

Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của cao quả nhàu trên hai mô hình gây tổn thương gan chuột nhắt trắng bằng carbon tetrachlorid (CCl_4) và paracetamol

Phạm Thị Vân Anh¹, Nguyễn Trọng Thông¹

Phạm Thiện Ngọc¹, Nguyễn Thị Hằng²

¹ Trường Đại học Y Hà Nội

² Học Viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

Đặt vấn đề

Cây nhàu còn có nhiều tên khác như cây nhàu núi, ngao núi, cây giàu... Tên khoa học là *Morinda citrifolia* L. họ Cà phê Rubiaceae.

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa, chống ung thư của quả nhàu trồng ở Hawaii và nhiều vùng khác cho kết quả rất khả quan [7]. Trong các công trình nghiên cứu trước của chúng tôi, CQN có tác dụng kích thích miễn dịch [1], CQN với liều 5g/kg và 25g/kg thể trọng, uống liên tục trên thỏ bị chiếu xạ 5 Gy thấy làm tăng đáng kể hoạt độ enzym chống oxy hóa như SOD (superoxid dismutase), GPx (glutathion peroxidase), GR (glutathion reductase), tình trạng chống oxy hóa toàn phần TAS (total antioxidant status) và làm giảm hàm lượng MDA (malonyl dialdehyd) trong máu của thỏ được uống thuốc so với lô chứng chỉ chiếu xạ đơn thuần [3]. Theo kinh nghiệm dân gian, các loài trong chi *Morinda* thuộc họ Cà phê có tác dụng bảo vệ gan. Một nghiên cứu gần đây của Đỗ Thị Tuyên và cộng sự cho thấy dịch chiết quả nhàu có tác dụng chống oxy hóa thông qua sự thay đổi một số hệ thống enzym chịu trách nhiệm giải độc chính ở gan [4]. Có nhiều nguồn tạo ra các gốc tự do, chủ yếu là quá trình chuyển hóa của tế bào như các phản ứng oxy hóa khử của tế bào trong quá trình thực bào, các phản ứng khử độc, đặc biệt trong quá trình hô hấp tế bào [2]. Ngoài ra gốc tự do còn được hình thành trong cơ thể do tác nhân của môi trường đặc biệt là tia xạ và các chất dị sinh [2]. Đây là nguyên nhân dẫn đến nhiều bệnh lý nghiêm trọng như ung thư, đột biến các cấu trúc di truyền, lão hóa... Vì vậy nghiên cứu tìm được nguồn dược liệu có tác dụng chống oxy hóa để điều trị các bệnh lý đang là vấn đề thời sự tại Việt Nam và trên thế giới.

Để nghiên cứu sâu hơn về tác dụng chống oxy

hóa và mối liên quan giữa tác dụng chống oxy hóa và tác dụng bảo vệ gan của quả nhàu Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài nhằm:

1. Đánh giá tác dụng bảo vệ các tế bào gan sau tổn thương gan gây ra bởi CCl_4 và paracetamol liều cao của CQN (thông qua sự biến đổi của hoạt độ enzym AST, ALT huyết thanh).

2. Sơ bộ đánh giá sự ảnh hưởng của CQN lên quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào gan (thông qua định lượng MDA của nhu mô gan).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Thuốc

- Cao mềm quả nhàu tỉ lệ 1:5 (1 gam cao từ 5 gam dược liệu khô) do công ty Nacatifoods sản xuất. Khi sử dụng được pha loãng trong dung môi nước đến các tỷ lệ thích hợp.

- Silymarin (biệt dược Legalon) của hãng Madaus (Pháp).

Động vật thực nghiệm

Chuột nhắt trắng, cả hai giống, chủng Swiss, cân nặng 20g - 2g của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Dụng cụ và hóa chất

- Carbon tetrachlorid, paracetamol, xanthin, xanthinoxidase, carboxy methylcellulose (CMC), dầu olive... do phòng Giáo tài trường Đại học Y Hà Nội cung cấp theo đúng tiêu chuẩn phòng thí nghiệm.

- Kit xác định hoạt độ transaminase của hãng Hospitex Diagnostics (Italy).

- Máy xét nghiệm sinh hóa máu Screen master (Italy), máy nghiền dịch đồng thể mô Stomater 80 (Anh), máy ELISA Lx 800 (Mỹ).

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Phương pháp nghiên cứu

Mô hình gây tổn thương tế bào gan bằng CCl_4 [5, 8]

Chuột nhắt trắng được chia thành 5 lô, mỗi lô 10 con

Lô 1 (chứng sinh học): uống NaCl 9‰ + tiêm dầu olive.

Lô 2 (tiêm CCl_4 đơn thuần): uống NaCl 9‰ + tiêm CCl_4

Lô 3 (chứng dương): uống silymarin 67 mg/kg + tiêm CCl_4

Lô 4 (thuốc nghiên cứu): uống CQN 1,2 g/kg + tiêm CCl_4

Lô 5 (thuốc nghiên cứu): uống CQN 2,4 g/kg + tiêm CCl_4

Chuột được uống NaCl 9‰ hoặc thuốc liên tục trong 8 ngày, mỗi ngày một lần vào buổi sáng. Ngày thứ 8, sau khi uống thuốc 1 giờ, gây tổn thương gan ở các lô 2, 3, 4, 5 bằng tiêm màng bụng dung dịch CCl_4 4 ml/kg (pha 0,5 ml CCl_4 trong 3,5 ml dầu olive). Chuột ở lô 1 được tiêm dầu olive với cùng thể

tích.

24 giờ sau khi gây độc, giết chuột, lấy máu đông mạch cảnh, đo hoạt độ enzym AST, ALT huyết thanh, lấy gan để xác định hàm lượng MDA.

Mô hình gây tổn thương tế bào gan bằng paracetamol

Chuột nhắt trắng được chia thành 5 lô (như mô hình gây tổn thương gan bằng CCl_4), chỉ khác thay tiêm CCl_4 bằng uống paracetamol liều 500 mg/kg pha trong CMC 1% ở 4 lô: 2, 3, 4, 5.

Lô 1: chỉ uống NaCl 9‰ với cùng thể tích (0,2 ml/10 g chuột).

48 giờ sau khi uống paracetamol, lấy máu đông mạch cảnh, đo hoạt độ enzym AST, ALT, lấy gan để xác định hàm lượng MDA.

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê theo t-test student, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu

Ảnh hưởng của CQN lên mức độ tổn thương tế bào gan gây ra bởi CCl_4 và paracetamol

Bảng 1: Hoạt độ AST huyết thanh chuột nhắt bị gây độc bằng CCl_4

Lô chuột	AST (U/l) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p so với lô 1	p so với lô 2	p so với lô 3	p so với lô 5
Lô 1 (chứng sinh học)	142,7 $\pm$ 429,4				
Lô 2 (tiêm CCl_4 đơn thuần)	13808,2 $\pm$ 986,6	< 0,001			
Lô 3 (silymarin)	6947,0 $\pm$ 1804,1	< 0,001	< 0,001		
Lô 4 (CQN 1,2g/kg)	7091,6 $\pm$ 1079,5	< 0,001	< 0,001	> 0,05	> 0,05
Lô 5 (CQN 2,4 g/kg)	6978,3 $\pm$ 1183,2	< 0,001	< 0,001	> 0,05	

Bảng 2: Hoạt độ ALT huyết thanh chuột nhắt bị gây độc bằng CCl_4

Lô chuột	ALT (U/l) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p so với lô 1	p so với lô 2	p so với lô 3	p so với lô 5
Lô 1 (chứng sinh học)	67,9 $\pm$ 17,3				
Lô 2 (tiêm CCl_4 đơn thuần)	13698,3 $\pm$ 1566,7	< 0,001			
Lô 3 (silymarin)	6921,6 $\pm$ 1192,6	< 0,001	< 0,001		
Lô 4 (CQN 1,2 g/kg)	6959,4 $\pm$ 1029,1	< 0,001	< 0,001	> 0,05	> 0,05
Lô 5 (CQN 2,4 g/kg)	6750,8 $\pm$ 929,5	< 0,001	< 0,001	> 0,05	

Kết quả ở bảng 1 và bảng 2 cho thấy:

Hoạt độ AST và ALT tăng lên rất cao ở những lô chuột tiêm CCl_4 so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).

Cao quả nhàu liều 1,2 g (tương ứng 6 g được

liệu)/kg và 2,4 g (tương ứng 12 g được liều)/kg làm hạn chế đáng kể mức tăng hoạt độ hai enzym này so với lô mô hình ($p < 0,001$). Tác dụng của CQN ở cả hai liều như nhau và tương đương với silymarin ($p > 0,05$).

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Bảng 3. Hoạt độ AST huyết thanh chuột nhắt bị gây độc bằng paracetamol

Lô chuột	AST (UI/l) ($\bar{X} \pm SD$)	p so với lô 1	p so với lô 2	p so với lô 3	p so với lô 5
Lô 1 (chứng sinh học)	131,4 ± 15,4				
Lô 2 (Paracetamol đơn thuần)	593,2 ± 90,2	< 0,001			
Lô 3 (silymarin)	151,3 ± 31,8	> 0,05	< 0,001		
Lô 4 (CQN 1,2g/kg)	162,1 ± 30,5	< 0,05	< 0,001	> 0,05	> 0,05
Lô 5 (CQN 2,4 g/kg)	148,7 ± 29,6	> 0,05	< 0,001	> 0,05	

Bảng 4: Hoạt độ ALT huyết thanh chuột nhắt bị gây độc bằng paracetamol

Lô chuột	ALT (UI/l) ($\bar{X} \pm SD$)	p so với lô 1	p so với lô 2	p so với lô 3	p so với lô 5
Lô 1 (chứng sinh học)	67,3 ± 12,1				
Lô 2 (Paracetamol đơn thuần)	471,5 ± 97,3	< 0,001			
Lô 3 (silymarin)	162,5 ± 26,2	< 0,001	< 0,001		
Lô 4 (CQN 1,2 g/kg)	169,0 ± 25,5	< 0,001	< 0,001	> 0,05	> 0,05
Lô 5 (CQN 2,4 g/kg)	160,9 ± 24,9	< 0,001	< 0,001	> 0,05	

Kết quả ở bảng 3 và 4 cho thấy:

Ở các lô chuột uống paracetamol liều 500 mg/kg, hoạt độ hai enzym AST và ALT tăng lên rất cao so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).

Cao quả nhàu liều 1,2 g/kg và 2,4g/kg làm giảm đáng kể hoạt độ của hai enzym này so với lô mô hình ($p < 0,001$). Tác dụng của CQN ở cả hai liều

như nhau và tương đương với silymarin.

Ảnh hưởng của CQN lên mức độ peroxy hóa lipid màng tế bào gan gây ra bởi CCl_4 và paracetamol

Sau khi giết chuột lấy gan, nghiền gan bằng máy chuyên dụng, xác định hàm lượng MDA trong dịch nghiền, cho kết quả như sau:

Bảng 5. Hàm lượng MDA dịch đồng thể gan chuột nhắt trên mô hình gây độc bằng CCl_4

Lô chuột	Hàm lượng MDA (nm/l) ($\bar{X} \pm SD$)	p so với lô 1	p so với lô 2	p so với lô 3	p so với lô 5
Lô 1 (chứng sinh học)	7,08 ± 0,48				
Lô 2 (tiêm CCl_4 đơn thuần)	18,18 ± 1,28	< 0,001			
Lô 3 (silymarin)	12,7 ± 2,76	< 0,001	< 0,001		
Lô 4 (CQN 1,2g/kg)	14,14 ± 1,70	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,05
Lô 5 (CQN 2,4 g/kg)	12,53 ± 2,31	< 0,001	< 0,001	> 0,05	

Bảng 6. Hàm lượng MDA dịch đồng thể gan chuột nhắt trên mô hình gây độc bằng paracetamol

Lô chuột	Hàm lượng MDA (nm/l) ($\bar{X} \pm SD$)	p so với lô 1	p so với lô 2	p so với lô 3	p so với lô 5
Lô 1 (chứng sinh học)	6,74 ± 1,28				
Lô 2 (Paracetamol đơn thuần)	9,25 ± 1,60	< 0,06			
Lô 3 (silymarin)	7,19 ± 1,43	> 0,05	< 0,05		
Lô 4 (CQN 1,2g/kg)	7,51 ± 1,16	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05
Lô 5 (CQN 2,4 g/kg)	7,31 ± 1,12	> 0,05	< 0,05	> 0,05	

Kết quả bảng 5 và bảng 6 cho thấy: Hai tác nhân paracetamol và CCl_4 đều làm tăng hàm lượng MDA một cách rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$), tuy nhiên CCl_4 thể hiện tác dụng này rõ rệt hơn paracetamol ($p < 0,001$). CQN ở cả hai liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg đều làm hàm lượng MDA giảm rõ rệt so với các lô mô hình chỉ uống paracetamol, tiêm CCl_4 ($p < 0,05$). Liều 2,4 g/kg CQN làm giảm hàm lượng MDA do CCl_4 gây ra mạnh hơn liều 1,2 g/kg ($p < 0,05$). Tác dụng này của CQN tương đương với silymarin.

Bàn luận

Để gây tổn thương gan trên thực nghiệm, người ta dùng nhiều chất hóa học khác nhau trong đó có CCl_4 và paracetamol. CCl_4 là một dung môi hữu cơ, bản chất không độc. Tuy nhiên khi vào cơ thể, CCl_4 bị chuyển hóa qua hệ thống enzym oxy hóa thuốc cytochrome P450, cụ thể là isoenzym, cyp2E1, tạo ra các gốc tự do CCl_3 , CCl_3O_2 [6], đây là các gốc tự do có hoạt tính cao bởi tính không ổn định và thời gian tồn tại ngắn. Các gốc tự do này dễ dàng phản ứng với các acid béo chưa no của màng tế bào, quá trình peroxid hóa lipid này sẽ làm phá hủy màng tế bào, biến tính protein, gây ra tổn thương dưới tế bào rất nặng nề... [2]. Mức độ tổn thương tế bào gan được thể hiện rõ ở hoạt độ enzym AST, ALT, vì vậy định lượng AST và ALT được xem là thông số quan trọng để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan. Quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào gan còn tạo ra các sản phẩm, đặc biệt là MDA, vì vậy định lượng MDA dịch đồng thể gan có thể đánh giá một phần quá trình peroxy hóa lipid của màng tế bào gan.

Paracetamol sau khi vào cơ thể, một phần bị chuyển hóa qua hệ thống oxy hóa thuốc cytochrome P450 để tạo thành N-acetyl para-benzoquinonimin (NAPQI) - một gốc tự do gây nên quá trình peroxy hóa lipid và sinh ra MDA giống như các chất tạo thành do chuyển hóa CCl_4 . Hậu quả dẫn đến tổn thương các tế bào gan, làm tăng AST, ALT, MDA. Như vậy, để đánh giá tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan, chúng tôi có thể sử dụng hai mô hình gây tổn thương gan bằng CCl_4 và paracetamol thông qua định lượng hoạt độ AST, ALT và hàm lượng MDA.

Kết quả bảng 1, 2, 3 và 4 cho thấy CCl_4 , paracetamol làm tăng hoạt độ AST, ALT huyết thanh và hàm lượng MDA rõ rệt so với chứng. Mức độ gây tổn thương gan do paracetamol ở liều 500 mg/kg yếu hơn CCl_4 4 ml/kg tiêm màng bụng. CQN liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg tương đương với liều dùng cho người và cao gấp 2 lần liều dùng cho người uống liên tục 8 ngày đã làm hạn chế sự tăng AST, ALT và MDA do CCl_4 và paracetamol gây ra. Tuy nhiên,

trên mô hình gây tổn thương bằng paracetamol tác dụng của CQN mạnh hơn CCl_4 (ở mô hình CCl_4 CQN làm giảm hoạt độ ALT 50%, AST 48%, MDA 31%). Một câu hỏi được đặt ra, tại sao CQN lại làm giảm tác dụng gây độc tế bào gan do CCl_4 và paracetamol gây ra? phải chăng do CQN ức chế cytochrome P450, làm giảm chuyển hóa CCl_4 và paracetamol nên ít tạo thành gốc tự do hay CQN có tác dụng dọn gốc tự do?

Để làm sáng tỏ CQN có ức chế cytochrome P450 hay không, chúng tôi sẽ tiến hành nghiên cứu khác nhằm xác định sự tương tác trên chuyển hóa giữa CQN và một số thuốc đặc hiệu chuyển hóa qua cytochrome 450.

Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Trọng Thông (2006) và cộng sự trong CQN có chứa selen. Do selen có vai trò là chất chống oxy hóa nên CQN làm giảm gốc tự do dẫn đến làm giảm tổn thương tế bào gan do CCl_4 và paracetamol gây ra. Như chúng ta đã biết, trong cơ thể có hệ thống enzym chống oxy hóa là SOD, GR, GPx, khi hoạt độ enzym này tăng sẽ làm giảm lượng gốc tự do trong cơ thể. Trong một nghiên cứu đã công bố của chúng tôi cho thấy CQN liều 5 g/kg và 25 g/kg uống liên tục 8 ngày đã làm tăng rõ rệt hoạt độ SOD, GR, GPx [3]. Như vậy, do chứa selen, làm tăng SOD, GR, GPx, nên CQN làm giảm quá trình peroxy hóa lipid, giảm gốc tự do sinh ra do CCl_4 và paracetamol nên bảo vệ được màng tế bào gan, làm cho hoạt độ AST, ALT và hàm lượng MDA giảm so với chứng.

Kết luận

CQN liều 1,2 g (tương đương 6g dược liệu/kg) và 2,4 g (tương đương 12g dược liệu) /kg thể trọng, uống liên tục trong 8 ngày làm giảm hoạt độ của các enzym AST, ALT trong huyết thanh, làm giảm hàm lượng MDA dịch đồng thể gan của chuột nhắt trắng bị gây tổn thương tế bào gan bằng CCl_4 và paracetamol liều cao. Tác dụng của CQN ở cả hai liều như nhau và tương đương với silymarin liều 67 mg/kg.

Summary

The antioxidant effects of Morinda citrifolia (MC) were investigated on carbon tetrachlorid and paracetamol induced liver damage in mice.

Materials: Swiss mice weighting 20 ± 2 g.

Methods: Pretreatment with Morinda citrifolia (MC) 6 g/kg, 12 g/kg, silymarin 67 mg/kg body weight or NaCl 9%o for 8 consecutive days, then using CCl_4 4 ml/kg (i.p) and paracetamol 500 mg/kg (p.o) of body weight to cause liver injury.

Results:

(Xem tiếp trang 36)

Bảng 2: Hoạt tính kháng sinh của hợp chất 1

Hợp chất	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: µg/ml)							
	Vi khuẩn Gr (-)		Vi khuẩn Gr (+)		Nấm mốc		Nấm men	
	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>ASP. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
1	(-)	50	(-)	50	(-)	50	(-)	(-)
Tetraxillin	15,6	16,5	0,39	0,1				
Nystatin					12,5	1,56	3,1	3,1

- Vi khuẩn Gr (+): *Bacillus subtilis* (ATCC 27212),
Staphylococcus aureus

- Nấm sợi: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*

- Nấm men: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*

- Kháng sinh kiểm định: Tetracyclin đối với vi khuẩn Gr (+)
và Gr (-), Nystatin đối với nấm sợi và nấm men

Staphylococcus aureus và kháng nấm sợi *Fusarium oxysporum* với giá trị MIC < 50 µg/ml.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn CN Hà Quốc Hoàn và TS Tô Đức Cường Vườn Quốc Gia Tam Đảo đã cung cấp mẫu và giám định tên khoa học. ThS Đặng Vũ Lương đã giúp đo các phổ NMR. Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài KHCN cấp Viện KH&CN Việt Nam và Dự án hợp tác quốc tế theo Nghị định thư Việt Nam- Italia giai đoạn 2006-2008.

Summary

New E-cinamic acid derivative from *Gleditschia australis* Hemsl., (Caesalpiniaceae)

A new E-cinamic acid derivative named E-cinamic acid 1-O-[E-cinnamoyl-(1→3)]-[α-L-Rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosyl]

ester was isolated from the methanolic extract of the leaves of *Gleditschia australis* Hemsl., (Caesalpiniaceae). Its structure was elucidated by means of ESI-mass spectrometry, HRESI-mass spectrometry, ¹H-NMR, ¹³C-NMR (CPD and DEPT), ¹H-¹H COSY, HSQC and HMBC spectra. This compound showed significant anti-body effect against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in vitro with the MIC values lower than 50 µg/ml.

Tài liệu tham khảo

1. Viện Dược liệu, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật (2004), p.158-160
2. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội (2001).

Nghiên cứu... (Tiếp theo trang 25)

- CCl₄ and paracetamol administration increased serum AST, ALT activities, hepatic MDA formation.

- Serum AST and ALT activities were effectively decreased, hepatic malonyl dialdehyd formation was inhibited by MC and silymarin.

Conclusion: Our results suggest that pretreatment with MC can efficiently protect mice againts CCl₄, paracetamol induced liver damage.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Thị Vân Anh, Nghiên cứu độc tính và ảnh hưởng của cao trái nhàu lên một số chỉ tiêu miễn dịch của súc vật thực nghiệm, *Luận văn thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.* (2003)

2. Nguyễn Thị Hà, *Gốc tự do và sự chống oxy hóa trong sinh học, những vấn đề hóa sinh học hiện đại*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. (1999)

3. Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh, Vũ Thị Ngọc Thanh, Nghiên cứu ảnh hưởng của cao quả nhàu lên hoạt độ một số enzym chống oxy hóa và trạng thái chống oxy hóa toàn phần

trong máu thỏ bị chiếu xạ thực nghiệm, *Tạp chí Dược học* (2006) số 2, tr. 23 - 27.

4. Đỗ Thị Tuyên, Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Ngọc Dao, ảnh hưởng của dịch chiết quả nhàu Việt Nam lên sự chuyển hóa enzym ở gan chuột, *Tạp chí Dược liệu*, (2005) tập 10, số 4, tr. 128 - 132.

5. Liu G.T., Li Y., Wei H.L., "Mechanism of protective action of bicyclol against CCl₄ - induced liver injury in mice", *Liver International*, (2005) 25, pp. 872 - 879.

6. Tomomi S., Junichi N., Azumi Y., "Selective protetion of curcumin against carbon tetrachlorid - induced inactivation of hepatic cytochrome P450 isozymes in rats", *Life Sciences*, (2006) 78, pp. 2188 - 2193.

7. Wang M.Y., Su C. (2001), "Cancer preventive effect of morinda citrifolia (noni)", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 952, pp. 161-168.

8. Yang Y, Liu W, Han B, "Protective effects of chitosan oligo sacharid and its derivatives against carbon tetrachlorid - induced liver damage in mice", *Hepatology Research*, (2006) 35, pp. 178 - 184.