

Đánh giá hoạt tính kháng *Burkholderia pseudomallei* VTCC 70157 và độc tính tế bào của dịch sắc cây lựu (*Punica granatum*)

Trần Thị Lệ Quyên^{1,2}, Bùi Nguyễn Hải Linh¹, Nguyễn Việt Hà¹, Nguyễn Hữu Tuấn Dũng¹,
Bùi Thị Việt Hà², Trịnh Thành Trung^{1*}

¹Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Dịch Vọng Hậu, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/9/2021; ngày chuyển phân biên 16/9/2021; ngày nhận phân biên 8/10/2021; ngày chấp nhận đăng 12/10/2021

Tóm tắt:

Melioidosis là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm gây ra bởi vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei*, đặc biệt có yếu tố nguy cơ dịch tễ cao đối với nghề nông do điều kiện làm việc thường xuyên tiếp xúc với môi trường đất hoặc nước chứa vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng *B. pseudomallei* VTCC 70157 (NA23) của dịch chiết cây lựu (*Punica granatum*) ở các nhiệt độ chiết khác nhau và độ bền của hoạt tính này trong điều kiện dịch mô phỏng đường tiêu hóa được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, độ pha loãng ức chế tối thiểu (MID) và diệt khuẩn tối thiểu (MBD). Bên cạnh đó, độc tính của dịch chiết cũng được đánh giá trên các dòng tế bào HEK293, HepG2 và HT29. Kết quả cho thấy, dịch chiết từ các bộ phận khác nhau của cây lựu đều có hoạt tính kháng khuẩn cao với vòng kháng khuẩn đạt 21-28 mm, giá trị MID dưới 1:256 và MBD dưới 1:128. Dịch chiết các bộ phận cây lựu khi được chiết ở 100°C cho hoạt tính kháng khuẩn cao hơn đáng kể so với khi chiết ở 25 và 70°C. Ngoài ra, khi xử lý với dịch mô phỏng đường tiêu hóa, hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cây lựu không có sự khác biệt đáng kể, ngoại trừ giá trị MID của dịch chiết cành giảm 2 lần. Ngoài ra, khi thử nghiệm trên một số dòng tế bào người, các dịch chiết đều có độc tính tế bào thấp với giá trị độ pha loãng ức chế (ID₅₀) luôn cao hơn giá trị MID tương ứng. Các kết quả thu được cho thấy, dịch chiết từ các bộ phận cây lựu thu được bằng cách sắc theo y học cổ truyền có thể sử dụng hiệu quả để điều trị bệnh melioidosis thông qua đường uống.

Từ khóa: *Burkholderia pseudomallei*, dịch chiết nước của cây lựu, độc tính tế bào, hoạt tính kháng khuẩn.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

B. pseudomallei là tác nhân gây bệnh melioidosis - một loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm thường xuất hiện ở các khu vực nhiệt đới như phía Bắc của nước Úc và Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Theo ước tính hàng năm trên thế giới có khoảng 165.000 ca mắc melioidosis, trong đó 54% bệnh nhân tử vong [1]. Không giống như nhiều bệnh truyền nhiễm khác, điều trị bệnh melioidosis cần có phác đồ kháng sinh đặc biệt do vi khuẩn *B. pseudomallei* kháng tự nhiên với nhiều loại kháng sinh đang sử dụng hiện nay như aminoglycosides, cephalosporins (thế hệ 3 và 4), penicillin và rifamycin. Đến nay, việc *B. pseudomallei* kháng kháng sinh ceftazidim dùng để điều trị melioidosis cấp tính cũng đã được ghi nhận [2]. Do đó, bên cạnh chẩn đoán đúng bệnh và sử dụng kháng sinh phù hợp thì việc tìm kiếm chất kháng khuẩn mới cũng được các nhà khoa học hết sức quan tâm.

Tại một số quốc gia, nhiều loại thực vật đã được sử dụng trong các bài thuốc y học cổ truyền để điều trị các bệnh khác nhau. Ngày nay, mặc dù nhiều loại thuốc điều trị đã được tổng hợp nhân tạo, nhưng thực vật vẫn được xem là nguồn dược liệu tự nhiên quan trọng, một nguồn thuốc chữa bệnh vô giá cho con người. Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy sự quan tâm ngày càng tăng đối với thực vật có nhiều đặc tính dược lý đa dạng và quan trọng, trong đó có cả hoạt tính kháng khuẩn [3].

Cây lựu là một trong những loại cây lâu đời nhất được biết đến có nguồn gốc từ Trung Á [4]. Tại Việt Nam, cây lựu được trồng rất phổ biến để làm cảnh, cây thuốc và ăn quả [5]. Trong nhiều nền y học cổ truyền trên thế giới, lựu là bài thuốc phổ biến được áp dụng điều trị các bệnh nhiễm trùng khi có 75 ứng dụng trị bệnh nhiễm trùng khác nhau của cây lựu được tìm thấy [6]. Ở Ấn Độ và Iran, nước sắc vỏ quả lựu được sử dụng để điều trị viêm họng, tiêu chảy, vết thương hở... Trong các tài liệu văn hóa của người Ai Cập, các bệnh phổ biến như viêm, tiêu chảy, nhiễm giun và ho đã được điều trị bằng chiết xuất vỏ quả lựu. Lựu cũng được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền để điều trị bệnh tiêu chảy, rối loạn tiêu hóa ở Nam Phi, Algeria và Mexico.

Tại Việt Nam, nước sắc vỏ quả lựu là bài thuốc chữa lỵ trực tràng cho hiệu quả tốt hơn so với rau sam, lá chè và thuốc berberin. Các bộ phận khác của cây lựu gồm vỏ thân, vỏ cành và vỏ rễ cũng được sử dụng trong các bài thuốc chữa giun sán, tuy nhiên cũng cần cẩn trọng khi sử dụng bởi chúng có độc tính [5].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hoạt tính kháng *B. pseudomallei* VTCC 70157 của dịch chiết các bộ phận cây lựu khi chiết ở các nhiệt độ khác nhau. Ảnh hưởng của dịch mô phỏng đường tiêu hóa đến độ bền hoạt tính kháng khuẩn và độc tính của dịch chiết đối với một số dòng tế bào người cũng đã được nghiên cứu. Ở Việt Nam, đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá khả năng

*Tác giả liên hệ: Email: ttrung@vnu.edu.vn

Evaluation of antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* VTCC 70157 and cytotoxicity of pomegranate (*Punica granatum*) aqueous extract

Thi Le Quyen Tran^{1,2}, Nguyen Hai Linh Bui¹, Viet Ha Nguyen¹, Huu Tuan Dung Nguyen¹, Thi Viet Ha Bui², Thanh Trung Trinh^{1*}

¹Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University - Hanoi, 144 Xuan Thuy Street, Dich Vong Hau Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

²University of Science, Vietnam National University, Hanoi,

334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 13 September 2021; revised 8 October 2021; accepted 12 October 2021

Abstract:

Melioidosis is a severe acute infectious disease caused by *Burkholderia pseudomallei*, especially high epidemiological risk factors in agricultural operations with people frequently exposed to soil or water sources containing this bacterium. In this study, the thermal and gastric stability of antimicrobial activity of aqueous extracts prepared from pomegranate (*Punica granatum*) against *Burkholderia pseudomallei* VTCC 70157 (NA23) was evaluated by agar plate diffusion, minimal inhibitory dilution (MID), and minimal bactericidal dilution (MBD) methods. Additionally, the cytotoxicity of aqueous extract to HEK293, HepG2, and HT29 cell lines was also studied. The results showed that aqueous extracts of different pomegranate parts had a high antibacterial activity with an antibacterial zone diameter in the range of 21–28 mm. MID and MBD values were under 1:256 and 1:128, respectively. At the extraction temperature of 100°C, antibacterial activities were significantly higher than those of 25 and 70°C. This study also demonstrated that the antibacterial activity of the extracts highly remained under simulated gastrointestinal conditions except for the MID value of the twig extracts which was increased by two times. In addition, the extracts exhibited low cytotoxicity with the tested human cell lines, with ID₅₀ values consistently being remarkably higher than the corresponding MID values. The study results suggest that aqueous extracts of pomegranate prepared by decoction according to traditional medicine might be effective through oral administration for the treatment of melioidosis.

Keywords: antibacterial activity, aqueous extract of pomegranate, *Burkholderia pseudomallei*, cytotoxicity.

Classification number: 3.4

kháng lại *B. pseudomallei* của dịch chiết từ các bộ phận cây lựu cũng như tính an toàn của chúng trên tế bào người.

2. Nguyên liệu, phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Sáu bộ phận của cùng một cây lựu 4 năm tuổi (vỏ rễ, vỏ thân, cành, lá, hoa và vỏ quả) được thu hái vào tháng 6/2020 tại vườn nhà dân ở xã Bảo Thanh, huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ. Mẫu sau khi thu hái được vận chuyển trong ngày về phòng thí nghiệm Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Mẫu được làm khô ở nhiệt độ phòng trong không gian kín và sử dụng máy hút ẩm tới khối lượng không đổi. Mẫu khô được bảo quản tại nhiệt độ phòng.

Chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 (NA23) phân lập từ bệnh phẩm máu của bệnh nhân nhiễm trùng melioidosis và thuộc kiểu hình di truyền ST 46 phổ biến tại Việt Nam được lưu giữ tại Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia, Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học (Đại học Quốc gia Hà Nội). Chủng vi khuẩn được hoạt hóa từ điều kiện lạnh sâu trên môi trường thạch Mueller Hinton (Becton, Dickin and Company, Mỹ) ở 37°C trong 24 giờ. Hòa tan các khuẩn lạc tách rời vào dung dịch NaCl 0,9% vô trùng để được huyền dịch có độ đục tương đương McFarland 0,5.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dịch chiết từ các bộ phận của cây lựu: Mẫu cây khô được xay thành bột mịn bằng máy xay. Một lượng nước cất tương đương với lượng nước đã bay hơi do quá trình sấy khô được bổ sung vào bột mịn tạo thành một hỗn hợp dạng bột nhão. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung thêm một lượng nước cất (pha loãng 2 lần) trước khi chiết ở các nhiệt độ 25, 70 và 100°C trong 1 giờ (bảng 1). Sau khi chiết, toàn bộ hỗn hợp được lọc qua túi vải hai lớp. Sau khi lọc, dịch chiết tiếp tục được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút và lọc qua màng lọc khuẩn 0,22 μm (Sartorius, Đức) để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu được lặp lại 3 lần.

Bảng 1. Công thức chiết mẫu cây lựu.

Bộ phận	Khối lượng khô (g)	Thể tích nước bổ sung (ml)
Vỏ quả	5,2±0,08	14,8±0,08
Hoa	4,9±0,05	15,1±0,05
Lá	3,1±0,08	16,9±0,08
Cành	4,2±0,09	15,8±0,09
Vỏ thân	4,5±0,09	15,5±0,09
Vỏ rễ	4,3±0,21	15,7±0,21

Xác định hoạt tính kháng *B. pseudomallei* của dịch chiết lựu:

- Phương pháp khuếch tán đĩa thạch: Dùng tấm bông vô trùng thấm huyền dịch và ria đều vi khuẩn trên mặt đĩa thạch Mueller Hinton. Tạo giếng trên đĩa thạch bằng ống nhựa vô trùng, đường kính 6 mm và nhỏ 70 μl dịch chiết cây lựu vào mỗi giếng, ủ đĩa ở 37°C trong 24 giờ, đo đường kính vòng kháng khuẩn theo công thức: D (mm) = d - 6 (với d là đường kính vòng kháng khuẩn, 6 là

đường kính của giếng). Kháng sinh meropenem (Sigma Aldrich, Mỹ) và nước cất được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm trong tất cả các thí nghiệm [2].

- Phương pháp xác định giá trị MID: Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết được xác định bằng phương pháp vi pha loãng theo hướng dẫn của Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) [7]. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng. Trước tiên, 50 µl dịch chiết được cho vào cột giếng đầu tiên của đĩa, trong khi các giếng còn lại được bổ sung 25 µl nước cất. Một dãy pha loãng liên tục hệ số 2 của dịch chiết được thực hiện từ các giếng tiếp theo. Sau đó, một lượng tương đương (25 µl) môi trường Mueller Hinton được bổ sung vào mỗi giếng. Để chuẩn bị chủng vi khuẩn ủ cùng dịch chiết, huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương đương McFarland 0,5 được pha loãng 10 lần bằng dịch môi trường Mueller Hinton. Sau đó, một thể tích tương đương (50 µl) huyền dịch vi khuẩn đã pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng, trừ giếng đối chứng âm. Đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ, giá trị MID của dịch chiết được xác định là độ pha loãng thấp nhất mà tại đó ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn kiểm tra.

- Phương pháp xác định giá trị MBD: Hút 20 µl dịch từ các giếng mà tại đó không có sự sinh trưởng của vi khuẩn và cấy trải trên đĩa thạch Mueller Hinton ở 37°C trong 24-48 giờ. Giá trị pha loãng của dịch chiết mà tại đó sự sinh trưởng của vi khuẩn không được quan sát thấy được gọi là MBD [3].

Xác định ảnh hưởng của dịch mô phỏng đường tiêu hóa đến hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết: Độ bền của hoạt tính kháng vi khuẩn *B. pseudomallei* được đánh giá trong điều kiện dịch mô phỏng đường tiêu hóa theo mô tả của The United States Pharmacopeial (2018) [8] và thực hiện ở 37°C, lắc 1.000 vòng/phút. Theo đó, dịch chiết cây lựu được xử lý 2 giờ với hỗn hợp gồm NaCl 35 mM và pepsin 3,2 mg/ml (Sigma Aldrich, Mỹ) được chỉnh về pH 2,0 bằng HCl 0,1 N. Dịch chiết sau đó tiếp tục được xử lý trong 4 giờ với dịch ruột mô phỏng có thành phần gồm KH₂PO₄ 50 mM và pancreatin 10 mg/ml (Sigma Aldrich, Mỹ) với pH 7,0 được chỉnh bằng NaOH 1 N. Trước khi đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, dịch chiết đã xử lý với dịch mô phỏng đường tiêu hóa được ủ ở 99°C trong 10 phút để bất hoạt các enzym tiêu hóa. Độ bền của hoạt tính kháng vi khuẩn *B. pseudomallei* được đánh giá bằng cách xác định cả giá trị MID và MBD theo mô tả ở trên.

Đánh giá tính gây độc tế bào của dịch chiết: Độc tính của dịch chiết được đánh giá trên 3 dòng tế bào người (ung thư biểu mô ruột kết HT29, ung thư gan HepG2 và phôi thận HEK293), sử dụng phương pháp MTT theo mô tả của T. Mosmann (1983) [9]. Các dòng tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5% với độ ẩm 95-100%. Môi trường Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, PAN Biotech, Đức) nồng độ glucose 4,5 g/l được sử dụng cho nuôi cấy dòng tế bào HEK293 và môi trường DMEM nồng độ glucose 1 g/l được sử dụng cho dòng tế bào HT29 và HepG2. Môi trường nuôi cấy được bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS) và 1% penicillin - streptomycin (10.000 U/ml - 10.000 µg/ml, Gibco,

Mỹ). 175 µl huyền dịch tế bào được đưa vào đĩa 96 giếng đáy phẳng ở mật độ khoảng 2x10⁴ tế bào/giếng. Sau khi ủ 24 giờ để tạo tế bào đơn lớp với mật độ đạt 80%, 25 µl dịch chiết được bổ sung vào mỗi giếng và tiếp tục ủ đĩa thêm 24 giờ. Hút bỏ môi trường, sau đó bổ sung vào mỗi giếng 50 µl dung dịch 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT, Biobasic, Canada) 2 mg/ml và 50 µl môi trường DMEM. Sau khi ủ đĩa trong 3 giờ, hút bỏ dịch nổi và bổ sung 100 µl DMSO vào mỗi giếng. Đĩa được lắc đều và ủ trong tối 15 phút ở nhiệt độ phòng để hòa tan tinh thể formazan. Mật độ quang học của mỗi giếng được đọc ở bước sóng 490 nm (sử dụng máy đọc đĩa 800 TS BioTek, Mỹ). Môi trường nuôi cấy thích hợp và DMSO (Sigma, Mỹ) được sử dụng là đối chứng âm và đối chứng dương. Tác dụng gây độc tế bào được xác định bằng ID₅₀ mà tại đó số lượng tế bào sống giảm bằng 50% so với đối chứng âm.

3. Kết quả

3.1. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cây lựu được chiết ở các nhiệt độ khác nhau

Cả 6 mẫu dịch chiết từ các bộ phận khác nhau của cây lựu đều cho thấy hoạt tính kháng vi khuẩn *B. pseudomallei* VTCC 70157 (bảng 2). Đáng chú ý là cả 6 mẫu đều thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn tốt hơn nhiều lần khi chiết ở 100°C so với 25 và 70°C. Ở 100°C, dịch chiết cành và lá cho vòng kháng khuẩn nhỏ nhất (21 mm), trong khi đó dịch chiết vỏ thân có vòng kháng khuẩn lớn nhất (28 mm), cao hơn đối chứng dương là kháng sinh meropenem (17 mm).

Bảng 2. Hoạt tính kháng *B. pseudomallei* của dịch chiết 6 bộ phận cây lựu ở các nhiệt độ chiết khác nhau.

Bộ phận	Tác dụng điều trị	Nhiệt độ chiết (°C)	D (mm)	MID	MBD
Vỏ quả	Kiết li, tiêu chảy, viêm đường tiết niệu [5, 7]	25	5±0,5	1:128	1:16
		70	19±0,8	1:512	1:64
		100	27±0,5	1:1024	1:256
Hoa	-	25	6±0,8	1:128	1:32
		70	20±0,5	1:512	1:64
		100	26±0,8	1:1024	1:256
Lá	Kiết li, tiêu chảy [5]	25	3±0,5	1:128	1:8
		70	12±0,5	1:128	1:8
		100	21±0,5	1:256	1:128
Cành	Kiết li, tiêu chảy [5]	25	0	1:8	-
		70	16±0,8	1:64	-
		100°C	21±0,5	1:512	1:128
Vỏ thân	Giun sán, đau răng [7]	25°C	7±0,5	1:256	1:64
		70°C	21±0,8	1:256	1:64
		100°C	28±1,2	1:1024	1:256
Vỏ rễ	Giun sán, đau răng [7]	25°C	6±0,8	1:128	1:8
		70°C	20±0,5	1:128	1:16
		100°C	24±0,5	1:512	1:128
Meropenem (30 µg/ml)			17±0,5	1:32	1:32
Doxycycline (30 µg/ml)				1:16	>1:4
Augmentin (60/30 µg/ml)				1:16	1:8

-: dịch chiết không thể hiện tính diệt khuẩn.

Giá trị MID của 6 loại dịch chiết nằm trong khoảng 1:256 đến 1:1024, cụ thể MID của dịch chiết lá là 1:256; dịch chiết cành và vỏ rễ là 1:512; dịch chiết vỏ quả, hoa và vỏ thân là 1:1024. Giá trị MBD đối với vi khuẩn *B. pseudomallei* lớn hơn gấp 4 lần so với giá trị MID ở dịch chiết vỏ quả, hoa, cành, vỏ thân và vỏ rễ; lớn hơn gấp 2 lần ở dịch chiết lá.

3.2. Tính bền của hoạt tính kháng *B. pseudomallei* ở điều kiện dịch mô phỏng đường tiêu hóa

Khi tiếp xúc với dịch mô phỏng đường tiêu hóa chứa các enzym thủy phân pepsin trong pH thấp và pancreatin, hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết vỏ quả, cành và vỏ rễ không đổi với đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 27, 21 và 24 mm. Trong khi đó, dịch chiết hoa có đường kính vòng kháng khuẩn giảm từ 26 xuống 24 mm, dịch chiết lá giảm từ 21 xuống 20 mm và dịch chiết vỏ thân giảm từ 28 xuống 26 mm. Tuy nhiên, giá trị MID không thay đổi ở hầu hết các dịch chiết ngoại trừ dịch chiết cành tăng từ 1:512 lên 1:256. Giá trị MBD của dịch chiết vỏ quả, vỏ thân và vỏ rễ đã xử lý qua dịch mô phỏng đường tiêu hóa vẫn được giữ nguyên không đổi so với dịch chiết tương ứng chưa xử lý, nhưng giá trị này tăng gấp 2 lần ở dịch chiết hoa, lá và cành (bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính kháng *B. pseudomallei* của dịch chiết lựu khi xử lý với dịch tiêu hóa mô phỏng.

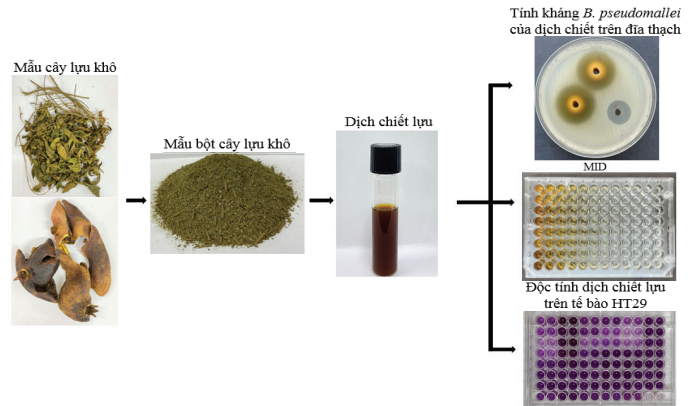
Hoạt tính kháng khuẩn	Dịch chiết các bộ phận của cây lựu					
	Vỏ quả	Hoa	Lá	Cành	Vỏ thân	Vỏ rễ
D (mm)	27±0,5	24±0,8	20±0,5	21±0,5	26±1,0	24±0,5
MID	1:1024	1:1024	1:256	1:256	1:1024	1:512
MBD	1:256	1:128	1:64	1:64	1:256	1:128

3.3. Độc tính tế bào

Tất cả các dịch chiết cây lựu cho thấy độc tính thấp trên các dòng tế bào thử nghiệm với giá trị ID₅₀ ở trên giá trị MID tương ứng. Trong 3 loại tế bào thử nghiệm, dòng tế bào HEK293 chịu được độc tính của cả loại 6 dịch chiết gấp 1,5-4,2 lần so với hai dòng tế bào HT29 và HepG2 (bảng 4, hình 1).

Bảng 4. Độc tính tế bào của dịch chiết lựu.

Loại dịch thử nghiệm	Độc tính tế bào (ID ₅₀)		
	HT29	HepG2	HEK293
Vỏ quả	1:154	1:110	1:64
Hoa	1:140	1:110	1:64
Lá	1:94	1:61	1:36
Cành	1:96	1:64	1:32
Vỏ thân	1:150	1:120	1:36
Vỏ rễ	1:96	1:70	1:48
Meropenem (30 µg/ml)	>1:8	>1:8	>1:8
Doxycycline (30 µg/ml)	>1:8	>1:8	>1:8
Augmentin (60/30 µg/ml)	>1:8	>1:8	>1:8
DMSO (%)	2,6	2,6	3,5



Hình 1. Mẫu cây lựu, hoạt tính kháng vi khuẩn *B. pseudomallei* và độc tính trên dòng tế bào HT29 của dịch chiết lựu.

4. Bàn luận

Giống như vi sinh vật, thực vật là một nguồn tài nguyên đa dạng về mặt sinh học với ước tính có khoảng 250.000 đến 500.000 loài thực vật trên Trái đất [10]. Trong lịch sử nhân loại, nhiều loài thực vật đã được sử dụng rộng rãi trong các bài thuốc y học cổ truyền để điều trị các bệnh khác nhau. Cho đến nay, thực vật vẫn là nguồn dược liệu quan trọng, đặc biệt ở những nước đang phát triển, nơi mà nền y học cổ truyền vẫn được sử dụng rộng rãi và hiệu quả [3]. Tuy nhiên, chỉ một phần nhỏ trong số chúng đã được điều tra về hoạt tính kháng khuẩn [11]. Để đánh giá hoạt tính sinh học của cây thuốc, các nhà khoa học thường sử dụng các dung môi hữu cơ phân cực để tách chiết các hợp chất mong muốn. Dịch chiết sau đó được tinh sạch qua các phân đoạn và loại bỏ dung môi trước khi tiến hành các nghiên cứu về tính kháng khuẩn hoặc phân tích cấu trúc hóa học. Tuy nhiên, trong y học cổ truyền, nhiều loại cây thuốc được điều chế bằng phương pháp sắc với nước và uống trực tiếp. Do vậy, việc đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết lựu trong nghiên cứu này đã được cân nhắc về ảnh hưởng của nhiệt độ trong quá trình sắc thuốc theo y học cổ truyền. Đồng thời, do cách sử dụng thuốc bằng đường uống nên ảnh hưởng của điều kiện đường tiêu hóa đến hiệu quả kháng khuẩn của dịch chiết cũng được đánh giá. Giá trị MID và MBD đã tăng ít nhất tương ứng 2 lần (mẫu lá) và 4 lần (vỏ thân); tăng nhiều nhất tương ứng 64 (mẫu cành) và 128 lần (mẫu cành) khi chiết ở nhiệt độ 100°C so với 25°C. Kết quả thu được chỉ ra rằng, phương pháp chiết chất kháng khuẩn ở nhiệt độ 100°C cho hiệu quả tốt nhất và phù hợp với phương pháp sắc thuốc truyền thống.

Dịch chiết thô từ các bộ phận của cây lựu là hỗn hợp nhiều chất và không được cô đặc thành cao để tính toán khối lượng khô của dịch chiết. Do vậy, chúng tôi sử dụng giá trị MID thay vì MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) mặc dù cả hai giá trị này được tính toán dựa trên phương pháp vi pha loãng. Việc sử dụng giá trị MID giúp chúng tôi thực hiện thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn phù hợp với cách sử dụng dịch sắc thuốc theo y học cổ truyền. Bởi mục đích của nghiên cứu này là tìm kiếm cây thuốc phổ biến ở trong vườn mà người dân có thể sử dụng trực tiếp chỉ bằng cách đun sôi

và uống cho phòng và điều trị bệnh nhiễm trùng melioidosis ở giai đoạn duy trì.

Các nghiên cứu đã công bố cho thấy, nhiều dịch chiết từ thực vật vẫn duy trì gần như nguyên vẹn hoạt tính kháng khuẩn khi xử lý với nhiệt độ cao lên đến 121°C. Ngược lại, cũng có mẫu bị mất hoạt tính khi xử lý ở nhiệt độ 60°C [12]. Trong nghiên cứu này, hoạt tính ức chế và kháng khuẩn của dịch chiết ở nhiệt độ 100°C cao hơn đáng kể so với khi chiết ở nhiệt độ 25 và 70°C. Kết quả này chứng minh hoạt tính kháng khuẩn trong dịch chiết lựu là bền nhiệt và sắc thuốc là một phương pháp hiệu quả mà y học cổ truyền đã sử dụng cho việc điều chế thuốc điều trị các bệnh nhiễm trùng.

Cây lựu được chứng minh chứa nhiều hoạt chất sinh học, trong đó có các chất trao đổi bậc hai có đặc tính kháng khuẩn cao thuộc các nhóm như phenol, polyphenol, flavonoid, coumarin, tannins và quercetin [6]. Do việc sử dụng thuốc qua đường uống, nên sự có mặt của các enzym tiêu hóa và môi trường pH thấp có thể làm thay đổi cấu trúc hoặc phân hủy các hoạt chất này dẫn đến việc làm giảm hoặc mất hoạt tính kháng khuẩn. Trong số 6 mẫu dịch chiết cây lựu, giá trị MID không thay đổi ngoại trừ mẫu dịch chiết cành tăng 2 lần sau khi xử lý với enzym tiêu hóa ở điều kiện pH thấp. Bên cạnh đó, giá trị MBD không đổi ở các mẫu vỏ quả, vỏ thân và vỏ rễ trong khi các mẫu còn lại tăng 2 lần sau khi xử lý. Như vậy, có thể thấy hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cây lựu bền với điều kiện của dịch tiêu hóa và phù hợp cho việc sử dụng bằng đường uống.

Vỏ quả và lá lựu là 2 bộ phận được coi là ít độc và có hoạt tính chống nhiễm trùng thường được sử dụng trong y học cổ truyền. Nhiều nghiên cứu sử dụng các dịch sắc các bộ phận này cho điều trị các chứng nhiễm trùng đường tiêu hóa, viêm đường tiết niệu và các vết thương ngoài da [5, 6]. Trong y học cổ truyền Việt Nam, các bộ phận vỏ thân và vỏ rễ cây lựu được ghi nhận là có độc và thường dùng chữa bệnh nhiễm ký sinh trùng [5]. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã chứng minh dịch chiết tất cả các bộ phận cây lựu không gây độc với các tế bào thử nghiệm ở các MBD tương ứng. Ngoài ra, so với các kháng sinh đang được dùng cho điều trị melioidosis như augmentin, doxycycline hay meropenem thì hoạt tính kháng *B. pseudomallei* của nước sắc cây lựu có hiệu quả tốt hơn rõ rệt. Do vậy qua nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy, nguồn dược liệu từ cây lựu có tiềm năng trong phòng và điều trị melioidosis ở giai đoạn duy trì. Tuy nhiên, để có minh chứng cụ thể, các nghiên cứu sâu hơn về tính kháng khuẩn và tác dụng dược lý của dịch sắc lựu cần được tiến hành *in vivo*.

5. Kết luận

Dịch chiết từ các bộ phận của cây lựu có hoạt tính kháng *B. pseudomallei* và độc tính thấp trên một số dòng tế bào người. Dịch chiết lựu bền với nhiệt độ và điều kiện đường tiêu hóa, do vậy việc điều chế thuốc bằng phương pháp sắc và sử dụng qua đường uống là phù hợp. Phát hiện của chúng tôi cung cấp thêm bằng chứng chứng minh tiềm năng sử dụng nước sắc cây lựu cho điều trị bệnh

melioidosis. Trong định hướng nghiên cứu tiếp theo, việc đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và độc tính tế bào cần được thử nghiệm *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu hoạt tính kháng *B. pseudomallei* từ một số loại trà, thảo dược và thực phẩm ở Việt Nam”, mã số QG.19.48 do Đại học Quốc gia Hà Nội tài trợ. Trần Thị Lệ Quyên được tài trợ bởi Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) và hỗ trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của VINIF, Viện Nghiên cứu dữ liệu lớn (mã số 2020.TS.33). Các tác giả trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Limmathurotsakul, N. Golding, D.A.B. Dance, et al. (2016), “Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis”, *Nature Microbiology*, **1(1)**, DOI: 10.1038/nmicrobiol.20158.
- [2] P. Panomket, S. Wanram, T. Srivorasmas, et al. (2012), “Bioactivity of plant extracts against *Burkholderia pseudomallei*”, *Asian Biomedicine*, **6(4)**, pp.619-623, DOI: 10.5372/1905-7415.0604.100.
- [3] T.T. Vu, H. Kim, V.K. Tran, et al. (2015), “*In vitro* antibacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Vietnam against human pathogenic bacteria”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16(32)**, DOI: 10.1186/s12906-016-1007-2.
- [4] M. Erkan, A. Dogan (2018), “Pomegranate/Roma - *Punica granatum*”, *Exotic Fruits*, **1**, DOI: 10.1016/B978-0-12-803138-4.00049-6.
- [5] D.T. Loi (2004), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Medical Publishing House one member Company Limited, 1494pp (in Vietnamese)
- [6] C. Joshi, P. Patel, V. Kothari (2019), “Anti-infective potential of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peel against gram-negative bacterial pathogens”, *F1000Research*, **8(70)**, DOI: 10.12688/f1000research.17430.1.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute (2015), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 10th Edition, 279pp.
- [8] The United States Pharmacopeial (2018), *U.S. Pharmacopeia National Formulary 2018: USP 41 NF 36*, United Book Press, 2413pp.
- [9] T. Mosmann (1983), “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of Immunological Methods*, **65(1-2)**, pp.55-63, DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [10] R.P. Borris (1996), “Natural products research: Perspectives from a major pharmaceutical company”, *Journal of Ethnopharmacology*, **51(1-3)**, pp.29-38, DOI: 10.1016/0378-8741(95)01347-4.
- [11] S. Mickyaray (2019), “Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens”, *Antibiotics*, **8(4)**, DOI: 10.3390/antibiotics8040257.
- [12] M.M. Ginovyan (2017), “Effect of heat treatment on antimicrobial activity of crude extracts of some Armenian herbs”, *Proceedings of The Yerevan State University*, **51(2)**, pp.113-117, DOI: 10.46991/PYSU:B/2017.51.2.113.