



KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME XANTHINE OXIDASE TỪ LÁ SA KÊ *ARTOCARPUS ALTILIS* (PARK.) FOSB

Đái Thị Xuân Trang¹, Huỳnh Ngọc Trúc² và Nguyễn Trọng Tuấn¹

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

² Sinh viên ngành Sinh học khóa 36, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 13/02/2014

Ngày chấp nhận: 30/06/2014

Title:

*A study on xanthine oxidase inhibitory activity of ethanolic extract from the leave of *Artocarpus altilis* (Park.) Fosb*

Từ khóa:

*Acid uric, *Artocarpus altilis*, allopurinol, bệnh Gout, xanthine oxidase*

Keywords:

*Acid uric, allopurinol, *Artocarpus altilis*, Gout disease, xanthine oxidase*

ABSTRACT

*Hyperuricemia is associated with gout, and also closely related to cardiovascular diseases, renal calculus, diabetes and metabolic syndrome. Xanthine oxidase which catalyses the oxidation of hypoxanthine to xanthine and then to uric acid, plays a crucial role in gout. In treatment of gout, allopurinol is clinically used as xanthine oxidase inhibitor, but this drug suffers from many side effects. Therefore, new alternatives with increased therapeutic activity and least side effects are desired. Herein, we report a study on using the ethanolic extract from the leaves of *Artocarpus altilis* (Park.) Fosb as xanthine oxidase inhibitor in vitro in gout treatment. The results showed that the optimal concentrations for uric acid production of xanthine and xanthine oxidase were 0.5 mM and 0.0125 U, respectively, with reactive productivity being $93.36 \pm 0.09\%$. Moreover, the activity of xanthine oxidase was almost completely inhibited ($97.96 \pm 0.49\%$) at 0.5 mg/mL of crude extract and the estimated value of IC_{50} was 0.198 mg/mL.*

TÓM TẮT

*Tăng acid uric không chỉ là nguyên nhân gây nên bệnh gout, mà còn làm tăng nguy cơ bệnh tim mạch, sỏi thận, đái tháo đường và các hội chứng chuyển hóa. Sự hình thành acid uric được tạo ra do enzyme xanthine oxidase xúc tác oxy hóa hypoxanthine thành xanthine và oxy hoá xanthine thành acid uric, nguyên nhân gây bệnh gout. Allopurinol được dùng như một chất ức chế enzyme xanthine oxidase trong điều trị bệnh gout, tuy nhiên allopurinol cũng có nhiều tác dụng phụ. Vì thế, yêu cầu hiện nay là tìm ra hợp chất mới có hoạt tính chữa trị cao và ít ảnh hưởng nhất. Mục đích đề tài là đánh giá hoạt động ức chế enzyme xanthine oxidase in vitro từ cao ethanol lá sa kê (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosb) trong điều trị bệnh gout. Kết quả cho thấy, hiệu suất phản ứng hình thành acid uric đạt tối ưu ($93,36 \pm 0,09\%$) ở nồng độ xanthine và xanthine oxidase lần lượt là 0,5 mM và 0,0125 U. Ngoài ra, hiệu quả ức chế hoạt tính enzyme xanthine oxidase bị ức chế gần như hoàn toàn ($97,96 \pm 0,49\%$) ở nồng độ cao ethanol lá sa kê 0,5 mg/mL và nồng độ cao chiết ức chế 50%, $IC_{50} = 0,198$ mg/mL.*

1 GIỚI THIỆU

Xanthine dehydrogenase (XDH) hay xanthine oxidase (XO) là một phức hợp metallo-flavoprotein tạo ra các gốc tự do. Enzyme XO xúc tác quá trình oxy hoá hypoxanthine thành xanthine và oxy hoá xanthine thành acid uric. Enzyme XO có vai trò quan trọng trong quá trình dị hoá vòng purin, là nguyên nhân gây ra bệnh gout (Rasaratnam and Christophidis, 1995). Bệnh gout (Thống phong) thường gắn liền với mức độ acid uric trong huyết thanh cao, dẫn đến lắng đọng các tinh thể urat. Kết quả là gây ra các cơn đau dữ dội ở các khớp về đêm, đặc biệt là ở ngón chân và ngón tay cái (Kramer and Curhan, 2002). Bệnh gout ngày càng phổ biến trong xã hội hiện đại và trở thành một vấn đề đáng quan tâm, chỉ tính riêng ở Mỹ đã có hơn hai triệu người mắc bệnh, căn bệnh này cũng tăng lên nhanh chóng ở Trung Quốc (Ying *et al.*, 2004).

Ở người bình thường, nồng độ acid uric trong máu ở nam là 3,4-7,0 mg/dL (200-420 $\mu\text{mol/L}$) và ở nữ là 2,4-5,7 mg/dL (140-340 $\mu\text{mol/L}$). Để mức acid uric được cân bằng hằng ngày, acid uric được thải ra ngoài chủ yếu theo đường thận qua nước tiểu, một phần qua phân và các đường khác. Vì nhiều nguyên nhân nguyên phát (bệnh gắn liền với các yếu tố di truyền, cơ địa) và thứ phát như thường xuyên ăn nhiều thức ăn chứa nhiều purin (gan, thịt, cá...), uống nhiều rượu, bia làm cho quá trình chuyển hóa purin thành acid uric tăng. Theo báo cáo lâm sàng, acid uric không chỉ liên quan đến bệnh gout, mà còn làm tăng nguy cơ rối loạn tim mạch, sỏi thận, đái tháo đường (Nakanishi *et al.*, 1999). Vì vậy, cần có những nghiên cứu, tìm hiểu về các chất có khả năng ức chế enzyme XO, cũng như ngăn chặn sự hình thành acid uric. Những hợp chất có hoạt tính sinh học nguồn gốc từ tự nhiên ngày càng được quan tâm nghiên cứu và đã thể hiện tính an toàn và hiệu quả trong việc phòng ngừa và điều trị bệnh gout. Theo kinh nghiệm dân gian, cây sa kê có công dụng chữa trị bệnh gout. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu khoa học nào được công bố về công dụng trên cũng như khả năng ức chế enzyme XO của cao chiết lá sa kê. Do đó, đề tài được thực hiện với mục đích là đánh giá khả năng ức chế enzyme XO mức độ *in vitro* để ngăn sự hình thành acid uric, nguyên nhân gây bệnh gout.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu này gồm máy đo pH Mettler Toledo, cân phân tích Mettler Toler (Thụy Sĩ), máy trộn mẫu Vortex,

máy đo mật độ quang Beckman Coulter 640B (Mỹ) và máy cô quay chân không Heidolph (Đức).

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm xanthine (Nacalai tesque, Japan), xanthine oxidase (Sigma Aldrich, Mỹ), allopurinol (Wako, Nhật), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DMSO), sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), dung dịch đệm phosphate pH 7,5, nước cất và ethanol 99,5%.

Vật liệu thí nghiệm là lá sa kê (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosb) khô tự rụng được thu ở Vườn sinh vật, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Trích cao lá sa kê bằng dung môi ethanol

Mẫu lá sa kê khô được rửa sạch bằng nước, phơi ngoài nắng, đem xay nhuyễn và được gói bằng giấy lọc để thực hiện theo kỹ thuật ngâm dầm (maceration) với ethanol (99,5%).

Mẫu sau khi ngâm 3 ngày (72 giờ) ở nhiệt độ phòng, phần bã hay sinh khối còn lại được lọc bỏ, dung dịch cao chiết được cô quay dưới áp suất thấp (-0,8 Bar) và ở nhiệt độ thấp khoảng 55°C, để thu hồi dung môi ethanol bằng hệ thống cô quay (evaporator). Cao thô sau khi thu hồi được trữ ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme XO và xanthine lên phản ứng hình thành acid uric

Mục đích của thí nghiệm này là khảo sát ảnh hưởng nồng độ giữa enzyme XO và cơ chất xanthine trong phản ứng hình thành acid uric. Hỗn hợp phản ứng gồm có xanthine ở các nồng độ 0,5; 0,25; 0,125 và 0,0625 mM. Nồng độ enzyme XO là 0; 0,125; 0,025; 0,05 và 0,1 U là các nồng độ cuối cùng trong phản ứng. Nồng độ XO 0 U được sử dụng làm nghiệm thức đối chứng. Các nghiệm thức được bố trí theo kiểu thừa số và được trình bày trong Bảng 1.

Tiến hành thí nghiệm: 100 mM xanthine được pha trong 1 mL NaOH 1M, sau đó xanthine được pha loãng trong dung dịch đệm phosphat (0,2 M, pH 7,5) để được các nồng độ xanthine khác nhau. Phản ứng được thêm vào enzyme XO pha loãng thành các nồng độ 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 và 0 U trong dung dịch đệm phosphat (0,2 M, pH 7,5). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 30 phút. Lượng acid uric tạo ra được xác định bằng cách đo ở bước sóng 295 nm (Chrysoula *et al.*, 2012).

Bảng 1: Bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của enzyme XO và xanthine trong phản ứng hình thành acid uric

Nồng độ Xanthine (mM)	Nồng độ enzyme XO (U)				
	0 (B1)	0,0125 (B2)	0,025 (B3)	0,05 (B4)	0,1 (B5)
0,0625 (A1)	A1 B1	A1 B2	A1 B3	A1 B4	A1 B5
0,125 (A2)	A2 B1	A2 B2	A2 B3	A2 B4	A2 B5
0,25 (A3)	A3 B1	A3 B2	A3 B3	A3 B4	A3 B5
0,5 (A4)	A4 B1	A4 B2	A4 B3	A4 B4	A4 B5

2.2.3 Khảo sát khả năng ức chế enzyme XO của allopurinol

Mục đích của thí nghiệm này là khảo sát khả năng ức chế của allopurinol (AP) đến hoạt động của enzyme XO và dựng đường chuẩn theo phần trăm enzyme XO bị ức chế bởi AP. Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp lại. Hỗn hợp phản ứng gồm có AP với các nồng độ cuối cùng trong phản ứng là 0; 0,125; 0,25; 0,375 và 0,5 mM.

Tiến hành thí nghiệm: Hỗn hợp phản ứng ban đầu gồm 200 µL chứa XO 0,0125 U và AP ở các nồng độ khác nhau, được ủ ở nhiệt độ phòng (25 °C) trong 30 phút. Sau đó, phản ứng được bổ sung 100 µL xanthine 0,5 mM và được tiếp tục ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng sau cùng được đo độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 295 nm.

Hiệu suất ức chế hoạt động của enzyme xanthine oxidase được tính theo công thức:

$$100 \times (\text{Độ hấp thụ của mẫu đối chứng} - \text{Độ hấp thụ của mẫu thí nghiệm}) / (\text{Độ hấp thụ của mẫu đối chứng})$$

2.2.4 Khảo sát khả năng ức chế enzyme XO của cao chiết ethanol lá sa kê

Mục đích thí nghiệm là khảo sát khả năng ức chế của cao ethanol lá sa kê đến hoạt động của enzyme XO *in vitro*, dựa vào thử nghiệm xanthine oxidase. Kết quả khảo sát được đánh giá dựa vào phần trăm enzyme XO bị ức chế.

Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp lại. Hỗn hợp phản ứng gồm có cao ethanol lá sa kê với các nồng độ trong phản ứng là 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 và 0,5 mg/mL. Nghiệm thức đối chứng không sử dụng cao ethanol lá sa kê.

Tiến hành thí nghiệm: Cao ethanol lá sa kê 10 mg/mL được pha trong dung môi dimethyl sulfoside (DMSO) 0,1 M. Sau đó, cao ethanol lá sa kê 10 mg/mL được pha loãng thành các nồng độ khác nhau. Phản ứng được tiến hành tương tự thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế enzyme XO của AP.

2.2.5 Thống kê và phân tích số liệu

Các số liệu được đo và ghi lại sau mỗi lần thí nghiệm. Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0 và vẽ đồ thị bằng Microsoft excel.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Trích cao lá sa kê bằng dung môi ethanol

Trọng lượng mẫu ngâm ban đầu là 800 g, trọng lượng cao thu được sau khi cô quay là 24,02 g, cho thấy được hiệu suất cô quay của cao chiết là 3%. Cao ethanol lá sa kê thu được sau khi cô quay ở dạng dẻo sệt và được trữ ở nhiệt độ 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

3.2 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme XO và xanthine lên phản ứng hình thành acid uric

Trong các phản ứng enzyme, nồng độ cơ chất lớn hơn nhiều lần so với nồng độ enzyme để đảm bảo enzyme hoạt động với hiệu suất cao nhất. Trong cùng nồng độ cơ chất, khi tăng nồng độ enzyme thì sẽ gây ra hiện tượng hoạt hóa làm tăng tốc độ phản ứng và thời gian phản ứng sẽ ngắn lại (Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2007). Khi tăng nồng độ enzyme đến một giá trị nhất định thì thời gian phản ứng không giảm hơn được nữa. Bởi vì lượng enzyme đã kết hợp hết với cơ chất, lượng enzyme còn lại là dư, nên khi tăng nồng độ enzyme cũng không làm ảnh hưởng đến phản ứng (Trần Đình Toại và Nguyễn Thị Vân Hải, 2005). Trong cùng một nồng độ enzyme, khi tăng nồng độ cơ chất thì thời gian phản ứng sẽ tăng lên và tốc độ của phản ứng đạt đến một giá trị nhất định thì sẽ không tăng lên nữa (Trần Đình Toại và Nguyễn Thị Vân Hải, 2005). Do đó, nồng độ enzyme và cơ chất liên quan mật thiết với nhau. Ngoài ra, khi phân tích sự tương tác của hai nhân tố nồng độ enzyme và cơ chất lên hiệu suất phản ứng thì kết quả phân tích có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Vì vậy, thí nghiệm này là sự tương tác giữa hai nhân tố cơ chất và enzyme.

Phản ứng hình thành acid uric được tạo ra từ sự chuyển hóa xanthine dưới sự xúc tác của enzyme XO, trong điều kiện thời gian và nhiệt độ thích hợp. Mục đích thí nghiệm là xác định nồng độ cơ chất xanthine và nồng độ enzyme XO thích hợp để hiệu suất phản ứng đạt cao nhất.

Dựa vào kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của

nồng độ enzyme XO và xanthine đến hiệu suất phản ứng hình thành acid uric thì thấy rõ hiệu suất phản ứng tăng tỉ lệ thuận theo nồng độ của enzyme XO và cơ chất xanthine. Ở nồng độ enzyme XO là 0 U được xem là nghiệm thức đối chứng và hiệu suất phản ứng là 0%. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Bảng 2 và Hình 1.

Bảng 2: Kết quả ảnh hưởng của nồng độ enzyme XO và nồng độ xanthine đến hiệu suất phản ứng hình thành acid uric

Nồng độ Xanthine (mM)	Nồng độ enzyme XO (U)				
	0 (B1)	0,0125 (B2)	0,025 (B3)	0,05 (B4)	0,1 (B5)
0,0625 (A1)	0,00	85,59 ^b ±2,24	93,33 ^{ab} ±0,5	94,79 ^{ab} ±0,11	97,64 ^a ±0,04
0,125 (A2)	0,00	62,38 ^d ±0,55	77,75 ^c ±1,8	85,60 ^b ±0,24	93,71 ^a ±0,14
0,25 (A3)	0,00	85,29 ^b ±0,27	85,63 ^b ±0,33	89,51 ^a ±0,13	92,39 ^a ±0,12
0,5 (A4)	0,00	93,96 ^a ±0,09	93,82 ^a ±0,04	94,08 ^a ±0,05	93,82 ^a ±0,16

Ghi chú: Các chữ cái theo sau trong cùng hàng (cùng nồng độ xanthine) khác nhau sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

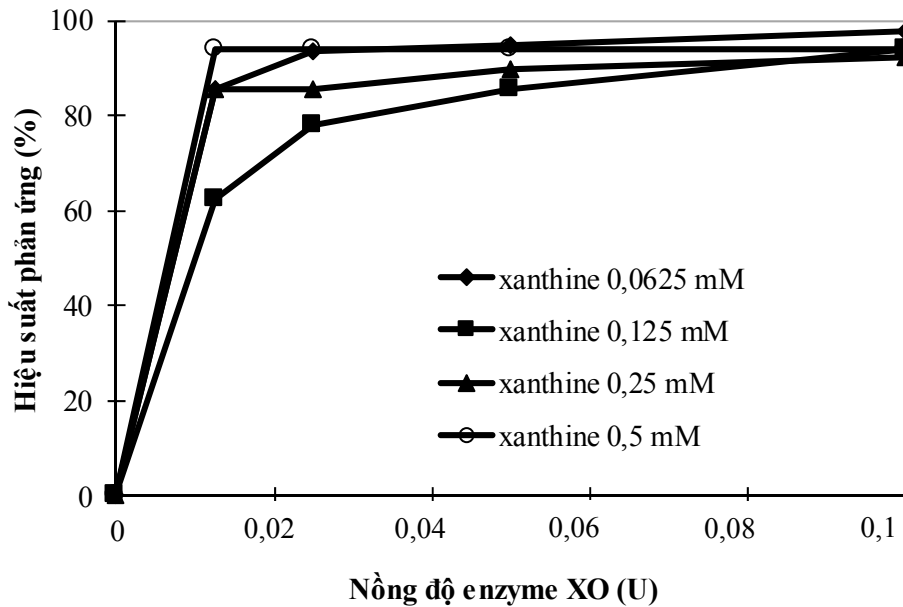
Kết quả thí nghiệm (Bảng 2) cho thấy, ở các nghiệm thức xanthine 0,0625 mM phản ứng với enzyme XO có nồng độ 0,0125; 0,025; 0,05 và 0,1 U thì hiệu suất phản ứng lần lượt là 85,59 ± 2,24%; 93,33 ± 0,5%; 94,79 ± 0,11% và 97,64 ± 0,04%. Kết quả thí nghiệm cho thấy ở nồng độ cơ chất xanthine 0,0625 mM thì hiệu suất phản ứng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nồng độ enzyme XO 0,0125 U (85,59 ± 2,24%) và enzyme XO 0,1 U (97,64 ± 0,04%). Ở nồng độ cơ chất xanthine 0,0625 mM thì hiệu suất phản ứng khác biệt không có ý nghĩa ở nồng độ enzyme XO 0,025 U (93,33 ± 0,5%) và 0,05 U (94,79 ± 0,11%). Chứng tỏ, ở nồng độ enzyme XO 0,0125 U không đủ để chuyển hóa lượng cơ chất xanthine (85,59 ± 2,24%) và khi tăng nồng độ enzyme XO 0,1 U thì lượng cơ chất xanthine đã được chuyển hóa hết (97,64 ± 0,04%). Ngoài ra, ở nồng độ enzyme XO 0,1 U đạt hiệu suất phản ứng cao nhất so với các nghiệm thức còn lại.

Ở các nghiệm thức xanthine 0,125 mM phản ứng với enzyme XO ở các nồng độ là 0,0125; 0,025; 0,05 và 0,1 U thì khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa bốn nghiệm thức và hiệu suất phản ứng lần lượt là 62,38 ± 0,55%; 77,75 ± 1,8%; 85,60 ± 0,24% và 93,71 ± 0,14%. Hiệu suất phản ứng tăng dần theo nồng độ enzyme XO và hiệu suất phản ứng đạt cao nhất ở nồng độ enzyme XO 0,1 U. Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi tăng dần nồng độ

enzyme đến một giá trị nhất định thì vẫn không ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng, do lượng cơ chất xanthine đã phản ứng hết.

Tương tự, ở các nghiệm thức xanthine 0,25 mM phản ứng với enzyme XO ở các nồng độ 0,0125; 0,025; 0,05 và 0,1 U thì hiệu suất phản ứng lần lượt là 85,29 ± 0,27%; 85,63 ± 0,33%; 89,51 ± 0,13% và 92,39 ± 0,12%. Kết quả thí nghiệm cho thấy khi tăng nồng độ enzyme XO từ 0,0125; 0,025 và 0,05 U thì hiệu suất phản ứng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, hiệu suất phản ứng ở nồng độ xanthine 0,25 mM với nồng độ enzyme XO 0,05 và 0,1 U cũng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy, lượng enzyme XO không đủ để chuyển hóa hết lượng cơ chất xanthine.

Trong cùng dãy nồng độ xanthine 0,5 mM thì bốn nồng độ enzyme được khảo sát cho kết quả khác biệt không có ý nghĩa thống kê, hiệu suất phản ứng lần lượt là 93,36 ± 0,09%; 93,82 ± 0,04%; 94,08 ± 0,04% và 93,82 ± 0,16%. Chứng tỏ enzyme XO 0,0125 U đủ để chuyển hóa cơ chất xanthine 0,5 mM. Ngoài ra, nồng độ XO 0,0125 U đáp ứng điều kiện sử dụng enzyme thấp nhất, nhằm tiết kiệm trong quá trình thí nghiệm. Do đó, nồng độ xanthine 0,5 mM và XO 0,0125 U được sử dụng cho các thí nghiệm sau với hiệu suất phản ứng là 93,36 ± 0,09%.



Hình 1: Ảnh hưởng của nồng độ enzyme XO và cơ chất xanthine đến hiệu suất phản ứng

3.3 Khảo sát khả năng ức chế enzyme XO của allopurinol

Đánh giá sự ức chế hoạt động của enzyme XO được xác định dựa vào mức độ acid uric được hình thành từ xanthine trong cùng một thời gian thí nghiệm. Chất có khả năng ức chế enzyme XO càng cao sẽ càng hạn chế sự hình thành acid uric, do đó mật độ quang của acid uric sẽ giảm. Giá trị hấp thụ cực đại của acid uric là 295 nm. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Khảo sát khả năng ức chế enzyme XO của AP

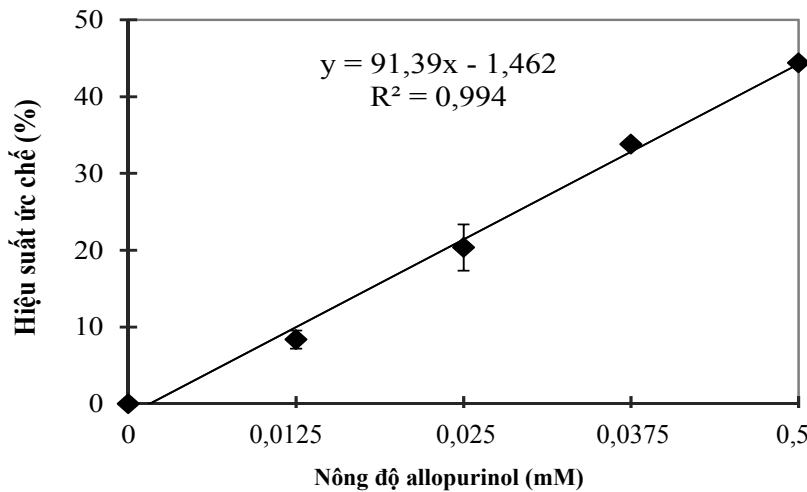
Nồng độ allopurinol (mM)	Phần trăm enzyme bị ức chế (%)
0 (ĐC)	0,00
0,125	8,36 ^c ± 1,19
0,25	20,36 ^d ± 3,01
0,375	33,82 ^c ± 0,2
0,5	44,39 ^b ± 0,48
0,625	49,64 ^a ± 0,64
0,75	50,96 ^a ± 0,96

Ghi chú: Các chữ cái theo sau trong cùng cột khác nhau sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Kết quả cho thấy khi tăng nồng độ AP lên thì hiệu suất ức chế enzyme XO cũng tăng

(Hình 2). Khả năng ức chế hoạt động của enzyme XO đạt cao nhất (50,96 ± 0,96%) ở nồng độ AP là 0,75 mM.

Ở nồng độ AP 0,125 mM thì phần trăm enzyme bị ức chế là 8,36±1,19%, khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (không có chất ức chế). Tương tự, khi tăng nồng độ AP từ 0,25 lên đến 0,375 và 0,5 mM thì phần trăm enzyme bị ức chế cũng tăng, hiệu suất ức chế lần lượt là 20,36 ± 3,01%; 33,82 ± 0,2% và 44,39 ± 0,48%. Ở nồng độ AP 0,625 mM và 0,75 mM thì hiệu quả ức chế khác biệt không có ý nghĩa thống kê lần lượt là 49,64 ± 0,64% và 50,96 ± 0,96%. Điều này có thể kết luận rằng, ở nồng độ AP 0,625 mM đã ức chế hết lượng enzyme XO trong phản ứng (Bảng 3). Cụ thể hơn, khả năng ức chế hoạt động enzyme XO của AP chỉ đạt giá trị tối đa nhất định. Sự ức chế hoạt động enzyme XO của AP sẽ không tăng nếu tiếp tục tăng nồng độ AP. Hiệu quả ức chế enzyme XO của AP tăng tuyến tính theo nồng độ trong khoảng từ 0; 0,125; 0,25; 0,375 và 0,5 mM. Do đó, đường chuẩn khả năng ức chế enzyme XO của AP trong khoảng nồng độ nêu trên được xem như đường chuẩn cho các thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế enzyme XO. Phương trình đường chuẩn có dạng $y = 91,39x - 1,462$ ($R^2 = 99,4\%$) (Hình 2).



Hình 2: Đường chuẩn khả năng ức chế enzyme XO của allopurinol

3.4 Khảo sát khả năng ức chế enzyme XO của cao chiết ethanol lá sa kê

Khả năng ức chế enzyme XO từ cao ethanol lá sa kê được đánh giá dựa vào phần trăm enzyme XO bị ức chế. Nồng độ AP tương đương được tính dựa vào phương trình đường chuẩn của AP (Hình 2). Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 4 và Hình 3.

Bảng 4: Khả năng ức chế enzyme XO của cao ethanol lá sa kê

Nồng độ cao chiết (mg/ml)	Phần trăm enzyme bị ức chế (%)	Hàm lượng chất ức chế có trong cao chiết (tương đương mM AP)
0 (ĐC)	0	0
0,1	35,25 ^c ± 1,32	0,4017 ^c ± 0,01
0,2	50,84 ^d ± 2,89	0,5723 ^d ± 0,03
0,3	84,99 ^c ± 0,43	0,9460 ^c ± 0,00
0,4	92,91 ^b ± 0,43	1,0326 ^b ± 0,00
0,5	97,96 ^a ± 0,49	1,0879 ^a ± 0,00

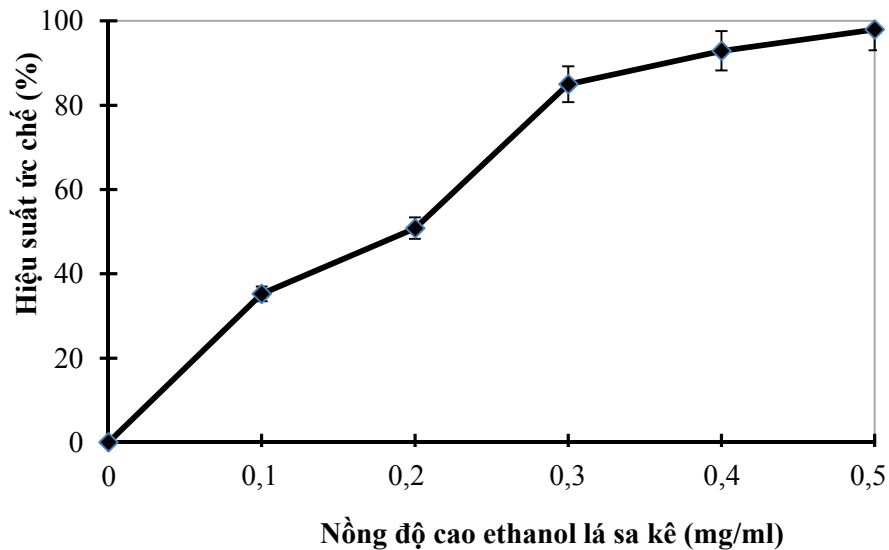
Ghi chú: Các chữ cái theo sau trong cùng cột khác nhau sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khả năng ức chế enzyme XO của cao ethanol lá sa kê tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết. Nồng độ cao chiết càng cao thì khả năng ức chế enzyme XO càng mạnh và ngược lại, khả năng ức chế enzyme XO giữa các nồng độ cao chiết khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Cụ thể là ở nồng độ cao chiết 0,1 mg/mL thì hiệu suất ức chế đạt đến $35,25 \pm 1,32\%$. Khi tăng nồng độ cao chiết từ 0,2; 0,3; 0,4 và 0,5 mg/mL thì hiệu quả ức chế enzyme XO tăng lần lượt là $50,84 \pm 2,89\%$; $84,99 \pm 0,43\%$; $92,91 \pm 0,43\%$ và $97,96 \pm 0,49\%$.

Hàm lượng chất ức chế enzyme XO có trong cao chiết lá sa kê tính tương đương mM AP tương ứng với nồng độ cao ở các nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 và 0,5 mg/mL là 0,4017; 0,5723; 0,9460; 1,0326 và 1,0879 mM (Bảng 4).

Ở nồng độ 0,5 mg/mL cao ethanol lá sa kê cho khả năng ức chế enzyme XO cao nhất ($97,96 \pm 0,49\%$), lượng enzyme XO gần như bị ức chế hoàn toàn. Chứng tỏ trong cao chiết ethanol lá sa kê có nhiều chất có hoạt tính ức chế enzyme XO. Có nghiên cứu chứng minh rằng, việc ức chế hoạt động enzyme XO không chỉ giảm nồng độ acid uric trong máu, mà còn giảm sự sản xuất các gốc tự do (Kong *et al.*, 2002).

Nhiều nghiên cứu đã phân tích các thành phần hóa học trong lá sa kê chứa nhiều hợp chất tannin, phenol, glycoside, saponin, steroid, terpenoid và anthraquinon (Siddesha *et al.*, 2011). Các hợp chất phenol, đặc biệt là flavonoid có hoạt tính ức chế mạnh đối với enzyme XO và tiềm năng chống oxy hóa cao. Trong nhóm flavonoid đáng chú ý là các hợp chất flavonol glycoside và cụ thể hơn là kaempferol và quercetin glycosides (Chrysoula *et al.*, 2012). Sự ức chế hoạt động enzyme XO được xem như là một cơ chế chống oxy hóa của các hợp chất polyphenol. Nhiều nghiên cứu về enzyme XO chứng minh rằng, hoạt động của enzyme XO là nguyên nhân dẫn tới sự tạo ra nhiều gốc tự do (Cotelle, 2001; Van *et al.*, 2002). Nên việc bổ sung các chất ức chế enzyme XO vừa có tác dụng ức chế sự tạo thành acid uric ngăn ngừa bệnh gout, cũng vừa có tác dụng ngăn chặn lại stress oxy hóa là nguyên nhân gây tổn thương tế bào và mô trong cơ thể.



Hình 3: Khả năng ức chế enzyme XO của cao ethanol lá sa kê

Khả năng ức chế enzyme XO của cao ethanol lá sa kê được xác định dựa vào giá trị IC_{50} (Nồng độ ức chế 50%, Inhibitory concentration of 50%). Giá trị IC_{50} được tính dựa vào đồ thị và phương trình của cao chiết lá sa kê (Hình 3). Giá trị IC_{50} của cao chiết lá sa kê là 0,198 mg/mL. Ngoài ra, một số thực vật được chiết xuất từ methanol như cây ngải cứu (*Artemisia vulgaris*), tô mộc (*Caesalpinia sappan*), đại bi (*Blumea balsamifera*), cúc (*Chrysanthemum sinense*) và chạch chiu (*Tetracera scandens*) có hoạt tính ức chế 50% enzyme XO dưới 0,02 mg/mL (Khalil *et al.*, 2011). Chiết xuất từ methanol của lá cây ngũ trảo (*Vitex Negundo L.*) và lá cây cà độc dược (*Datura metel L.*) có hoạt tính ức chế 50% enzyme lần lượt là $IC_{50} = 0,0785$ mg/mL và $IC_{50} = 0,0768$ mg/mL (Muthuswamy *et al.*, 2007). Từ các nghiên cứu trên, khi so sánh hoạt tính ức chế 50% enzyme XO của cao chiết ethanol lá sa kê với cao chiết methanol từ các thực vật trên thì hoạt tính ức chế 50% enzyme XO của cao chiết ethanol lá sa kê là yếu hơn (0,198 mg/mL). Tuy nhiên, các hợp chất sinh học trong cao chiết lá sa kê có khả năng ức chế enzyme XO và có tiềm năng sử dụng cao chiết lá sa kê như thực phẩm bổ sung trong điều trị bệnh gout.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Hiệu suất phản ứng hình thành acid uric tối ưu ở nồng độ enzyme XO là 0,0125 U và nồng độ cơ chất xanthine là 0,5 mM.

Khả năng ức chế enzyme XO của allopurinol cao nhất ở nồng độ 0,75 mM với hiệu suất ức chế là $50,96 \pm 0,96\%$.

Khả năng ức chế enzyme XO của cao ethanol lá sa kê đạt cao nhất là $97,96 \pm 0,49\%$ ở nồng độ cao 0,5 mg/mL. Giá trị ức chế 50% enzyme XO của cao ethanol lá sa kê là $IC_{50} = 0,198$ mg/mL.

4.2 Đề xuất

Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và khả năng loại bỏ gốc tự do từ cao chiết lá sa kê.

Khảo sát khả năng ức chế enzyme XO từ cao chiết lá sa kê ở mức độ *in vivo*.

Nghiên cứu các thành phần hóa học và tách các phân đoạn với các dung môi khác nhau trong cao chiết lá sa kê nhằm khảo sát những hợp chất có hoạt tính sinh học có thể ức chế enzyme XO.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chrysoula Spanou, Aristidis S. Veskoukis, Thalia Kerasioti, Maria ontou, Apostolos Angelis, Nektarios Aligiannis, Alexios-Leandros Skaltsounis, Dimitrios Kouretas. 2012. Flavonoid Glycosides Isolated from Unique Legume Plant Extracts as Novel Inhibitors of Xanthine Oxidase. *PLoS ONE* 7(3): e32214. doi:10.1371/journal.pone.0032214.
2. Cotelle N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Cur Top Med Chem.* 1:569–590.

3. Khalil Ahmed Ansari, M.Akram, H. M. Asif, M.Riazur Rehman, S. M. Ali Shah, Khan Usmanghani, Naveed Akhtar, E. Mohiuddin. 2011. Xanthine oxidase inhibition by some medicinal plants. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*. Volume: 2: Issue-1.
4. Kong, L. D., J. Zhou, Y. L. Wen, J. M. Li & C. H. K. Cheng. 2002. Aesculin possesses potent hypouricemic action in rodents but is devoid of xanthine oxidase/dehydrogenase inhibitory activity. *Planta Med.* 68, 175–178.
5. Kramer, H.M., Curhan, G. 2002. The association between gout and nephrolithiasis: the National Health and Nutrition Examination Survey III 1988–1994. *American Journal of Kidney Disease.* 40, 37–42.
6. Muthuswamy Umamaheswari, Kuppasamy AsokKumar, Arumugam Somasundaram, Thirumalaisamy Sivashanmugam, Varadharajan Subhadradevi, Thenvungal Kochupapy Ravi, 2007. Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 109,547–551.
7. Nakanishi, N., Suzuki, K., Kawashimo, H., Nakamura, K., Tatara, K. 1999. Serum uric acid: correlation with biological, clinical and behavioral factors in Japanese men. *Journal of Epidemiology.* 9, 99–106.
8. Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2007. Công nghệ sinh học Tập 3. Nhà xuất bản Giáo dục.
9. Rasaratnam I and Christophidis N. 1995. Gout: A disease of plenty. *Aust Fam Physician.* 24, 849-851.
10. Siddesha JM, Angaswamy N, Vishwanath BS. 2011. Phytochemical screening and evaluation of in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Artocarpus altilis* leaf. *Nat Prod Res.* Dec; 25(20):1931-40.
11. Trần Đình Toại và Nguyễn Thị Vân Hải, 2005. Động học các quá trình xúc tác sinh học. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.
12. Van Hoorn DE, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Hofman Z, M'Rabet L. 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharm.* 451: 111–118.
13. Ying Wang, Ji Xiao Zhu, Ling Dong Kong, Cheng Yang, Christopher Hon Ki Cheng and Xin Zhang. 2004. Administration of Procyanidins from Grape Seeds Reduces Serum Uric Acid Levels and Decreases Hepatic Xanthine Dehydrogenase/Oxidase Activities in Oxonate-Treated Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 94, 232–237.