**Phương pháp đánh giá khả năng chữa lành vết thương, kháng khuẩn và chống oxy hóa của *Pongamia pinnata* ở chuột Wistar**

**2.5. Hoạt tính kháng khuẩn**

 Hoạt tính kháng khuẩn được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm ở 37°C trong môi trường Mueller Hinton Broth (MHB, Difco) và nấm ở 28°C trong 72 giờ trong môi trường Potato Dextrose Broth (PDB, Difco) và được sử dụng làm dịch cấy. Huyền phù 100 μl dịch cấy chứa 10^8 CFU/ml vi khuẩn và 10^4 bào tử/ml nấm được trải đều trên môi trường Mueller Hinton Agar (MHA) và Potato Dextrose Agar (PDA) tương ứng. Các đĩa giấy (đường kính 6 mm) được tẩm 10 μl dịch chiết methanol của P. pinnata nồng độ 100 mg/ml (1 mg/đĩa) và DMSO được đặt trên môi trường thạch đã cấy. Streptomycin (10 μg/đĩa) và tetracycline (10 μg/đĩa) được sử dụng làm đối chứng dương cho vi khuẩn, và fluconazole (10 μg/đĩa), ketoconazole (10 μg/đĩa) cho nấm. Giá trị MIC cũng được nghiên cứu cho các vi sinh vật nhạy cảm với dịch chiết lá trong thử nghiệm khuếch tán trên đĩa. Các đĩa giấy lọc vô trùng (đường kính 6 mm) chứa 2,5-1000 μg/đĩa của tất cả các thành phần được đặt trên bề mặt môi trường. MIC được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của dịch chiết ức chế sự phát triển nhìn thấy được trên thạch.

**2.6. Hoạt tính chữa lành vết thương**

 Mô hình vết thương cắt bỏ và rạch được sử dụng để đánh giá hoạt tính chữa lành vết thương của P. pinnata. Động vật được chia thành ba nhóm, mỗi nhóm sáu con (n = 6) như sau:

* **Nhóm I:** Nhóm đối chứng được điều trị bằng dimethyl sulfoxide (DMSO).
* **Nhóm II:** Nhóm chuẩn được điều trị bằng Vitamin E (100 mg/kg trọng lượng cơ thể) sau khi được hòa tan trong tá dược (huyền phù 0,5% natri carboxymethyl cellulose trong nước cất).
* **Nhóm III:** Nhóm thử nghiệm được điều trị bằng dịch chiết lá P. pinnata (100 mg/kg trọng lượng cơ thể) trong tá dược.

Thuốc thử nghiệm được cho uống một lần mỗi ngày với thể tích tương đương 10 ml/kg trọng lượng cơ thể động vật trong 19 ngày.

**2.6.1. Mô hình vết thương rạch**

 Tất cả chuột đều được gây mê bằng ether, sau đó một vết rạch dọc dài 4 cm được thực hiện xuyên qua da và cơ da ở khoảng cách khoảng 1,5 cm từ đường giữa ở bên phải lưng đã cạo lông. Sau đó, vết thương được khâu kín bằng các mũi khâu rời cách đều nhau 0,5 cm bằng chỉ phẫu thuật vô trùng (số 000) và kim cong (số 11). Các mũi khâu được cắt bỏ vào ngày thứ 7. Độ bền đứt của vết thương (WBS) được đo vào ngày thứ 10 sau khi gây thương.

**Độ bền đứt của vết thương:** Tóm tắt, những con chuột bị thương đã được gây mê được cố định trên bàn mổ, sau đó một đường kẻ được vẽ cách mép vết thương 3 mm ở mỗi bên. Đường kẻ được kẹp bằng kẹp phẫu thuật sao cho hai đầu đối diện nhau. Một bên của kẹp được nối với một hộp polypropylene chia vạch nhẹ được treo tự do thông qua một sợi dây chạy qua ròng rọc. Việc tăng dần mực nước làm tăng trọng lượng và kéo mép vết thương ra khỏi đầu cố định, khi vết thương vừa mở ra, trọng lượng nước được ghi lại. Giá trị trung bình của ba lần đọc khác nhau được ghi lại cho vết thương rạch được coi là giá trị độ bền đứt riêng lẻ. Độ bền kéo cũng được tính toán bằng công thức sau:

Độ bền kéo (g/mm2)= Độ bền đứt (g)​/ Diện tích mặt cắt ngang của da (mm2)

**2.6.2. Mô hình vết thương cắt bỏ**

 Đối với nghiên cứu vết thương cắt bỏ, chuột được gây mê bằng ether và cạo lông ở vùng lưng ngực. Một miếng da toàn bộ bề dày hình tròn (500 mm²) được cắt bỏ từ một vùng xác định trên lưng chuột. Diện tích vết thương được đo ngay lập tức bằng cách đặt một tờ giấy trong suốt lên vết thương và vẽ lại, diện tích của hình vẽ này được tính bằng giấy kẻ ô ly. Quy trình tương tự được lặp lại vào mỗi ngày thứ 4 để tính phần trăm co rút vết thương. Diện tích vết thương tại thời điểm gây thương được coi là 100%. Số ngày cần thiết để vảy bong ra hoàn toàn mà không còn vết thương hở được ghi lại để ước tính thời gian biểu mô hóa.

**2.7. Ước tính sự cảm ứng của các cytokine tiền viêm (IL-6, TNF-α) và kháng viêm (IL-10)**

 Mẫu máu được thu thập từ tất cả các con vật của mỗi nhóm ở các khoảng thời gian khác nhau, tức là 24 giờ và ngày thứ 8 sau khi gây thương. Các cytokine tiền viêm (IL-6 và TNF-α) và cytokine kháng viêm (IL-10) được ước tính bằng cách thực hiện xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA) sử dụng bộ kit ELISA IL-6, TNF-α và IL-10 (Invitrogen). Các xét nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ cytokine được xác định bằng pg/ml bằng cách vẽ đồ thị đường chuẩn. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện ba lần để đảm bảo tính chính xác của các quan sát.

**2.8. Ước tính hydroxyproline và hexosamine**

 Vào ngày thứ 4, 8 và 16 sau phẫu thuật cắt bỏ, một mảnh da từ vùng vết thương đã lành được thu thập và phân tích hàm lượng hydroxyproline, là thành phần cơ bản của collagen. Các mô được sấy khô trong tủ sấy ở 60-70°C đến trọng lượng không đổi và được thủy phân trong HCl 6N ở 130°C trong 4 giờ trong ống kín. Dịch thủy phân được trung hòa đến pH 7,0 và được oxy hóa bằng Chloramine T trong 20 phút, phản ứng được dừng lại bằng cách thêm axit perchloric 0,4M và màu được tạo ra với sự trợ giúp của thuốc thử Ehrlich ở 60°C (Woessner, 1961) và đo ở bước sóng 557 nm bằng máy quang phổ UV/Vis (Shimadzu). Để ước tính hexosamine, các mô hạt đã cân được thủy phân trong HCl 6N trong 8 giờ ở 98°C, trung hòa đến pH 7 bằng NaOH 4N và pha loãng bằng nước Milli-Q. Hàm lượng hexosamine của các mô hạt được ước tính với các sửa đổi nhỏ. Dung dịch đã pha loãng được trộn với dung dịch acetyl acetone và đun nóng đến 96°C trong 40 phút. Hỗn hợp được làm nguội và ethanol 96% được thêm vào, tiếp theo là dung dịch r-dimethylamino-benzaldehyde (thuốc thử Ehrlich). Dung dịch được trộn kỹ, để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 530 nm bằng máy quang phổ UV/Vis hai chùm tia (Shimadzu). Lượng hexosamine được xác định bằng cách so sánh với đường chuẩn. Hàm lượng hexosamine được biểu thị bằng mg/g trọng lượng mô khô.

**2.9. Ước tính hoạt tính chống oxy hóa *in vivo***

 Để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, chuột được chia thành hai nhóm: nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm. Nhóm thí nghiệm nhận 1,25 ml dịch chiết lá (100 mg/kg trọng lượng cơ thể), trong khi nhóm đối chứng nhận DMSO. Dịch đồng nhất mô (10%) được chuẩn bị bằng KCl 0,15M và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi không tế bào được sử dụng cho xét nghiệm enzyme chống oxy hóa. Mức độ peroxy hóa lipid (LPO) được xác định bằng cách phân tích nồng độ các chất phản ứng với axit thiobarbituric (TBARS). Trạng thái chống oxy hóa nội sinh được đánh giá bằng cách ước tính nồng độ glutathione khử (GSH) và hoạt tính của superoxide dismutase (SOD) bằng kỹ thuật tiêu chuẩn. Catalase (CAT) được xác định bằng phương pháp của.

**2.10. Phân tích thống kê**

 Các phép tính và thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Kết quả được phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai một chiều (ANOVA) với phép kiểm định post hoc Scheffe. Mức ý nghĩa thống kê được xác định là P < 0,05. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn của trung bình (S.E.M.).

Người viết bài: Ths. Trịnh Thị Loan

Người duyệt bài: Ths. Nguyễn Thị Thùy Trang

Nguồn báo:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2225411015001182?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=9322aa0cdf11095c>