*P. urinaria*), Chó đẻ thân xanh (*P. amarus*), Bá bệnh (*E. longifolia*), Càng cua (*P. pellucida*), dây Cóc (*T. crispa*), cây Lót (*P. sarmentosum*) và Thần thông (*T. cordifolia*). Cao methanol trích từ tám cây này được đánh giá khả năng kháng sốt rét thông qua sự ức chế sự tổng hợp β -hematin (BH) in vitro. Kết quả cho thấy, cao methanol từ cây Gòn, Chó đẻ thân hồng, Chó đẻ thân xanh có khả năng ức chế sự tổng hợp BH ở nồng độ cao methanol là 2 mg/ml. Cao methanol từ dây Cóc có ức chế sự biến đổi heme thành BH ở nồng độ cao là 1, 0,5 và 0,25 mg/ml. Cao methanol từ cây Lót ức chế sự biến đổi heme thành BH nồng độ cao 0,25 mg/ml. Mẫu cao từ cây Càng cua có hoạt tính ức chế sự hình thành BH ở các nồng độ cao 2, 1, 0,5 và 0,25 mg/ml. IC₅₀ của cao methanol ở cây Càng cua là 0,8 mg/ml. Cao methanol của cây Càng cua được tách phân đoạn thành cao nước, cao diethyl ether và cao nước được tách phân đoạn bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Tất cả các phân đoạn và các phân đoạn HPLC của cây Càng cua được khảo sát khả năng kháng sốt rét ở mức độ in vitro và mức độ tế bào. Sáu phân đoạn của cao nước sau khi tách bằng HPLC được chứng minh có khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH có ý nghĩa thống kê.

Từ khóa: Gòn; Chó đẻ thân hồng; Chó đẻ thân xanh; Bá bệnh; Càng cua; dây Cóc; Lót, cây Thần thông, ức chế sự tổng hợp β -hematin; kháng bệnh sốt rét

¹ Khoa Khoa học Tự Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

1 GIỚI THIỆU

Sốt rét là một bệnh do ký sinh trùng sốt rét thuộc chi *Plasmodium* gây nên thường phổ biến ở các nước nhiệt đới, đặc biệt là ở các nước đang phát triển thuộc khu vực châu Á và châu Phi. Mỗi năm, thế giới có thêm khoảng 300 triệu người bị nhiễm sốt rét và hơn một triệu người trong số đó chết. Sự kháng rất nhanh của ký sinh trùng sốt rét đối với những thuốc có nhóm quinoline như quinine và chloroquine là vấn đề rất khó khăn cho việc kiểm soát và tìm ra thuốc để điều trị bệnh này (Trigg *et al.*, 1998). Như vậy, việc tìm ra nguồn dược liệu mới nhằm mục đích phát triển những thuốc hiệu quả nhanh, không có độc tố và giá thành thấp để thay thế các thuốc ngày càng trở nên ít hiệu quả là rất cần thiết.

Giai đoạn ký sinh trong tế bào hồng cầu của người hoặc động vật, ký sinh trùng sốt rét sử dụng nguồn acid amin từ sự thủy phân hemoglobin. Quá trình thủy phân hemoglobin kèm theo sự giải phóng nhóm heme tự do, nhóm heme tự do này gây độc đối với tế bào và làm cho ký sinh trùng sốt rét chết. Để tránh sự tổn thương do nhóm heme tự do gây ra, ký sinh trùng sốt rét biến đổi heme thành những chất không gây độc. Nhiều nghiên cứu cho thấy, hơn 90% heme được kết tinh thành hemozoin (HZ) hay còn gọi là β -hematin (BH), một chất không tan trong nước được tạo thành trong không bào tiêu hóa của ký sinh trùng sốt rét. Hiện nay đã được biết cơ chế khử độc heme là duy nhất và chuyên biệt đối với ký sinh trùng sốt rét (Sullivan *et al.*, 1996).

Từ xưa, trong dân gian đã sử dụng rộng rãi một số loài thảo mộc để làm thuốc chữa bệnh. Có khoảng 80% dân số trên thế giới đang được điều trị chủ yếu bằng phương pháp y học cổ truyền, đặc biệt là điều trị với các phương thuốc làm từ các chất chiết thực vật (Phillipson *et al.*, 1991). Theo kết quả điều tra của tổ chức Y tế thế giới, khoảng 25% số thuốc hiện sử dụng có nguồn gốc từ các cây thuốc đã được dân gian sử dụng từ lâu. Mặt khác các loại thuốc dùng để trị bệnh sốt rét được sử dụng hiện nay phần lớn có nguồn gốc từ thực vật như quinine và artemisinin, hoặc là các dẫn xuất được tổng hợp dựa trên kiểu mẫu của các hợp chất thiên nhiên như chloroquine được tổng hợp dựa trên công thức của quinine, hay artesunate, artemether, arteether là dẫn xuất của artemisinin. Nhiều cây cỏ ở Việt Nam đã được chứng minh có khả năng ức chế sự phát triển của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* 3D7 *in vitro* như: cây Gòn (*Ceiba pentandra* (L.) Gaertn.), cây Bá bịch (*Eurycoma longifolia* Jack.), Ké đầu ngựa (*Xanthium strumarium* DC.),... (Quan *et al.*, 2003) Dịch chiết từ *Tinospora crispa* được cho là có khả năng kháng ký sinh trùng sốt rét (Hasimah *et al.*, 1991).

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) được thiên nhiên ưu đãi có nguồn thực vật rất đa dạng và phong phú, trong đó rất nhiều loài có dược tính chữa bệnh. Đây là nguồn dược liệu quan trọng cần được tìm hiểu để góp phần định hướng cho việc khai thác các cây thuốc quý và bảo tồn nguồn tài nguyên này.

Chúng tôi đã tìm và chứng minh một số cây thuốc ở ĐBSCL có hoạt tính kháng sốt rét thông qua sự ức chế quá trình biến đổi heme thành β -hematin (BH).

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

Thí nghiệm sử dụng các thiết bị và dụng cụ như: máy đo quang phổ Beckman Coulter DU 640B (Mỹ), máy đo quang phổ U-3000 (Nhật), máy đo quang phổ cho đĩa 96 giếng MTP-120 Microplate Reader CORONA Electric (Nhật), IMark microplate reader – Bio-Rad, máy sắc ký lỏng cao áp (HPLC) Hitachi L4200 UV-Vis Detector (Nhật), máy ly tâm Eppendorf 5417C (Đức), máy cô quay Heidolph (Đức), máy vortex, máy khuấy từ, bồn ủ có điều chỉnh nhiệt độ, cân phân tích 4 chỉ số, micropipet các loại,...

Thí nghiệm sử dụng một số hóa chất như: Methanol (Merck), hemin chloride (Sigma), sodium dodecyl sulfat (SDS)(Merck), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck), Tween 20 (polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate) (Wako), Diethyl ether (Nacalai Tesque), Acetonitrile (Nacalai Tesque), TFA (Trifluoacetic acid) (Wako), NaOH (Merck), natri bicarbonate (Merck), natri acetate (Merck), acid acetic (Merck), chloroquine (Sigma), môi trường RPMI 1640 (Sigma), Gentamicin (Sigma), hypoxanthine (Merck), Albumax II (Merck)...

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thu mẫu các cây thuốc và định danh

Mẫu cây được thu tại một số tỉnh thuộc khu vực ĐBSCL, đây là những cây mọc hoang dại. Trước khi thu mẫu chúng tôi dựa vào các đặc điểm hình thái để nhận diện sơ bộ, chụp hình và thu hái đem về phòng thí nghiệm. Các mẫu cây sau khi thu về được rửa bằng nước sạch và định danh mẫu lại, việc định danh mẫu được dựa vào các đặc điểm hình thái của thực vật như thân, lá, hoa, trái,... và tham khảo tài liệu từ bộ sách Cây Cỏ Việt Nam của Giáo sư Phạm Hoàng Hộ (2003).

2.2.2 Phương pháp chiết các cao từ các mẫu cây

Chiết các cao thô

Mẫu cây sau khi thu được phơi khô, nghiền nhuyễn và cho vào các túi để ngâm dầm với methanol. Sau khi ngâm 48 giờ ở nhiệt độ phòng, dung dịch chiết được cô quay để thu hồi dung môi methanol dưới áp suất thấp (200–300 mmHg). Sau khi cô quay chúng tôi thu được cao chiết từ dung môi methanol dưới dạng tổng (gọi là cao methanol), các mẫu cao chiết này được trữ trong tủ lạnh ở ngăn đá để sử dụng cho các thí nghiệm sau này. Cao methanol của những cây có hoạt tính kháng sốt rét được tiếp tục trích để tách các chất ưa nước và kỵ nước bằng cách hòa cao methanol trong nước và tách bằng hai pha lỏng–lỏng gồm nước và diethyl ether. Sau đó, nước và diethyl ether được thu hồi và tiến hành cô quay. Việc cô quay được thực hiện tương tự như đối với cao methanol. Sau khi cô quay thu được cao nước và cao diethyl ether, các cao này được sử dụng để xác định khả năng ức chế phản ứng kết tinh heme thành BH.

Tách các hợp chất có hoạt tính trong cao chiết bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Cao nước của cây Càng cua được pha loãng trong nước sau đó được lọc qua giấy lọc cellulose acetate hydrophilic (DISMIC-25CS) đường kính 0,2 µm tách các chất bằng phương pháp HPLC.

2.2.3 Phản ứng ức chế sự biến đổi heme thành BH

Phản ứng tổng hợp BH được thực hiện theo phương pháp của Egan *et al.* (1999); Orjih (2001) và Trang *et al.* (2006) được tóm tắt như sau: 100 µM dung dịch heme được ủ trong dung dịch đệm natri acetate 0,5 M, pH 4,8 ở nhiệt độ 60°C trong 16 giờ khi có hoặc không có thuốc. Mẫu sau khi ủ xong được ly tâm 10 phút ở tốc độ 12000 vòng/phút để loại bỏ dịch lỏng và thu lấy phần kết tủa. Phần kết tủa được làm sạch bằng cách rửa trong 1 ml dung dịch natri bicarbonate (NaHCO₃) 0,1 M có 2,5% SDS, pH 9,1, vortex để mẫu tan đều, ly tâm 10 phút ở tốc độ 12000 vòng/phút, bỏ dung dịch lỏng và thu lấy phần kết tủa. Việc rửa với dung dịch NaHCO₃ được thực hiện 3 lần. Phần không tan còn lại chính là BH được trữ trong 1 ml nước cất để ở nhiệt độ 4°C. BH thu nhận sau phản ứng được pha loãng 10 lần trong dung dịch NaOH 0,1 M có 2,5% SDS, vortex để BH tan hoàn toàn và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 405 nm.

Khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH của cao nước, cao diethyl ether và các phân đoạn sau khi tách bằng HPLC được thực hiện theo phương pháp của Huy *et al.* (2007) được tóm tắt như sau: 200 µl dung dịch phản ứng gồm 100 µM heme pha trong DMSO được ủ với 100 mM đệm acetate pH 5,1, 0,012 g/l Tween 20 được sử dụng như chất nhũ hóa trong điều kiện có hoặc không có các cao chiết. Sau khi ủ ở 37°C trong thời gian 6 giờ, đĩa 96 giếng được đo mật độ quang ở bước sóng 405/630 nm (giá trị ở bước sóng ở 630 nm trừ giá trị ở bước sóng 405 nm). Tỷ lệ heme biến đổi thành BH được tính theo công thức và phần trăm ức chế phản ứng biến đổi heme thành BH của thuốc hoặc các cao chiết tính theo Huy *et al.* (2007).

$$\% \text{ Ức chế} = 100 \times (A_{\text{sample}} - A_{\text{min}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{min}})$$

A_{control} : giá trị đo được của heme khi không có Tween 20, không có thuốc hoặc các cao chiết.

A_{sample} : giá trị đo được của heme khi có Tween 20, và thuốc hoặc các cao chiết.

A_{min} : giá trị đo được của heme và Tween 20 khi không có thuốc hoặc các cao chiết.

2.2.4 Phản ứng ức chế sự tổng hợp BH của các cao chiết và các phân đoạn HPLC ở mức độ tế bào

Tế bào hồng cầu người được nuôi trong môi trường RPMI 1640 (Sigma) bổ sung thêm 0,025 mg/ml gentamicin, 0,01 mM hypoxanthine, 23,8 mM NaHCO₃, 0,5% Albumax II và điều chỉnh pH từ 7,3 đến 7,4 (Fidock *et al.*, 2004). Quy trình nuôi cấy được thực hiện theo Trager, 1976 được điều chỉnh để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế sự phát triển của các phân đoạn cao chiết Càng cua gồm cao methanol, cao nước, cao diethyl ether và các phân đoạn của cao nước sau khi được phân tách bằng HPLC ở mức độ tế bào được thực hiện như sau: 200 µl tế bào hồng cầu bị nhiễm sốt rét *Plasmodium*

falciparum K1 nồng độ 1,5% (parasited red blood cell, pRBC) được ủ với thuốc quinine như mẫu đối chứng dương, và 10 µl của các cao thí nghiệm, mẫu đối chứng âm được ủ trong điều kiện không có thuốc. Sau khi ủ 3 ngày dưới điều kiện nhiệt độ 37°C và sử dụng túi AnaeroPack để tạo CO₂ trong bình thủy tinh kính. pRBC được ly tâm 13000 vòng 10 phút, kết tủa sau khi ly tâm được rửa 3 lần bằng NaHCO₃ 0,1 M, 2,5% SDS, pH 8,8. Kết tủa sau khi rửa được hòa tan trong 200 µl NaOH 50 mM, 5% SDS, tiếp tục ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó đo mật độ quang ở bước sóng 405/750 nm bằng máy quang phổ.

2.2.5 Phân tích số liệu

Số liệu được phân tích trong phần mềm Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm STATGRAPHICS Plus 4.0. Giá trị IC₅₀ được tính toán dựa vào đồ thị.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự ức chế biến đổi heme thành BH của các cao methanol

Khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH của tám cao thô methanol được khảo sát và kết quả được tóm tắt và trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Sự ức chế biến đổi heme thành BH của các cao ở các nồng độ khác nhau

Nghiệm thức	Phần trăm heme bị ức chế (%)					
	4 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml
<i>Không cao chiết</i>	0 ^a	0 ^c	0 ^d	0 ^d	0 ^e	0 ^b
<i>Cây Gòn</i>	0 ^a	7,11 ^{bc}	0,75 ^d	0,52 ^d	3,19 ^e	3,42 ^b
<i>Chó đẻ thân hồng</i>	0 ^a	17,36 ^b	0 ^d	0 ^d	1,34 ^e	0 ^b
<i>Chó đẻ thân xanh</i>	0 ^a	12,23 ^{bc}	0 ^d	0 ^d	3,29 ^e	0 ^b
<i>Bá bệnh</i>	0 ^a	1,62 ^c	0 ^d	0 ^d	1,66 ^e	0,15 ^b
<i>Càng cua</i>	0 ^a	19,27 ^b	60,52 ^b	24,81 ^b	20,46 ^d	0,85 ^b
<i>Dây Cóc</i>	0,16 ^a	0,78 ^c	18,59 ^c	10,73 ^c	57,79 ^b	0 ^b
<i>Thần thông</i>	0,58 ^b	3,43 ^{de}	0 ^d	2,12 ^d	3,02 ^e	0 ^b
<i>Lốt</i>	0 ^a	0 ^c	0,36 ^d	0 ^d	45,60 ^c	0,37 ^b
<i>Chloroquine</i>	80 ^b	81,69 ^a	81,31 ^a	82,89 ^a	81,52 ^a	82,01 ^a

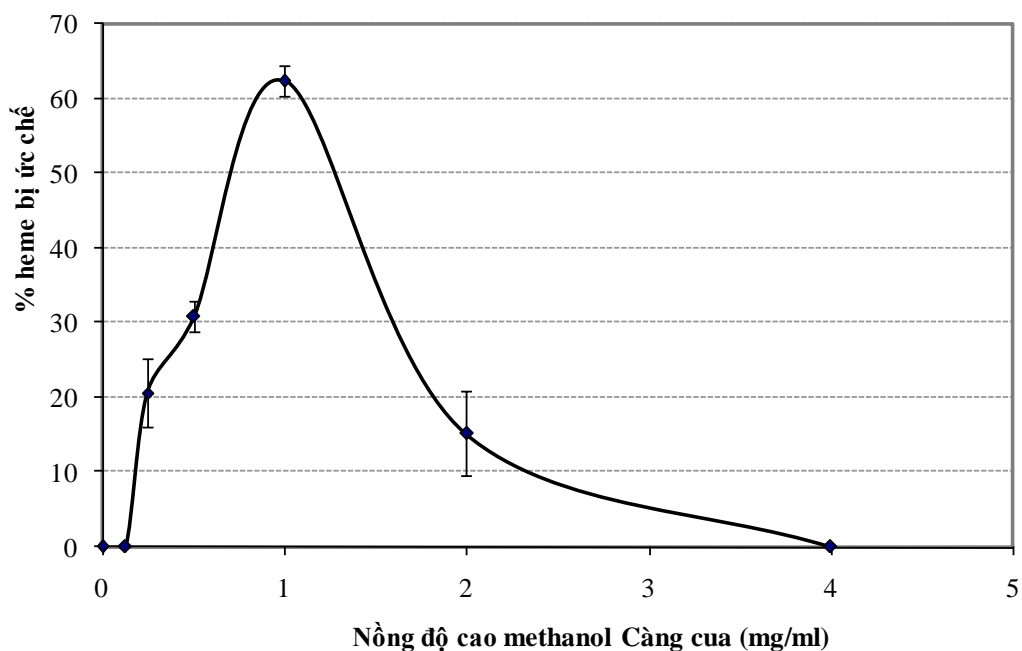
Ghi chú: các chữ theo sau khác nhau trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê 95%

Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở nồng độ 4 mg/ml và nồng độ 0,125 mg/ml hầu hết các cao chiết không có hiện tượng ức chế sự biến đổi heme thành BH. Cây Thần thông, cây Bá bệnh gần như không ức chế sự biến đổi heme thành BH ở các nồng độ khảo sát, riêng cây Lốt có ức chế ở nồng độ 0,25 mg/ml.

Ở nồng độ 2 mg/ml có bốn nghiệm thức có khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH và sự ức chế này khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức không cao chiết, các cao có khả năng ức chế là cao chiết từ cây Gòn (có 7,11% heme bị ức

ché), cao chiết từ cây Chó đẻ thân hồng (có 17,36% heme bị ức chế), cao chiết từ cây Chó đẻ thân xanh (có 12,23% heme bị ức chế) và nghiệm thức cao chiết từ cây Càng cua (có 19,27% heme bị ức chế). Kết quả thí nghiệm của Quan *et al.* (2003) khi sử dụng cao chiết methanol từ cây Chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) ở nồng độ 5,9 $\mu\text{g/ml}$ với ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* thì có 50% ký sinh trùng sốt rét bị ức chế không thể phát triển, còn cao chiết H₂O-methanol từ cây Gòn (*Ceiba pentandra*) cũng làm ảnh hưởng đến quá trình phát triển của ký sinh trùng sốt rét, ở nồng độ 3 $\mu\text{g/ml}$ ức chế 50% ký sinh trùng sốt rét không phát triển (Khan *et al.*, 2008).

Mẫu cao chiết từ cây Càng cua có hoạt tính ức chế sự tổng hợp BH xuất hiện liên tục ở các nồng độ khác nhau (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml và 0,25 mg/ml) được thực hiện thí nghiệm để tìm giá trị IC₅₀ (nồng độ cao chiết ức chế 50% sự tổng hợp BH từ heme). Kết quả thí nghiệm khảo sát sự ức chế biến đổi heme thành BH của cao Càng cua được trình bày trong hình 1 cho thấy, ở nồng độ 0,125 mg/ml thì cao chiết từ cây Càng cua không ức chế sự hình thành BH (100% heme biến đổi thành BH), khi tăng nồng độ lên 0,25 mg/ml thì bắt đầu có hiện tượng ức chế sự hình thành BH (20,56% heme bị ức chế không biến đổi thành BH). Khi tăng nồng độ cao chiết đến 4 mg/ml thì không xảy ra hiện tượng ức chế nữa (100% heme biến đổi thành BH). Trong dãy nồng độ thí nghiệm, khi ở nồng độ cao chiết là 1 mg/ml thì xảy ra hiện tượng ức chế cao nhất (có 62,46% heme bị ức chế).



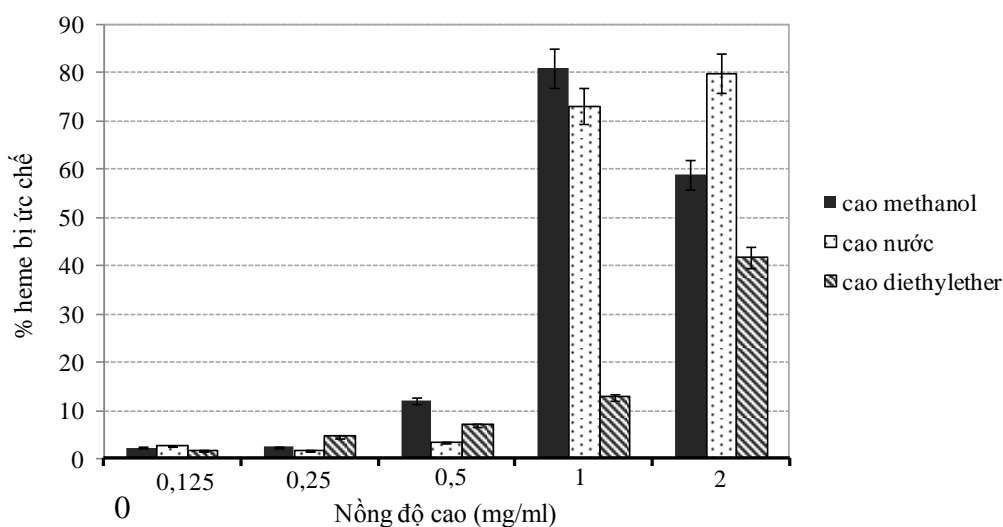
Hình 1: Khả năng ức chế sự tổng hợp BH của cao chiết Càng cua

Giá trị IC₅₀ của cao chiết Càng cua được tính toán dựa vào đồ thị (Hình 1) cho thấy IC₅₀ của cao Càng cua là 0,8 mg/ml. Từ kết quả thí nghiệm cho ta thấy, nồng độ cao chiết của cây Càng cua có hoạt tính tăng dần từ 0,25 mg/ml đến 1 mg/ml, cao nhất là 1 mg/ml, khả năng ức chế của cây Càng cua giảm khi nồng độ lớn hơn 1 mg/ml. Điều này cũng phù hợp với cơ chế tác dụng của các thuốc sốt rét lên sự ức chế phản ứng biến đổi heme thành BH (Christophe *et al.*, 2007). Nhiều nghiên cứu

cho thấy, thuốc sốt rét chloroquine (CQ) tương tác với vòng porphyrin của heme bằng tương tác π - π . Sự tương tác này sẽ làm cho các dimer (hai phân tử heme liên kết nhau) không liên kết được với nhau để tạo thành BH. Sự tương tác của thuốc và heme sẽ tối ưu nhất với tỷ lệ xác định (Saranya *et al.*, 2006). Như vậy, nồng độ cao chiết cây Càng cua 1 mg/ml, có thể có những thành phần hóa học nào đó tương tác với heme tối ưu nhất để ức chế sự tổng hợp BH.

3.2 Khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH của các phân đoạn cao Càng cua

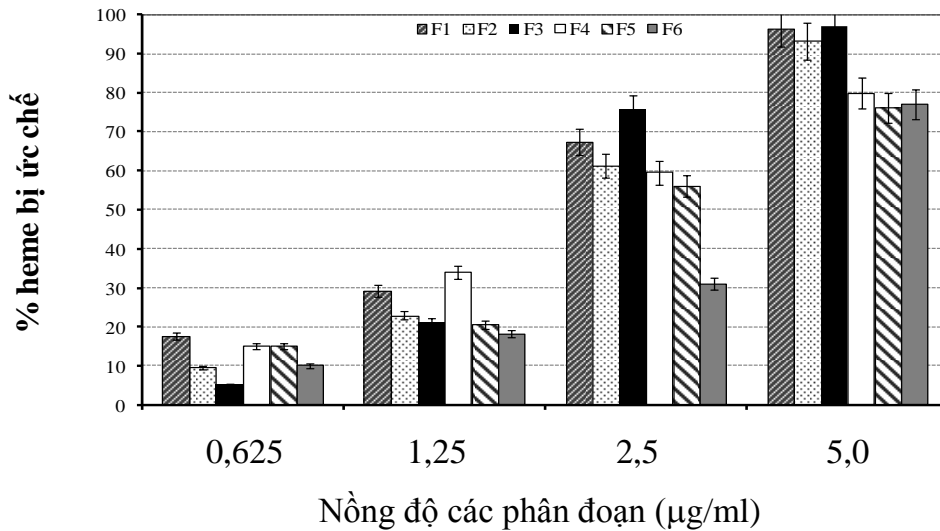
Cao methanol được tiếp tục trích bằng hai pha lỏng–lỏng của dung môi nước và diethyl ether. Sau đó các cao này gồm cao methanol, cao nước và cao diethyl ether được khảo khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH theo phương pháp của Huy *et al.* (2007). Kết quả thí nghiệm được trình bày trong hình 2 cho thấy các cao methanol, cao nước và cao diethyl ether của cây Càng cua đều có khả năng ức chế sự tổng hợp BH. Cao methanol ức chế mạnh nhất ở nồng độ 1 mg/ml và có thể ức chế 84,7% sự kết tinh của heme thành BH. Kết quả thí nghiệm này khá phù hợp với thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH của cao methanol được khảo sát trong phần 3.1. Tuy nhiên, khả năng ức chế của cao methanol từ cây Càng cua trong thí nghiệm này cao hơn so với phương pháp tinh sạch BH sau phản ứng (62,46% heme bị ức chế) bởi vì phương pháp trong thí nghiệm này hiệu suất phản ứng cao hơn (dữ liệu không trình bày). Cao nước cho thấy cũng ức chế sự biến đổi heme thành BH tương tự như đối với cao methanol và ở nồng độ 2 mg/ml cho thấy có khả năng ức chế cao nhất với tỷ lệ 79,79%. Riêng sự ức chế biến đổi heme thành BH đối với cao diethyl ether thấp hơn so với cao methanol và cao nước, ở nồng độ 2 mg/ml chỉ ức chế 41,46%. Như vậy, những chất có hoạt tính ức chế sự biến đổi heme thành BH có thể là những chất tan trong nước. Chúng tôi chọn cao nước để phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC).



Hình 2: Sự ức chế sự tổng hợp BH của cao chiết Càng cua

3.3 Khảo sát khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH của các phân đoạn (fraction, F) sau khi phân tích HPLC của cao nước từ cây Càng cua

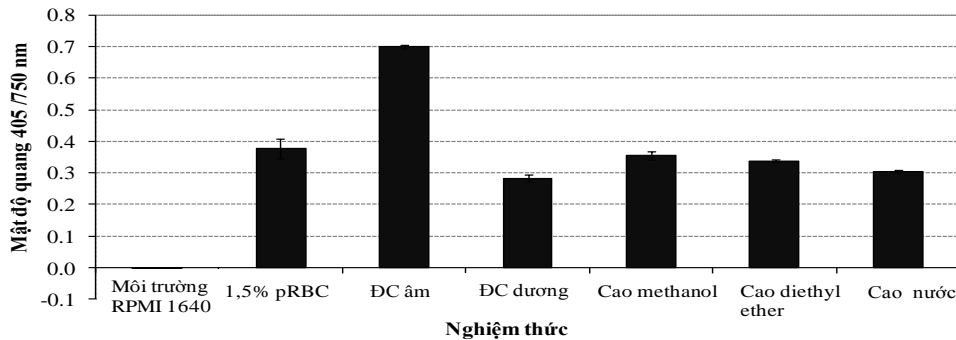
Các phân đoạn của cao nước sau khi tách bằng HPLC được thử khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH *in vitro*. Chúng tôi tách được nhiều phân đoạn của cao nước, sau khi xác định khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH chúng tôi tìm được sáu phân đoạn có khả năng ức chế sự tổng hợp BH *in vitro*, sáu phân đoạn này được ký hiệu từ F1 đến F6. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong hình 3 cho thấy ở nồng độ 5 µg/ml tất cả các phân đoạn từ F1 đến F6 đều có khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH khá mạnh. Tỷ lệ phần trăm heme bị ức chế của phân đoạn F1, F2, F3, F4, F5, F6 ở 5 µg/ml lần lượt là 96,9 ± 3,4, 93,31 ± 5,97, 96,92 ± 4,43, 79,82 ± 6,31, 76,2 ± 4,96, 76,97 ± 13,96.



Hình 3: Sự ức chế sự tổng hợp BH của các phân đoạn HPLC

3.4 Sự ức chế tổng hợp BH ở pRBC của các phân đoạn HPLC

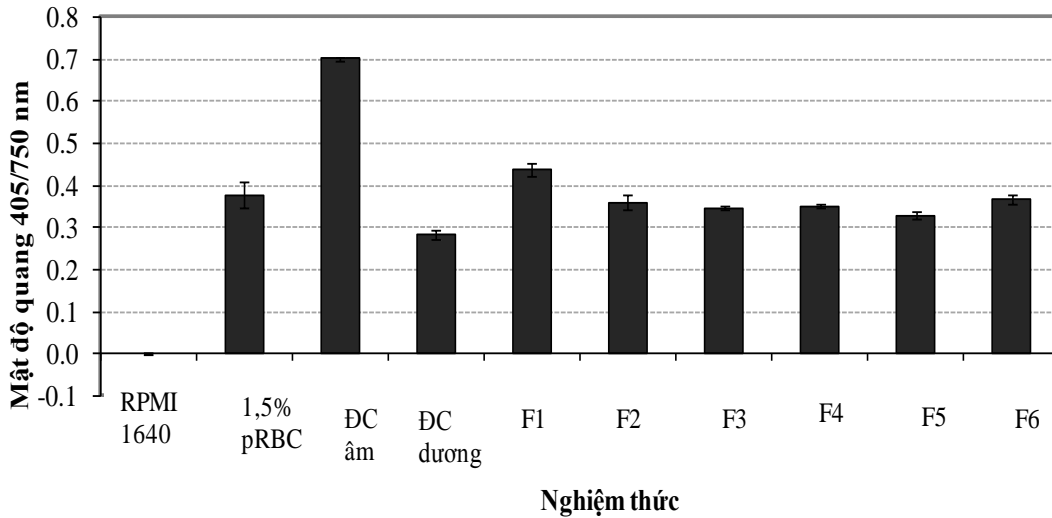
Chúng tôi khảo sát khả năng ức chế sự tổng hợp BH của các phân đoạn cao methanol, cao nước, cao diethyl ether và các phân đoạn của cao nước sau khi phân tách bằng HPLC cho thấy ở mức độ tế bào các cao này đều ức chế sự tổng hợp BH (Hình 4) sự ức chế của các cao này so với mẫu đối chứng đều khác biệt có ý nghĩa thống kê.



Hình 4: Khả năng ức chế sự tổng hợp BH ở mức độ tế bào của các cao Càng cua

Ghi chú: 1,5 %pRBC: không ủ; ĐC âm: 1,5 %pRBC ủ 3 ngày; ĐC dương: 1,5%pRBC + quinine ủ 3 ngày
Cao methanol, cao nước, cao ether: 1,5 %pRBC + với các cao ủ 3 ngày

Tương tự khả năng ức chế sự tổng hợp BH của các phân đoạn HPLC của cao nước sau khi phân tách bằng kỹ thuật HPLC ở mức độ tế bào được trình bày trong hình 5. Kết quả ở hình 5 cho thấy các phân đoạn của cao nước sau khi tách bằng HPLC có khả năng ức chế ở mức độ *in vitro* đều có khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH ở mức độ tế bào một cách khác biệt rất có ý nghĩa thống kê.



Hình 5: Khả năng ức chế sự tổng hợp BH ở mức độ tế bào của các phân đoạn HPLC

Ghi chú: RPMI 1640: môi trường RPMI; 1,5 % pRBC: không ủ; ĐC âm: 1,5 % pRBC ủ 3 ngày;

ĐC dương: 1,5% pRBC + quinine ủ 3 ngày F1-F6: 1,5 % pRBC + các phân đoạn HPLC sau 3 ngày ủ

Tám cây thuốc mà dân gian vẫn sử dụng để trị sốt rét, hoặc hạ sốt đã được khảo sát chứng minh được dây Cóc và cây Càng cua có khả năng ức chế sự tổng hợp BH khá mạnh và ổn định. Cao chiết Càng cua khi phân tích ở các phân đoạn nước và diethyl ether cũng như HPLC đều ức chế sự biến đổi heme thành BH ở mức độ *in vitro* và tế bào. Tất cả các kết quả trên có thể kết luận rằng trong cây Càng cua có những thành phần hóa học có khả năng ức chế sự biến đổi heme thành BH ở mức độ *in vitro* và mức độ tế bào. Kết quả mà chúng tôi đạt được góp phần đánh giá nguồn tài nguyên thực vật cây Càng cua theo hướng dược phẩm. Hiện nay một số ít công trình nghiên cứu cho thấy cây Càng cua có khả năng kháng khuẩn (Khan *et al.*, 2002), cây Càng cua còn được biết có khả năng kháng viêm và chống dị ứng (Maria de *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006), ngoài ra cũng có nghiên cứu chứng minh khả năng ức chế tế bào ung thư của một số chất được trích từ cây Càng cua (Xu *et al.*, 2006), cây Càng cua cũng được biết có khả năng hạ sốt, giảm đau (Khan *et al.*, 2008). Như vậy khả năng kháng sốt rét của các hợp chất trong cây Càng cua được chứng minh trong những thí nghiệm của chúng tôi góp phần bổ sung một cách khoa học và hệ thống những hoạt tính sinh học của các hợp chất có trong cây Càng cua.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Christophe L, Lelièvre J, Benoit-Vical F & Meunier B. 2007. Trioxaquines and Heme-Artemisinin Adducts Inhibit the In Vitro Formation of Hemozoin Better than Chloroquine. *Antimicrobial Agents Chemother.* 51(10): 3768–3770. . *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3768-3770.
- Egan TJ, Hempelmann E & Mavuso WW. 1999. Characterisation of synthetic beta-haematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation. *J Inorg Biochem* **73**, 101-107.
- Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R & Nwaka S. 2004. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 509-520.
- Hasimah A, Abdul Karim AG & Lait D. 1991. In vitro production of alkaloids from *Tinospora cripa* L. In: *Medicinal products from tropical rain forests. Proceedings of the conference. May 13-15. Forest Research Institute. Malaysia.*
- Phạm Hoàng Hộ. 2003. Cây cỏ Việt Nam. NXB Trẻ TP. Hồ Chí Minh.
- Huy NT, Uyen DT, Maeda A, Trang DT, Oida T, Harada S & Kamei K. 2007. Simple colorimetric inhibition assay of heme crystallization for high-throughput screening of antimalarial compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 350-353.
- Khan A, Rahman M & Islam S. 2008. Antipyretic Activitic of *Peperomia pellucida* Leaves in Rabbit. *Turk J Biol.* **32**, 37-41.
- Khan MR & Omosolo AD. 2002. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. *Fitoterapia* **73**, 251-254.
- Maria de FAB, Dmitrieva IM, Franzotti AR, Antonioli MAR & Marchioro M. 2003. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) (Piperaceae). *J. Ethnopharmacology* **91**, 215-218.
- Orjih AU. 2001. On the mechanism of hemozoin production in malaria parasites: activated erythrocyte membranes promote beta-hematin synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**, 746-752.
- Phillipson JD & Wright CW. 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *J Ethnopharmacol* **32**, 155-165.
- Quan LT, Yasuhiro T, Jun-ya U, Nhan NT, Yukiko B, Khurshida B, Hye-Sook K, Yusuke W, Qui TK & Shigetoshi K. 2003. *In vitro* antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine. *J Ethnopharmacology* **86**, 249-252
- Saranya A, Chapoomram S, Kuaha K, Chirachariyavej T & Wilairat P. 2006. Targeting of Hematin by the Antimalarial Pyronaridine. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2197-2200.
- Sullivan DJ, Jr., Gluzman IY & Goldberg DE. 1996. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* **271**, 219-222.
- Trager W & Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, 193:673-675. *Science* **193**, 673-675.
- Trang DT, Huy NT, Uyen DT, Sasai M, Shiono T, Harada S & Kamei K. 2006. Inhibition assay of beta-hematin formation initiated by lecithin for screening new antimalarial drugs. *Anal Biochem* **349**, 292-296.
- Trigg PI & Kondrachine AV. 1998. Malaria: Parasite Biology. Pathogenesis and Protection. In: *Sherman IW. In American Society for Microbiology Edited bay: Sherman IW, ASM Press. 11-22.*
- Xu S, Li N, Ning MM, Zhou CH, Yang QR & Wang NM. 2006. Bioactive Compounds from *Peperomia pellucida*. *J. Nat. Prod* **69**, 247-250.