

ĐƯỢC ĐỘNG HỌC THEO CON ĐƯỜNG TIÊM MÀNG BỤNG VÀ CON ĐƯỜNG CHO ĂN CỦA CATECHIN (EPIGALLOCATECHIN GALLATE) Ở CÁ YELLOWTAIL (*Seriola quinqueradiata*)
*PHARMACOKINETICS FOLLOWING INTRA-PERITONEAL AND ORAL ADMINISTRATION OF CATECHIN (EPIGALLOCATECHIN GALLATE) IN YELLOWTAIL (*Seriola quinqueradiata*)*

Trang Dang*, Masato Honda, Makoto Shiraiishi, Xuchun Qiu, Takuro Hotta, Yukihiko Mastuyama, Yohei Shimashaki and Yuji Oshima
Faculty of Aquaculture, University of Nha Trang, Email: trangdangntu@gmail.com

ABSTRACT

The reactive oxygen species (ROS) have been generated by *Chattonella* spp., may be one of the causative factors responsible for the toxic effects to living organisms, especially to yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). On the other hand, (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG), known as one of the most powerful green tea polyphenol antioxidants *in vitro* and *in vivo*, was thought to be an effective solution for protection of the damage by *Chattonella* spp. in fish. Therefore, the present study aimed to obtain pharmacokinetics of EGCG by oral gavage and intra-peritoneal (IP) in yellowtail. Blood and tissue samples were collected and analyzed by HPLC assay. Pharmacokinetic parameters of EGCG in fish plasma were obtained by fitting with 1-compartment IP administration model. The result showed that EGCG was present in all plasma samples collected at 2-h post-dose ($2.22 \pm 1.46 \mu\text{g/mL}$), then decreased quickly in groups of 4-h and 8-h administration ($4.37 \pm 3.98 \mu\text{g/mL}$ and $0.99 \pm 0.66 \mu\text{g/mL}$, respectively) and not detected in late-collected groups in IP administration; whereas, there were only one plasma specimen detected EGCG ($0.623 \mu\text{g/mL}$, at 2-h post-treatment) in oral gavage and no detection of EGCG in all muscle and liver samples. In pharmacokinetic parameters, there were a high elimination rate constant (0.24) and a short half-life (2.89 h). It suggested that EGCG was poorly absorbed and/or quickly eliminated in yellowtail. Our results provide a basis for understanding about pharmacokinetics of EGCG in fish.

KEYWORDS: Pharmacokinetics; (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG); yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thiệt hại do thủy triều đỏ gây ra đối với các loài cá biển nuôi thương phẩm ở Nhật Bản là rất lớn, đặc biệt là cá yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) (Fukuyo et al., 2002). Cũng theo báo cáo của Fukuyo et al. (2002), tảo *Chattonella* spp. là loài tảo gây hiện tượng thủy triều đỏ, thường xuyên xuất hiện và gây thiệt hại nghiêm trọng ở vùng biển phía Tây của Nhật Bản. Mặc dù, vẫn còn nhiều tranh cãi về cơ chế gây độc dựa trên những ảnh hưởng của độc tố ichthyotoxic, nhưng việc chết ngạt do hoạt động bất thường của các tế bào mang được cho là nguyên nhân trực tiếp gây chết cá (Endo et al., 1985, 1988). Ngoài ra, *Chattonella* spp. được phát hiện là có giải phóng các nhóm phân tử "gốc tự do oxi hóa" (Reactive oxygen species, ROS) như: H_2O_2 , O_2^- , $\cdot\text{OH}$ trong điều kiện bình thường và trong điều kiện nuôi cấy (Shimada et al., 1993; Tanaka et al., 1992, 1994; Oda et al., 1992, 1994, 1997; Kim et al., 2007). Từ khi ROS được biết là có những ảnh hưởng có hại tiềm năng lên hệ thống sinh học như phá hủy các phân tử protein, lipid và nucleic acid (Slater, 1984; Fridovich, 1986; Oda et al., 1989; Miller et al., 1990); các ROS được giải phóng bởi *Chattonella* spp. có lẽ là những tác nhân gây ảnh hưởng độc đến các sinh vật sống trong thủy vực đó (Yang et al., 1995; Hiroishi et al., 2005; Kim and Oda, 2010). Do đó, việc sử dụng chất chống oxi hóa được cho là giải pháp hiệu quả cho việc giảm tác hại do loài tảo độc này gây ra ở cá.

Epigallocatechin gallate (EGCG) được biết đến như là một catechin phong phú nhất có trong trà xanh (*Camellia sinensis*) so với các epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC) và epicatechin gallate (ECG) (Graham, 1992) và cũng là một trong số các chất chống oxi hóa

polyphenol mạnh trong điều kiện phòng thí nghiệm và thực nghiệm. Ngoài ra, Rice-Evans et al. (1996) đã công bố cơ chế phản ứng của EGCG như một chất scavenger, bao gồm việc cho đi 1 nguyên tử hydro và/hoặc 1 electron để cố định các phân tử gốc tự do này.

Như vậy, EGCG được biết đến như là chất chống oxy hóa mạnh. Thế nhưng, vẫn chưa có nghiên cứu nào về sự hấp thu, phân bố và đào thải của chất này ở cá. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm đánh giá các chỉ tiêu dược động học của EGCG ở cá. Kết quả thu nhận được làm tiền đề cho việc đánh giá việc hấp thu EGCG ở cá.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Bố trí thí nghiệm và thu mẫu

Cá yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), khối lượng cơ thể trung bình 100 gram được tiêm qua màng bụng và được cho ăn với nồng độ EGCG 10 mg/kg. Mẫu máu từ 5 hay 6 cá thể cá được thu riêng biệt bằng kim tiêm 1-mL đã được rửa qua với heparin tại các thời điểm khác nhau: 0 h (nhóm đối chứng), 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h và 72 h. Mẫu máu được ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong vòng 10 phút tại 4°C để thu huyết tương. Các mẫu huyết tương được lưu giữ ở -20°C cho đến khi đem đi phân tích. Ngoài ra, các mẫu tế bào cũng được thu. Mẫu gan được thu cùng với mẫu máu tại các thời điểm thu mẫu ở thí nghiệm cho ăn; mẫu cơ được thu ở thí nghiệm tiêm. Các mẫu tế bào này cũng được giữ đông ở -20°C cho đến khi đem đi phân tích.

Phân tích mẫu

Các mẫu đã thu, được xử lý theo phương pháp của Fu et al. (2008) có sửa đổi cho phù hợp với thí nghiệm đang tiến hành. Mô tả ngắn gọn, mẫu huyết tương 400 µL sau khi để rã đông trong điều kiện phòng, được chuyển vào eppendorf có chứa 20 µL của 20% L (+)-ascorbic acid và 20 µL of resorcinol (dung dịch chuẩn nội Internal standard solution, IS). Hỗn hợp này được tách chiết 3 lần với 800 µL of Ethyl Acetate (EtOAc) cho mỗi lần tách chiết bằng cách trộn lẫn kỹ và sau đó ly tâm tại 3.000 vòng/ phút trong vòng 10 phút ở 4°C. Phần hợp chất hữu cơ bên trên được thu lại và cho bay hơi đến cô đặc bằng khí Nitơ ở 35°C. Phần cô đặc được tái thu với 500 µL dung dịch metanol (MeOH) 20%. Dung dịch này sau đó được ly tâm tại 3.000 vòng/phút trong vòng 10 phút ở 4°C trước khi lọc qua màng lọc 0,45 µm PTFE (Millipore Ireland Ltd., Ireland) vào trong lọ đựng mẫu chuyên dụng dùng cho phương pháp phân tích HPLC.

Các mẫu cơ và gan cũng được xử lý theo các bước như trên. Tuy nhiên, có sự khác biệt về lượng mẫu và các chất phản ứng, cụ thể: 0,2 g tế bào được cho vào 0,8 mL nước Milli-Q và tiến hành nghiền đồng nhất, cần 100 µL của 20% L(+)-ascorbic acid, 50 µL IS và 5 mL EtOAc.

Chuẩn bị dung dịch EGCG chuẩn ở 6 mg/mL trong methanol và được lưu giữ ở -20°C. Chất chuẩn nội, resorcinol, được chuẩn bị ở nồng độ 75 µg/mL trong methanol và cũng được lưu giữ ở -20°C cho đến khi đem sử dụng.

Các mẫu huyết tương đã qua bước làm sạch được phân tích EGCG bằng hệ thống pha đảo Reversed Phase Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan). Hệ thống được trang bị với cột L-ODS C18 (dài, 150 mm; đường kính nội, 2,1 mm) (CERI Tokyo, Japan), được bảo vệ bởi cột L- column ODS (2,0 mm L. x 5 mm i.d.) (CERI Tokyo, Japan). Các mẫu này được rửa giải đồng nhất với pha động là MeOH và 20 mM H₃PO₄ (23:77, v/v), tỉ lệ dòng chảy 0,2 mL/phút. Quá trình rửa giải được quản lý và định lượng bởi đầu dò UV ở bước sóng 270 nm. Dung tích mẫu được tiêm vào cột là 1 µL.

Trong phép đo này thì đỉnh (peak) phát hiện của EGCG và resorcinol lần lượt tại 5,9 ± 0,1 phút và 4,3 phút. Nồng độ của EGCG trong các mẫu được xác định bằng phân tích tương quan giữa các vùng của đỉnh phát hiện và nồng độ EGCG chuẩn tương ứng được tiêm trực tiếp vào hệ thống HPLC không qua quá trình tách chiết.

Phân tích các chỉ tiêu dược động học (Pharmacokinetic parameters)

Các chỉ tiêu dược động học của EGCG trong các mẫu huyết tương và tế bào của cá đã qua cảm nhiễm được phân tích bằng phần mềm Graphpad Prism 5 bằng việc cố định thành mô hình một bộ phận (1-compartment model) theo công thức: $Y=D/V*\exp(-C/V*X)$, trong đó, Y là nồng độ (mg/L) của EGCG tại các thời điểm X (h) thu mẫu với liều tiêm D (10 mg/kg). Tỷ lệ giữa độ làm sạch (Clearance C, L/h) và thể tích phân bố (Volume of distribution V, L) được dùng để đánh giá cho hằng số đào thải κ_e (the elimination rate constant) của EGCG. Thời gian để nồng độ EGCG giảm còn 50% (half-life) trong cơ thể cá được tính bằng công thức: $T_{1/2} = \ln(2)/(C/V)$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thí nghiệm cho ăn với thức ăn có chứa EGCG với nồng độ 10 mg/kg

Bảng 1: Nồng độ EGCG ($\mu\text{g/mL}$) có trong huyết tương của cá đo được theo các mốc thời gian thu mẫu ở thí nghiệm cho cá ăn với thức ăn có chứa EGCG 10 mg/kg

Sample No.	Observed_time (hour) versus concentration of EGCG ($\mu\text{g/mL}$) in plasma						
	0	2	4	8	24	48	72
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	0.623	ND	ND			

ND: Non-detection or lower than detection limit value ($<0,066 \mu\text{g/mL}$).

Qua bảng 1, ta thấy rằng chỉ có 1 mẫu huyết tương duy nhất trong số 6 mẫu được thu tại thời điểm 2 giờ sau khi cảm nhiễm là có phát hiện EGCG với lượng 0,623 $\mu\text{g/mL}$. Còn ở lô đối chứng và các mẫu thu tại các thời điểm khác hoàn toàn không phát hiện được EGCG (giá trị giới hạn phân tích của EGCG trong hệ thống HPLC này là $<0,066 \mu\text{g/mL}$).

Tương tự như thế, EGCG không được phát hiện trong tất cả các mẫu gan thu cùng thời điểm trong thí nghiệm cho cá ăn.

Điều này có thể là do việc hấp thu chậm và đào thải nhanh của EGCG khi cảm nhiễm bằng con đường cho ăn.

Thí nghiệm tiêm EGCG với nồng độ 10 mg/kg

Bảng 2: Nồng độ EGCG ($\mu\text{g/mL}$) có trong huyết tương của cá đo được theo các mốc thời gian thu mẫu ở thí nghiệm tiêm cá với EGCG 10 mg/kg

Sample No.	Observed_time (hour) versus concentration of EGCG ($\mu\text{g/mL}$) in plasma						
	0	2	4	8	24	48	72
1	ND	2.119	ND	0.524	ND	ND	ND
2	ND	0.386	1.898	1.454	ND	ND	ND
3	ND	3.156	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	4.094	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	2.899	7.526	ND	ND	ND	ND
6	ND	0.658	ND	ND			

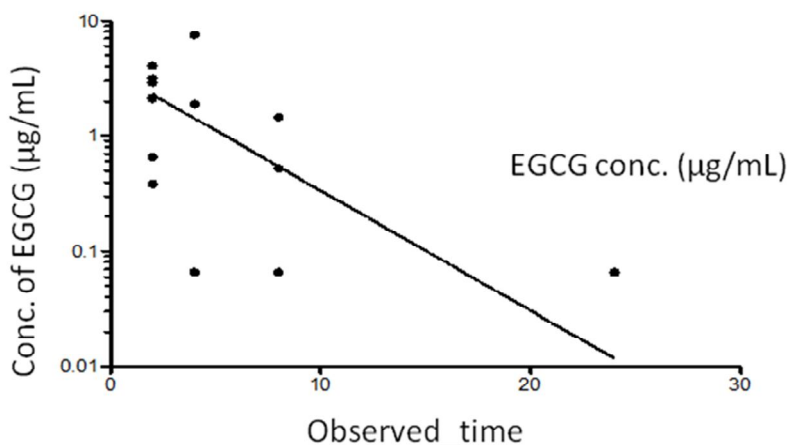
ND: Non-detection or lower than detection limit value ($<0,066 \mu\text{g/mL}$).

Qua bảng 2, ta thấy rằng nồng độ EGCG trong huyết tương phân tích được từ các mẫu có xu hướng giảm dần từ các mẫu thu tại thời điểm 2 h, 4 h đến 8 h sau khi tiêm và không được phát hiện trong các mẫu thu tại các thời điểm sau đó 24 h, 48 h và 72 h (giới hạn phân tích <0,066 $\mu\text{g/mL}$).

Còn trong các mẫu cơ thì cũng không thấy có sự xuất hiện của EGCG.

Do EGCG chỉ được phát hiện trong huyết tương của cá trong thí nghiệm tiêm nên các chỉ số dược động học của EGCG chỉ được đánh giá cho thí nghiệm này.

Phân tích các chỉ tiêu dược động học



Hình 3: Sự tương quan giữa nồng độ EGCG ($\mu\text{g/mL}$) trong huyết tương và các thời điểm thu mẫu trong thí nghiệm tiêm được xử lý bằng phần mềm Graphpad Prism 5 cho 1-compartment model.

Bảng 3: Các chỉ tiêu dược động học được xác định bằng phần mềm Graphpad Prism 5 cho 1-compartment model

Parameters	Best-fit value	Units
V (Volume of distribution)	2.69	L
C (Clearance)	0.65	L/h
$T_{1/2}$ (Half-life)	2.89	h
k_e (Elimination rate constant)	0.24	

Không có báo cáo nào về dược động học của EGCG ở cá, tuy nhiên EGCG half-life (bảng 3) đã được báo cáo tương tự ở chuột và chuột nhắt lần lượt là 2,25 h và 3,96 h (Chen et al., 1997; Lambert et al., 2003). Kết quả này được minh chứng bởi khuynh hướng phân bố nhanh của EGCG vào vùng ngoại vi và bị đào thải chủ yếu thông qua mật sau khi cảm nhiễm vào mạch máu (intravenous administration) ở chuột (Chen et al., 1997). Vì vậy, có thể là EGCG trong huyết tương được hấp thụ và/ hoặc phân bố nhanh chóng vào trong các tế bào và bị đào thải từ những tế bào đó trước khi đi đến tế bào cơ ở cá. Hiện tượng glucuronat hóa (glucuronidation) và sulfat hóa (sulfation) của các polyphenol có trong trà xanh đã và đang được biết đến như là các con đường đào thải chính của các polyphenol này (Lee et al., 1995); do đó, có thể giải thích rằng quá trình trao đổi chất của EGCG (quá trình chuyển hóa EGCG thành các chất khác) xảy ra nhanh và đào thải mạnh nên dẫn đến sự vắng mặt của EGCG không chuyển hóa trong huyết tương của cá trong thí nghiệm cho ăn.

Trong lúc đó thì polyphenols trong trà xanh đã được báo cáo có những tác dụng ngăn chặn sự oxy hóa của lipid, sự làm giảm màu sắc của thịt và sự phát triển của vi khuẩn, và cũng làm chậm sự phân giải sau khi chết cứng ở cơ thể cá trong giai đoạn giữ đông ở cá yellowtail

(Ishihara et al. 2000, 2001, 2002). Ngoài ra, tiềm năng của EGCG như là một chất chống oxy hóa và một chất kích ứng miễn dịch đã được thể hiện ở cá rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Thawonsuwan et al. 2010). Thế nên, những nghiên cứu nhằm tìm hiểu cơ chế trao đổi chất và sản phẩm trao đổi chất của EGCG ở cá cần được thực hiện để giải thích cho những nhận định ban đầu về được động của EGCG ở cá.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

EGCG được thử nghiệm cho thấy tính sinh khả dụng (bioavailability) thấp. Điều này có nghĩa là chúng không được cá hấp thu hay chỉ hấp thu một ít và nhanh chuyển hóa trong cơ thể. Do đó, việc sử dụng chất này như là chất chống oxy hóa dùng cho việc bảo vệ cá khỏi bị chết ngạt khi thủy triều đỏ do *Chattonella* spp. gây ra là không khả thi. Vì vậy, những nghiên cứu nhằm tìm ra các giải pháp bảo vệ cá khỏi những tác hại do hiện tượng thủy triều đỏ gây ra cần được tiếp tục tiến hành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen L., Lee M., Li H. and Yang C.S. (1997). Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metabolism and Disposition* **25** (9), 1045-1050.
- Endo M., Sakai T. and Kuroki A. (1985). Histological and histochemical changes in the gills of the yellowtail *Seriola quinqueradiata* exposed to the Raphidiphycean flagellate *Chattonella marina*. *Marine Biology* **87**, 193-197.
- Endo M., Foscarini R. and Kuroki A. (1988). Electrocardiogram of a marine fish, *Pagrus major*, exposed to red tide plankton, *Chattonella marina*. *Marine Biology* **97**, 477-481.
- Fridovich I. (1986). Biological Effects of the Superoxide Radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **247** (1), 1-11.
- Fukuyo Y., Imai I., Kodama M. and Tamai K. (2002). Red tides and other harmful algal bloom in Japan. *PICES-Scientific Report No.23*, 7-20.
- Fu T., Liang J., Han G., Lv L. and Li N. (2008). Simultaneous determination of the major active components of tea polyphenols in rat plasma by a simple and specific HPLC assay. *Journal of Chromatography B* **875**, 363-367.
- Graham H.N. (1992). Green Tea Composition, Consumption, and Polyphenol Chemistry. *Preventive Medicine* **21**, 334-350.
- Hiroishi S., Okada H., Imai I. and Yoshida T. (2005). High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish. *Harmful Algae* **4**, 783-787.
- Kim D., Nakashima T., Matsuyama Y., Niwano Y., Yamaguchi K., and Oda T. (2007). Presence of the distinct systems responsible for superoxide anion and hydrogen peroxide generation in red tide phytoplankton *Chattonella marina* and *Chattonella ovata*. *Journal of Plankton Research* **29** (3), 241-247.
- Ishihara N., Araki T., Inoue M., Nishimura A., Chu D., Juneja L. R. and Morishita T. (2000). Suppressive Effect of Green Tea Polyphenols on Oxidation in Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) Meat during Round Iced Storage. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **47** (10), 767-772.
- Ishihara N., Araki T., Tamaru Y., Inoue M., Nishimura A., Aoi N., Chu D., Juneja L. R. and Morishita T. (2001). Suppressive Effects of Green Tea Polyphenols on Microbial Growth and Volatile Basic Nitrogen Content in Round Form Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) Meat during Ice Storage. *Food Preser. Sci.*, **27** (5), 269-276.
- Ishihara N., Araki T., Tamaru Y., Inoue M., Nishimura A., Aoi N., Chu D., Juneja L. R. and Morishita T. (2002). Effects of Green Tea Polyphenols on Rigor Indexes and K Value of Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) during Ice Storage. *日本食品保蔵科学会誌*, **28** (4), 175-181.
- Kim D. and Oda T. (2010). Possible Factors Responsible for the Fish-Killing Mechanisms of the Red Tide Phytoplankton, *Chattonella marina* and *Cochlodinium polykrikoides*. A. Ishimatsu, H-J. Lie (Eds), *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea, TERRAPUB and Nagasaki University*, 245-268.

- Lambert J.D., Lee M., Lu H., Meng X., Hong J., Seril D., Sturgill M. and Yang C. (2003). Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *Journal of Nutrition* **133**, 4172-4177.
- Lee M.J., Wang Z.Y., He L., Chen L., Yang S., Gobbo S., Balentine D.A., and Yang C.S. (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epi. Biom. Prev* **4**, 393-399.
- Miller D.M., Buettner G.R. and Aust S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "Autoxidation" reactions. *Free Radical Biology & Medicine* **8**, 95-108.
- Oda T., Akaike T., Hamamoto T., Suzuki F., Hirano T., and Maeda H. (1989). Oxygen Radicals in Influenza-Induced Pathogenesis and Treatment with Pyran Polymer-Conjugated SOD. *Science* **244**, 974-976.
- Oda T., Akaike T., Sato K., Ishimatsu A., Takeshita S., Muramatsu T., and Maeda H. (1992). Hydroxyl Radical Generation by Red Tide Algae. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **294** (1), 38-43.
- Oda T., Ishimatsu A., Takeshita S., and Muramatsu T. (1994). Hydrogen peroxide production by the red-tide flagellate *Chattonella marina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 455-458.
- Oda T., Nakamura A., Shikayama M., Kawano I., Ishimatsu A., and Muramatsu T. (1997). Generation of Reactive Oxygen Species by Raphidophycean Phytoplankton. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (10), 1658-1662.
- Rice-Evans C., Miller N.J., and Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biology & Medicine* **20** (7), 933-956.
- Shimada M., Kawamoto S., Nakatsuka Y., and Watanabe M. (1993). Localization of Superoxide Anion in the Red Tide Alga *Chattonella antiqua*. *Histochemistry and Cytochemistry* **41**(4), 507-511.
- Slater T.F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Journal of Biochem.* **222**: 1-15.
- Tanaka K., Yoshimatsu S. and Shimada M. (1992). Generation of superoxide anions by *Chattonella antiqua*: Possible causes for fish death caused by 'Red Tide'. *Experientia* **48**, 888-890.
- Tanaka K., Muto Y., and Shimada M. (1994). Generation of superoxide anion in the red tide alga *Chattonella antiqua*. *J. Plankton Res.* **16**, 161-169.
- Thawonsuwan J., V. Kiron, S. Satoh, A. Panigrahi and V. Verlhac (2010). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem.* **36**, 687-697.
- Yang C.Z., Albright L.J. and Yousif A.N. (1995). Oxygen-radical-mediated effects of the toxic phytoplankter *Heterosigma carterae* on juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* **23**, 101-108.