

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



TRỊNH THỊ VÂN ANH

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP
VÀ TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN
CỦA VIÊN NANG GYDENPHY
TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM.**

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

Hà Nội – 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



TRỊNH THỊ VÂN ANH

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP
VÀ TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN
CỦA VIÊN NANG GYDENPHY
TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM.**

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

Chuyên ngành: YHCT

Mã số: 8720115

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. TS. Lê Hồng Phú**
- 2. PGS. TS. Nguyễn Hoàng Ngân**

Hà Nội - 2022

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành công trình nghiên cứu này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ tận tình và quý báu của các Thầy, Cô, cơ quan, đồng nghiệp và gia đình. Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin trân trọng cảm ơn:

- PGS. TS. Nguyễn Hoàng Ngân và TS. Lê Hồng Phú đã trực tiếp hướng dẫn, tận tình dìu dắt tôi trong suốt quá trình nghiên cứu đề tài và hoàn thành bản luận văn.

- Ban Giám hiệu, phòng đào tạo Sau đại học – Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam đã quan tâm tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong học tập và nghiên cứu.

- Bộ môn Dược Lý, Viện Đào tạo Dược, Học Viện Quân Y.

- Ths. Bs. Tống Lê Bách Giám đốc Bệnh viện Đa khoa Bim Sơn và Ban giám đốc Bệnh viện.

- BSCKI. Nguyễn Hồng Sơn và cán bộ, nhân viên khoa YHCT – Bệnh viện Đa khoa Bim Sơn nơi tôi đang công tác đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi yên tâm học tập.

Tôi biết ơn sâu sắc công lao của bố mẹ 2 bên và chồng, những người thân trong gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn ở bên, động viên giúp đỡ tôi hoàn thành nhiệm vụ trên con đường học tập.

Hà Nội, tháng 02 năm 2022

Tác giả

Trịnh Thị Vân Anh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trịnh Thị Vân Anh, học viên lớp Cao học khóa 12, Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, chuyên ngành Y học cổ truyền, xin cam đoan:

1. Đây là luận văn do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Hoàng Ngân và TS. Lê Hồng Phú
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những cam kết này.

Hà Nội, tháng 02 năm 2022

Tác giả

Trịnh Thị Vân Anh

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1.TỔNG QUAN VỀ BỆNH VIÊM GAN THEO YHHĐ	3
1.1.1.Tình hình dịch tễ	3
1.1.2.Vai trò của stress oxy hóa và các gốc tự do đối với tổn thương tế bào gan	4
1.2.TỔNG QUAN VỀ BỆNH VIÊM GAN THEO YHCT	6
1.2.1.Bệnh danh	6
1.2.2.Khái niệm	6
1.2.3.Triệu chứng đặc trưng	7
1.2.4.Nguyên nhân	7
1.2.5.Cơ chế bệnh sinh	8
1.2.6.Biến chứng luận trị	9
1.2.7.Nguyên tắc điều trị	10
1.2.8.Các thể bệnh	11
1.3. TỔNG QUAN VỀ CÁC DƯỢC LIỆU DÙNG CHO BÀO CHẾ VIÊN NANG GYDENPHY	17
1.3.1.Quả Me rừng	17
1.3.2.Giảo cổ lam	18
1.3.3.Thạch học tía	19
1.4. TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM²⁰	
1.4.1.Tổng quan về thử nghiệm độc tính cấp	20
1.4.2.Tổng quan về thử nghiệm đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan	22
CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1.CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	25
2.1.1.Chế phẩm nghiên cứu	25

2.1.2.Động vật nghiên cứu	26
2.3.PHƯƠNG TIỆN TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU	26
2.4.PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.2.1.Nghiên cứu độc tính cấp	27
2.2.2.Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol	30
2.5.XỬ LÝ SỐ LIỆU	32
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	34
3.1.KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP CỦA VIÊN NANG “GYDENPHY”	34
3.1.1.Kết quả theo dõi, đánh giá tình trạng chung của chuột trong vòng 72 giờ sau uống thuốc	34
3.1.2.Kết quả theo dõi, đánh giá số chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau uống Gydenphy	35
3.1.3.Kết quả theo dõi, đánh giá tình trạng chung và số chuột chết ở mỗi lô trong thời gian sau 72 giờ cho đến hết 7 ngày sau uống thuốc	36
3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN CỦA VIÊN NANG “GYDENPHY”	37
3.2.1.Ảnh hưởng của Gydenphy lên hoạt độ enzym AST máu chuột	37
3.2.2.Ảnh hưởng của Gydenphy lên hoạt độ enzym ALT máu chuột	39
3.2.3.Ảnh hưởng của Gydenphy lên trọng lượng gan chuột	41
3.2.4.Ảnh hưởng của Gydenphy lên hàm lượng malondialdehyde (MDA) gan chuột	43
3.2.5.Ảnh hưởng của Gydenphy lên hàm lượng glutathion (GSH) gan chuột	45
3.2.6.Ảnh hưởng của Gydenphy lên hình ảnh đại thể của gan chuột	47
3.2.7.Ảnh hưởng của Gydenphy lên hình ảnh vi thể của gan chuột	49
4.1.ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP CỦA VIÊN NANG “GYDENPHY”	51
4.2.ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ VỀ TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN CỦA VIÊN NANG GYDENPHY TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG GÂY TỔN THƯƠNG GAN BẰNG PARACETAMOL.	54

4.2.1.Đánh giá mô hình gây độc gan bằng Paracetamol	54
4.2.2.Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang Gydenphy	56
KẾT LUẬN	64
KIẾN NGHỊ	65
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

BẢNG DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ALT:	Alanine aminotransferase
AMP:	Adenosin monophosphat
AMPK:	Activated protein kinase
AST:	Apartate aminotransferase
CCl4:	Tetraclorua carbon
ĐVTN:	Động vật thí nghiệm gặm nhấm và không gặm nhấm.
GSH:	Glutathione.
HCC:	Hepatocellular carcinoma (Ung thư gan)
MDA:	Malondialdehyde
NAPQI:	N-acetyl para-benzoquinonimin.
ROS:	Reactive oxygen species
TBA:	Acid thiobarbituric.
TCA:	Acid tricloacetic.
VGVR:	Viêm gan virus
YHCT:	Y học cổ truyền
YHHĐ:	Y học hiện đại

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Vai trò của stress oxy hóa đối với tổn thương gan	5
Hình 1.2. Hệ thống cân bằng oxy hóa khử ở gan.....	6
Hình 1.3. Quả Me rừng	17
Hình 1.4. Giáo cổ lam	18
Hình 1.5. Thạch học tía.....	19
Hình 2.1. Kim đầu tù cho chuột uống thuốc	27
Hình 3.1. Ảnh hưởng của viên nang Gydenphy đến hình ảnh đại thể Gan chuột	48
Hình 3.2. Hình ảnh vi thể gan chuột đại diện ở các lô nghiên cứu.....	50

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Một số hoá chất thường gây tổn thương gan trên thực nghiệm	23
Bảng 2.2. Thành phần viên nang Gydenphy	25
Bảng 3.1. Kết quả đánh giá số chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau uống Gydenphy.	35
Bảng 3.2. Hoạt độ enzym AST ở các lô nghiên cứu.....	37
Bảng 3.3. Hoạt độ enzym ALT ở các lô nghiên cứu	39
Bảng 3.4. Trọng lượng gan tương đối của chuột ở các lô nghiên cứu.....	41
Bảng 3.5. Hàm lượng malondialdehyde (MDA) gan chuột ở các lô nghiên cứu.	43
Bảng 3.6. Hàm lượng glutathion (GSH) gan chuột ở các lô nghiên cứu.....	45
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hình ảnh đại thể gan chuột	47
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hình ảnh vi thể gan chuột	49

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh gan đang ngày một gia tăng và là gánh nặng bệnh tật lớn ở nhiều quốc gia trên thế giới [1]. Nhiều nguyên nhân được biết đến có thể gây tổn thương gan, bao gồm nhiễm virus viêm gan, nhiễm HIV, gan nhiễm mỡ do chế độ ăn giàu chất béo, sử dụng rượu quá mức, rối loạn tự miễn, rối loạn lipid máu, nhiễm nấm, phơi nhiễm các chất hóa học và các loại thuốc gây độc gan... [2]. Ở Việt Nam, theo số liệu mới nhất của WHO được công bố năm 2018 Tử vong do bệnh gan chiếm 17.934 người, tương đương 3,51% tổng số ca tử vong. Tỷ suất chết được điều chỉnh là 18,52 tuổi trên 100.000 dân số Việt Nam xếp thứ 84 trên thế giới [3]. Trong đó thường gặp nhất là viêm gan do virus (VGV), sau đó là các nguyên nhân phổ biến khác như viêm gan do nhiễm độc thuốc hoặc hóa chất, do rượu, do chế độ ăn... [4]. Để điều trị viêm gan, chỉ một số trường hợp dùng được thuốc đặc trị theo nguyên nhân, còn đa số các trường hợp, việc sử dụng các thuốc làm tăng cường khả năng hồi phục và bảo vệ tế bào gan [5]. Hiện nay, trong số các phương pháp điều trị các bệnh về gan, nghiên cứu và phát triển thuốc mới có nguồn gốc dược liệu là hướng tiếp cận có tiềm năng và thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Nhiều dược liệu và hoạt chất chiết xuất từ dược liệu được báo cáo có hiệu quả tốt trong điều trị viêm gan do nhiều nguyên nhân khác nhau [6] [7] [8]. Các nghiên cứu về phát triển thuốc từ dược liệu có tác dụng bảo vệ gan ngày càng được quan tâm nghiên cứu.

Y học cổ truyền có nhiều cây thuốc quý để điều trị bệnh gan, như Cây Kế sữa, Ngũ vị tử, Quả me rừng, Cà gai leo, Giảm cỏ lam, Thạch học,... Dịch chiết quả me rừng đã được chứng minh có tác dụng hạ men gan, phục hồi gan bị tổn thương [9]. Giảm cỏ lam chứa các hợp chất flavonoid, được chứng minh có tác dụng ức chế viêm tốt, có tác dụng bảo vệ gan, lợi mật, hạ

cholesterol [10]. Thạch học tía là dược liệu quý, có nhiều tác dụng tốt, trong đó tác dụng bảo vệ gan của các polysaccharides chiết xuất từ thạch học đã được nhiều nghiên cứu chứng minh [11].

Tỉnh Cao Bằng có lợi thế về khí hậu, thổ nhưỡng với nhiều dược liệu quý, được chứng minh giàu hoạt chất. Thạch học tía, giao cổ lam, quả me rừng ở Cao Bằng đã được một số tác giả báo cáo có hàm lượng hoạt chất cao, có giá trị trong làm dược liệu điều trị bệnh. Việc tạo ra một sản phẩm từ dược liệu địa phương có tính hiệu quả và an toàn trong điều trị bệnh sẽ góp phần phát triển nền y học bản địa, đồng thời tạo đà cho sự phát triển dược liệu và kinh tế địa phương. Viên nang Gydenphy được bào chế tại Học viện Quân y từ 3 dược liệu thu hái ở Cao Bằng là giao cổ lam, quả me rừng, thạch học tía, hứa hẹn là sản phẩm tốt được bào chế từ dược liệu địa phương. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đề tài ***“Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang Gydenphy trên động vật thực nghiệm”*** với hai mục tiêu:

1. Đánh giá độc tính cấp của viên nang Gydenphy.
2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang Gydenphy trên chuột nhắt trắng gây tổn thương gan bằng paracetamol.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

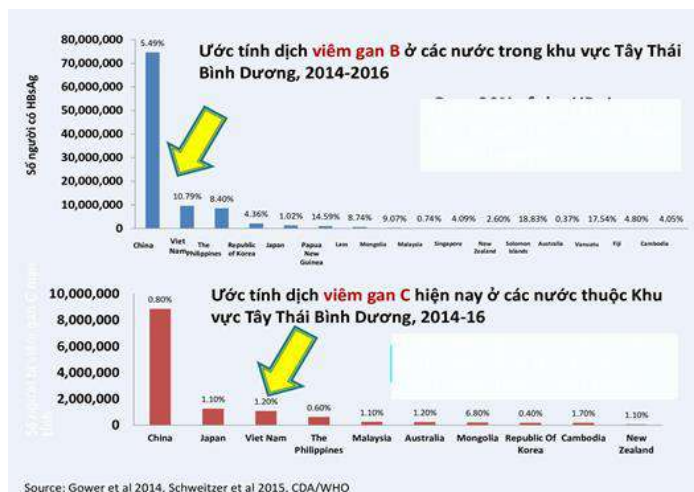
1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH VIÊM GAN THEO YHHĐ

1.1.1. Tình hình dịch tễ

Bệnh gan đang ngày một gia tăng và là gánh nặng bệnh tật lớn ở nhiều quốc gia trên thế giới [1]. Nhiều nguyên nhân được biết đến có thể gây tổn thương gan, bao gồm nhiễm virus viêm gan, nhiễm HIV, gan nhiễm mỡ do chế độ ăn giàu chất béo, sử dụng rượu quá mức, rối loạn tự miễn, rối loạn lipid máu, nhiễm nấm, phơi nhiễm các chất hóa học và các loại thuốc gây độc gan... [2].

Tổn thương gan gây tình trạng mệt mỏi nhiều, lâu dần tiến triển thành viêm gan mạn, xơ gan, ung thư tế bào gan. Trường hợp viêm gan được ước tính khoảng 1,5 tỷ người trên toàn thế giới. Nguyên nhân phổ biến nhất của bệnh phổ biến là bệnh gan nhiễm mỡ (NAFLD) chiếm 59%, tiếp theo là viêm gan B (HBV) chiếm 29%, viêm gan C (HCV) chiếm 9%, và Bệnh gan do rượu (ALD) chiếm 2%. Tuy nhiên, NAFLD và ALD dự kiến sẽ tăng do hầu hết thế giới đang trải qua tỷ lệ béo phì ngày càng tăng và nhiều khu vực đang có mức tiêu thụ rượu ngày càng tăng. Gánh nặng của HBV rất có thể sẽ giảm xuống khi mức độ bao phủ tiêm chủng ở trẻ em nhiều hơn [12].

Ở Việt Nam, theo số liệu mới nhất của WHO được công bố năm 2018 tử vong do bệnh gan chiếm 17.934 người, tương đương 3,51% tổng số ca tử vong. Tỷ suất chết được điều chỉnh là 18,52 tuổi trên 100.000 dân số Việt Nam xếp thứ 84 trên thế giới [3]. Ở khu vực Tây Thái Bình Dương 2014 – 2016 tỉ lệ viêm gan do virus viêm gan B ở Việt Nam chiếm 10,79% đứng thứ 2 sau Trung Quốc, Viêm gan C chiếm 1,2% đứng thứ 3 sau Trung Quốc và Nhật Bản. Bên cạnh đó, viêm gan do nhiễm độc thuốc hoặc hóa chất cũng ngày càng gia tăng [13]. (trang bên)



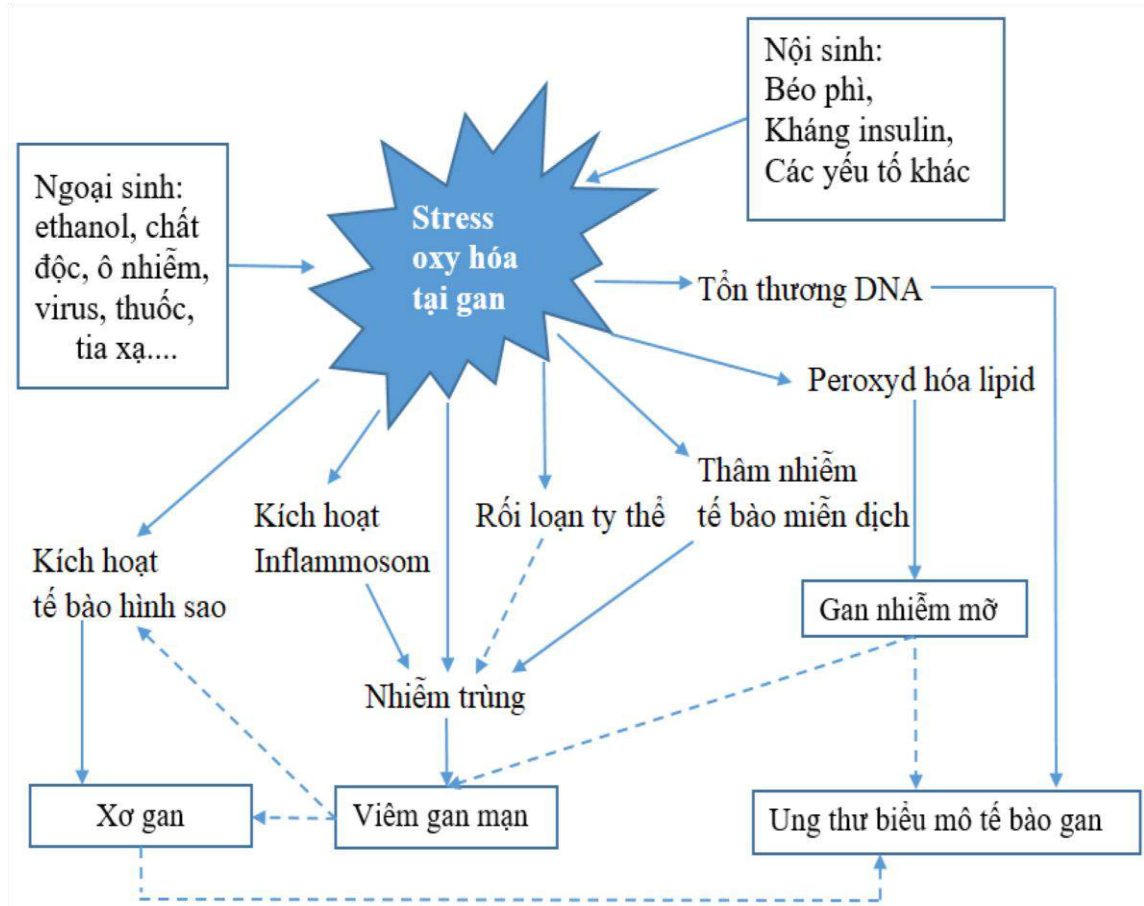
Biểu đồ 1.1. Ước tính dịch viêm gan ở các nước Tây Thái Bình Dương

1.1.2. Vai trò của stress oxy hóa và các gốc tự do đối với tổn thương tế bào gan

Gốc tự do (Reactive oxygen species – ROS) được định nghĩa là bất kỳ tiểu phân hóa học nào có khả năng tồn tại độc lập có chứa một electron chưa ghép cặp trong obitan nguyên tử. Gốc tự do có xu hướng mất điện tử để trở thành chất khử hoặc nhận điện tử để trở thành chất oxy hóa [14]. Nên Stress oxy hóa là thuật ngữ dùng để mô tả tình trạng mất cân bằng nghiêm trọng giữa sự phát sinh gốc tự do và chất chống oxy hóa bảo vệ trong cơ thể, có thể gây ảnh hưởng các loại phân tử bao gồm cả lipid, protein và acid nucleic, dẫn đến cơ chế tự chết hay hoại tử tế bào [15].

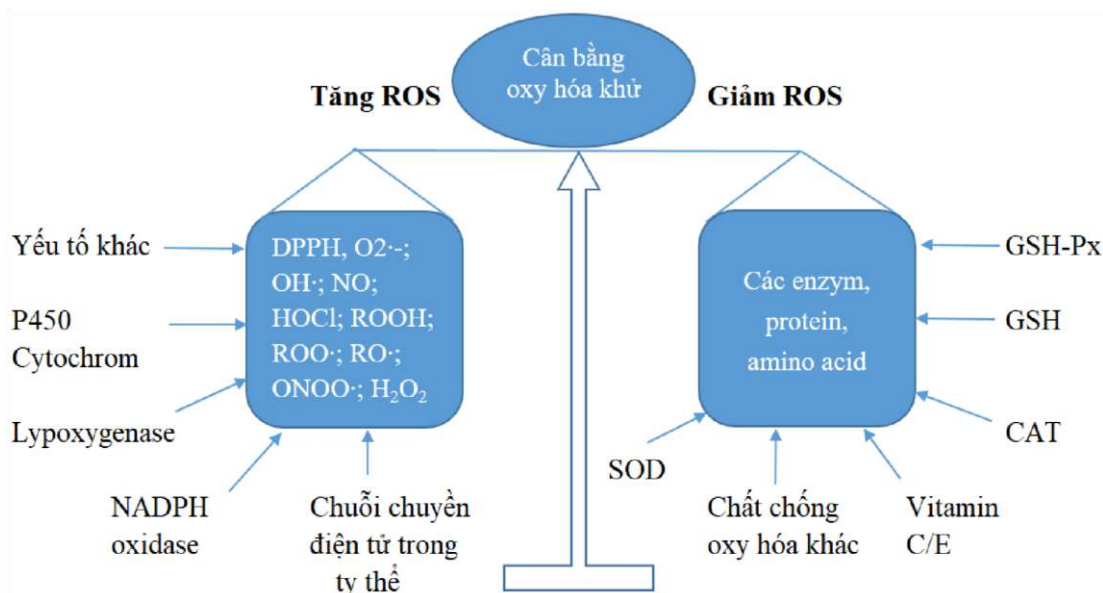
Gan là một cơ quan bị tổn thương nghiêm trọng bởi các ROS [16]. Khi ROS quá tải, hệ thống cân bằng bị phá vỡ, xảy ra stress oxy hóa gây nên tổn thương tế bào gan và những rối loạn mãn tính kèm theo [17]. Stress oxy hóa không chỉ gây kích hoạt tế bào Kuffer, tế bào hình sao, phá hủy không hồi phục các lipid, protein và DNA mà còn ảnh hưởng đến những chức năng khác bao gồm dẫn truyền gen, chu trình tự chết của tế bào, hệ thống miễn dịch... Những cơ chế này liên quan đến các bệnh gan khác nhau như bệnh gan do rượu, viêm gan virus mạn tính, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu... [18]. Ngoài ra, cơ chế liên quan các bệnh lý về gan còn được cho rằng do sự kết

hợp của các yếu tố nguy cơ gây bệnh, nhiễm trùng, hệ thống miễn dịch, quá tải các gốc tự do. Cơ chế stress oxy hóa gây tổn thương tế bào gan được thể hiện trong hình 1.1. [19].



Hình 1.1. Vai trò của stress oxy hóa đối với tổn thương gan

Hệ thống chống oxy hóa trong cơ thể bao gồm những chất có bản chất là enzym và cả những chất không có bản chất là enzym. Cả hai loại enzym này đều cần thiết cho khả năng chống oxy hóa khi cơ thể gặp bệnh lý. Tình trạng cân bằng hệ thống oxy hóa khử ở gan được thể hiện ở hình 1.2 [19] (trang bên).



Hình 1.2. Hệ thống cân bằng oxy hóa khử ở gan

1.2. TỔNG QUAN VỀ BỆNH VIÊM GAN THEO YHCT

1.2.1. Bệnh danh

Hoàng đản

1.2.2. Khái niệm

Hoàng đản là chứng bệnh do cơ thể cảm thụ phải thấp nhiệt dịch độc, can đờm khí cơ trở trệ, sơ tiết thất thường làm dịch mật thấm ra ngoài gây nên.

Chứng hoàng đản bao gồm: Dương hoàng, âm hoàng, cấp hoàng, hư hoàng. Trên lâm sàng, hoàng đản có thể gặp kèm trong các chứng khác của YHCT như: Hiệp thống, đờm trướng, cổ trướng, can ái,... [20].

Y học cổ truyền Trung Quốc, để lại vô số bài thuốc điều trị chứng Hoàng đản. Dựa trên tài liệu phân loại các bệnh án quan trọng liên quan đến bệnh Hoàng đản và điều trị bệnh hoàng đản, thu thập 160 đơn thuốc chia làm ba thời kỳ: Hán và triều đại nhà Đường, thời Tống Kim Nguyên, triều đại nhà Minh và nhà Thanh, Trong đó có tổng 163 loại thuốc có liên quan, tuy được sử dụng rộng rãi nhưng số lượng thuốc được sử dụng tương đối tập trung bao gồm vị thuốc thanh nhiệt đứng đầu, tiếp đến là vị thuốc thanh nhiệt trừ thấp nhiệt, trừ

đàm, ích khí bổ huyết, ... Phân định hội chứng và điều trị phản ánh đặc điểm của các đơn thuốc khác nhau [21].

1.2.3. Triệu chứng đặc trưng

Triệu chứng đặc trưng: Vàng mắt, vàng da toàn thân, nước tiểu sẫm màu. Sự thịnh suy của chính khí và tà khí được đánh giá thông qua mức độ sáng tối của da và niêm mạc, thời gian bệnh dài hay ngắn.

Dương hoàng: Sắc vàng tươi, phát sốt, miệng khát, rêu lưỡi vàng, bản nhóp. (Chứng thấp nhiệt) [22]

Âm hoàng: Sắc vàng tối, sạm hoặc như ám khói, kèm theo bệnh mệt mỏi, sợ lạnh, rêu lưỡi trắng, bản, nhóp, mạch nhu hoãn (Chứng hàn thấp) [23]

Cấp hoàng: Sắc vàng rực, kèm sốt cao, khát nước, hôn mê, rối loạn ngôn ngữ (Chứng thấp nhiệt nội độc, nhiệt hãm tâm doanh) [24]

Hư hoàng: Da và củng mạc mắt vàng, sắc vàng tương đối nhạt mà không tươi sáng, ăn kém, mệt mỏi, hồi hộp, trống ngực, huyệt hơi, bụng đầy trướng, đại tiện lỏng, chất lưỡi nhạt, rêu lưỡi mỏng, mạch nhu vi hoặc tế nhược [25]

1.2.4. Nguyên nhân

Cảm thụ phải Dịch độc: Dịch độc từ miệng xâm phạm vào cơ thể, uất kết ở trung tiêu làm tỳ vị vận hóa thất thường, thấp nhiệt hun đốt can đởm làm mất chức năng sơ tiết, dịch mật không vận hành bình thường trong đường mật xâm nhập ra ngoài cơ biểu, đưa xuống bàng quang gây nên triệu chứng: Da và niêm mạc vàng, nước tiểu vàng. Nếu dịch độc nặng thì bệnh diễn biến nhanh và nguy hiểm, phức tạp, có tính chất truyền nhiễm, biểu hiện lâm sàng râm rộ của chứng nhiệt độc tích thịnh, tổn thương doanh huyết (gọi là cấp hoàng).

Tổn thương do ăn uống: Ăn uống không điều độ, no đói thất thường, hoặc nghiện rượu đều gây tổn thương tỳ vị, rối loạn chức năng vận hóa làm cho thấp trọc nội sinh, uất kết mà hóa nhiệt, hun đốt can đởm, dịch mật thoát ra ngoài, xâm nhập vào cơ phu sinh ra chứng hoàng đản.

Tỳ vị hư nhược: Cơ thể vốn dĩ tỳ vị hư nhược, rối loạn chức năng vận hóa, khí huyết hao tổn, lâu ngày làm can mất sự nuôi dưỡng, rối loạn chức năng sơ tiết gây nên thoát dịch mật ra ngoài. Tỳ vị tổn thương làm mặt và mắt vàng, sắc ám vàng không rõ. Hoặc sau khi mắc bệnh làm tổn thương tỳ dương, thấp theo hàn hóa hàn thấp trở trệ trung tiêu, dịch mật trở trệ, ứ ở cơ phủ gây nên hoàng đản.

Vì vậy, viêm gan cấp tính điều trị không triệt để hoặc không điều trị, bệnh tà lưu lại ở cơ thể, thấp nhiệt tích tụ ở can tỳ hoặc trung tiêu, khi cơ uất trệ, tạng phủ hư tổn, khí - huyết bất túc nặng hơn, khí trệ huyết ứ, trung hà tích tụ, huyết ứ thủy đình dẫn đến cổ trướng.

1.2.5. Cơ chế bệnh sinh

Chứng hoàng đản chủ yếu là thấp trọc trở trệ, dịch mật không tuần hành bình thường trong đường mật mà thấm tiết ra nơi khác. Nguyên nhân chính là thấp trung nhiệt uất.

Ngoại nhân: Ngoại tà không điều tiết là yếu tố trọng yếu dẫn đến hoàng đản.

Nội nhân: Thấp tà uất kết trung tiêu, trở trệ khí cơ làm cho can khí uất kết làm mất chức năng sơ tiết, dịch mật không được vận chuyển bình thường nên thoát ra ngoài.

Vì thế, dù nguyên nhân là nội nhân hay ngoại nhân thì đều là do ứ trệ không được giải trừ, nội kết không được tiêu tán gây nên.

Thuộc tính bệnh lý của chứng hoàng đản có quan hệ mật thiết với sự thịnh hay suy dương khí của tỳ vị. *Thể Dương hoàng* là do trung tiêu thiên thịnh, thấp theo nhiệt hóa, thấp nhiệt là chính. *Thể âm hoàng* là do trung dương bất túc, thấp theo hàn hóa, hàn thấp là chính. *Cấp hoàng* là do thấp trọc dịch độc gây nên. Tính chất bệnh của chứng hoàng đản có quan hệ mật thiết với trung dương thiên thịnh hay thiên suy. Nếu sớm trừ được bệnh tà, điều chỉnh chức năng tỳ vị thì bệnh tình sẽ không kéo dài. Nếu không khống chế được độc tà,

sức đề kháng cơ thể giảm, điều trị không thích đáng sẽ làm cho bệnh tiến triển. Âm hoàng lâu ngày làm cho chính khí hư tổn, tà khí chuyển biến gây nên chứng tích tụ, cổ trướng.

1.2.6. Biện chứng luận trị

1.2.6.1. Biện luận âm hoàng, dương hoàng, cấp hoàng, hư hoàng

- Dương hoàng: do thấp nhiệt gây nên, khởi bệnh cấp, bệnh diễn biến thời - gian ngắn, sắc da vàng tươi sáng như vỏ cam, miệng khô và khát, phát sốt, tiểu tiện số lượng ít, nước tiểu sắc đỏ sẫm, đại tiện táo bón, rêu lưỡi vàng nhớt, mạch huyền sắc. Nói chung, thể dương hoàng có tiên lượng tốt.

- Âm hoàng: do tỳ vị hư hàn, hàn thấp nội trệ hoặc do can uất huyết ú gây nên, khởi bệnh chậm, diễn biến bệnh kéo dài, sắc da tuy vàng nhưng ám tối như khói, bụng căng trướng, sợ lạnh, tinh thần uể oải, hụt hơi, mệt mỏi, miệng nhạt không khát, chất lưỡi nhạt, rêu lưỡi trắng nhớt, mạch nhu hoãn hoặc trầm trì; hoặc chất lưỡi ám tím, có ban ứ huyết, mạch huyền sáp. Âm hoàng kéo dài là bệnh khó chữa trên lâm sàng. Cấp hoàng: do dịch độc gây nên, nhiệt độc tích thịnh, doanh huyết hao thương, Hoàng khởi bệnh cấp, sắc da vàng tươi, kèm theo lơ mơ, rối loạn ngôn ngữ, sốt cao, khát nước, chất lưỡi hồng bóng, mạch huyền tề sắc hoặc hồng đại.

- Hư hoàng: do huyết bại không nuôi dưỡng hóa sinh được gây sắc da toàn thân vàng nhưng nhạt màu, kèm theo hồi hộp, trống ngực, hụt hơi, mệt mỏi, đau đầu, chóng mặt, chất lưỡi nhợt, mạch tề nhược.

1.2.6.2. Mức độ thấp nhiệt trong dương hoàng

- Dương hoàng thuộc thấp nhiệt. Do cơ thể nhiễm phải nhiệt tà và thấp tà ở các mức độ khác nhau, sức phản ứng của cơ thể cũng khác nhau, cho nên trên lâm sàng phải phân biệt được mức độ của thấp và nhiệt.

- Nếu nhiệt nặng hơn thấp: toàn thân và mắt đều vàng, sắc vàng tươi sáng, phát sốt, khát nước, buồn nôn và nôn, tiểu tiện số lượng ít, nước tiểu màu vàng sẫm, đại tiện táo, rêu lưỡi vàng nhớt, mạch huyền sắc.

- Nếu thấp nặng hơn nhiệt: toàn thân và mắt đều vàng, sắc vàng không tươi sáng như nhiệt chứng, đầu cảm giác nặng nề, bụng ngực đầy và tức, buồn nôn và nôn, đại tiện lỏng, rêu lưỡi dày hơi vàng nhiều, mạch huyền hoạt.

1.2.7. Nguyên tắc điều trị

Thời kỳ đầu của hoàng đản nguyên nhân là do thấp nhiệt, dịch độc, hàn thấp gây nên bệnh thuộc thực chứng. Khi điều trị nên dùng pháp công trực tà khí để trừ nguyên nhân bệnh, căn cứ vào đặc tính của nguyên nhân gây bệnh mà áp dụng các nguyên tắc khác nhau.

- + Nếu là dương hoàng thì pháp điều trị là thanh nhiệt lợi thấp, thông lợi nhị tiện.
- + Nếu là cấp hoàng thì pháp điều trị là thanh nhiệt giải độc lương huyết, kết hợp các pháp điều trị triệu chứng như công hạ, khai khiêu.
- + Nếu do âm hoàng thì pháp điều trị là ôn hóa hàn thấp hoặc hóa ú thoái hoàng.
- + Nếu do hư hoàng thì pháp điều trị là kiện tỳ sinh huyết nhu can.

Hoàng đản giai đoạn sau thì pháp điều trị là kiện tỳ nhu can, hoạt huyết hóa ú để phòng biến chứng tích tụ, cổ trướng.

Do thấp tà uất trệ ở trung tiêu và hạ tiêu nên đường tiêu trừ tà khí phải thông qua đường tiểu tiện. Trừ thấp, lợi tiểu là phương pháp trọng yếu trong điều trị hoàng đản. Thấp là âm tà, tính dính nhớt, dễ làm hao thương dương khí của tạng phủ. Nhiệt là dương tà, tính táo cấp, hun đốt âm dịch của tạng phủ. Vì vậy, khi điều trị bệnh trầm trọng thì nên lưu ý pháp thanh nhiệt hộ âm, nếu lạm dụng pháp lợi thấp thái quá sẽ gây tổn thương âm dịch và làm cho nhiệt càng thêm nặng.

Nếu do thấp tà trầm trọng thì nên chú ý hóa thấp hộ dương, nếu dùng các vị thuốc có tính vị quá đắng lạnh sẽ ảnh hưởng đến dương khí nên không hóa được thấp. Điều chỉnh chức năng can tỳ (tức là sơ can kiện tỳ, hoạt huyết

hóa ú) để cải thiện can uất tỳ ủng trệ, huyết ú trệ lạc, phòng ngừa chuyển biến thành tích tụ và cổ trướng.

1.2.8. Các thể bệnh

1.2.8.1. Dương hoàng

- **Nhiệt nặng hơn thấp**

+ **Lâm sàng:** Cung mạc mắt vàng, sau đó da toàn thân vàng với tốc độ rất nhanh, sắc vàng tươi, phát sốt, khát nước, buồn nôn và nôn, ăn uống kém, nước tiểu vàng sẫm số lượng ít, đại tiện táo, đau tức ngực sườn, cự án, chất lưỡi hồng, rêu lưỡi vàng nhớt, mạch huyền sắc hoặc hoạt sắc.

+ **Pháp điều trị:** Thanh nhiệt lợi thấp, thông phủ.

+ **Bài thuốc:** **Nhân trần cao thang**

Nhân trần 12g; Chi tử 12g; Đại hoàng 05g

Các vị thuốc trên sắc uống, ngày 01 thang.

Nghiên cứu ứng dụng Nước sắc nhân trần cao thang có công dụng thanh nhiệt trừ ẩm. Tuân theo nguyên tắc chỉ định của Trung y và công dụng, chỉ định của Thuốc sắc Nhân trần cao thang, đã được dùng trong điều trị lâm sàng các bệnh và đạt kết quả tốt [26].

- **Thấp nặng hơn nhiệt**

+ **Lâm sàng:** da và niêm mạc mắt vàng như màu vỏ cam, không sốt, đầu nặng thích ngồi hơn nằm, ngực bụng căng tức, ăn ít, buồn nôn, sợ ăn đồ béo, miệng dính nhớt, không khát nước, tiểu tiện số lượng ít, đại tiện lỏng nát, rêu lưỡi dày nhiều và hơi vàng, mạch nhu hoãn hoặc huyền hoạt.

+ **Pháp điều trị:** trừ thấp hóa trọc, tiết nhiệt trừ hoàng.

+ **Bài thuốc:** **Nhân trần Ngũ linh tán gia giảm** hoặc **Cam lộ tiêu độc đan.**

Nhân trần Ngũ linh thang: Nhân trần 12g; Trạch tả 20g; Trư linh 12g; Bạch linh 10g; Quế chi 12g; Bạch truật 20g.

Bài thuốc trên sắc uống, ngày 01 thang.

+ Bài Cam lộ tiêu độc đan: Hoạt thạch 450g; Thạch xương bò 180g; Xạ can 120g; Bạch đậu khấu 120g; Nhân trần 350g; Bối mẫu 150g; Liên kiều 120g; Mộc thông 120g; Hoàng cầm 300g; Hoắc hương 120g; Bạc hà 120g.

Các vị thuốc trên tán nhỏ làm viên, mỗi lần uống 09g, ngày 02 lần. Hoặc cán đôi liều để sắc uống, ngày 01 thang.

1.2.8.2. Cấp hoàng

- *Lâm sàng*: khởi bệnh cấp, vàng da tốc độ nhanh, da và củng mạc mắt vàng đậm, phát sốt, khát nước, nôn nhiều, tiểu tiện ít, đại tiện táo, bụng đầy trướng và đau, cự án, bứt rứt không yên (mê man, rối loạn ngôn ngữ hoặc chảy máu cam, đái ra máu, phát ban ở chi dưới) hoặc cổ trướng, hôn mê, chất lưỡi hồng giáng, rêu lưỡi vàng khô táo, mạch huyền sắc hoặc huyền tế.

- Pháp điều trị: thanh nhiệt giải độc, lương huyết khai khiếu.

- Bài thuốc: **Tê giác tán** (Thái bình thánh huệ phương).

Tê giác 22,5g; Linh dương giác 22,5g; Long đởm thảo 15g; Chi tử 22,5g; Thăng ma 22,5g; Cam thảo chích 15g; Hoàng cầm 22,5g; Sài hồ 30g.

Các vị thuốc trên tán nhỏ, mỗi lần dùng 09g sắc uống (có thể thay tê giác bằng thủy ngư giác 30g). Hiện nay, người ta vận dụng cân đối liều và gia huyền sâm 12g, sinh địa 12g, thạch hộc 12g, đan bì 12g để sắc uống, ngày 01 thang.

Chú ý: Phải phối hợp với YHHĐ để điều trị.

1.2.8.3. Âm hoàng

- *Hàn thấp ú trệ*

+ *Lâm sàng*: da và niêm mạc mắt vàng, sắc vàng ám tối không tươi nhuận (ám khói), bụng đầy trướng, ăn ít, uể oải, sợ lạnh, đại tiện lỏng, nhạt miệng, không khát nước, chất lưỡi nhạt, rêu lưỡi trắng nhờn, mạch nhu hoãn hoặc trầm trì.

+ *Pháp điều trị*: Ôn trung hóa thấp, kiện tỳ hòa vị.

+ **Bài thuốc: Nhân trần truật phụ thang.**

Nhân trần 12g; Bạch truật 15g; Phụ tử 06g; Cam thảo chích 10g; Can khương 06g; Quế nhục 06g.

Các vị thuốc trên sắc uống, ngày 01 thang.

Bài thuốc này có tác dụng ôn hóa ngưng trệ, lợi thấp thoái hoàng. Nhân trần để trừ thấp lợi đờm và thoái hoàng. Phụ tử, can khương, quế nhục để ôn trung tán hàn và giúp cho bạch truật, cam thảo kiện tỳ hòa vị.

Nếu ngực sườn đau thì gia trạch lan 12g, uất kim 12g, xích thược 12g.

Nếu đại tiện lỏng thì gia phục linh 12g, trạch tả 15g, xa tiên 15g.

Nếu chứng tỳ hư nặng thì gia hoàng kỳ 20g, hoài sơn 15g, ý dĩ 12g để tăng cường kiện tỳ hóa thấp.

- **Huyết ứ can uất**

+ **Lâm sàng:** da và củng mạc mắt vàng sậm, đau tức hạ sườn phải (đau âm ỉ hoặc dữ dội), gan to, sao mạch, bàn tay son, chất lưỡi tím, có ban điểm ứ huyết, rêu lưỡi ít, mạch huyền sáp hoặc tế sáp.

+ **Pháp điều trị:** hoạt huyết hóa ứ, sơ can.

+ **Bài thuốc: Miết giáp tiễn hoàn.**

Miết giáp 90g; Sài hồ 45g; Đại hoàng 22,5g; Đinh lịch tử 7,5g; Đan bì 75,5g; Bán hạ 7,5g; A giao 37,5g; Bọ hung 45g; Xạ can 22,5g; Thử phụ 22,5g; Bạch thược 37,5g; Thạch vĩ 22,5g; Cù mạch 15g; Miết trùng 37,5g; Phòng phong 30g; Đào nhân 15g; Hoàng cầm 22,5g; Can khương 22,5g; Quế chi 22,5g; Hậu phác 22,5g; Tử uy 22,5g; Nhân sâm 7,5g; Xích tiêu 90g.

Các vị thuốc trên tán nhỏ hoàn với mật ong làm viên, mỗi lần dùng 03 - 06g.

1.2.8.4. Chứng Tỳ hư (hư hoàng)

- **Lâm sàng:** Da và củng mạc mắt vàng, sắc vàng tương đối nhạt mà không tươi sáng, ăn kém, mệt mỏi, hồi hộp, trống ngực, huyệt hơi, bụng đầy trướng, đại. tiện lỏng, chất lưỡi nhạt, rêu lưỡi mỏng, mạch nhu vi.

– *Pháp điều trị*: bổ dưỡng khí huyết, kiện tỳ nhu can.

– *Bài thuốc*: **Tiểu kiến trung thang**.

Xích thực 20g; Quế chi 10g; Sinh khương 10g; Đại táo 04 quả; Cam thảo chích 10g; Di đường 30g.

Các vị thuốc trên sắc uống, ngày 01 thang.

1.2.8.5. Một số nghiên cứu ứng dụng YHCT điều trị viêm gan trên lâm sàng

Y học cổ truyền có nhiều cây thuốc, bài thuốc quý để điều trị bệnh gan, thúc đẩy sự hồi phục của tế bào gan, cải thiện chức năng gan, chống xơ hoá tế bào gan như: Cây ké sỡ, Cà gai leo, Hà thủ ô, Giảo cổ lam,... Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh được tác dụng của chúng trong điều trị các bệnh gan như:

Nghiên cứu tác dụng bảo vệ của Thạch học tía trên mô hình động vật bị tổn thương gan kết luận Nước ép tươi Thạch học tía có tác dụng bảo vệ gan [27]

Tại Trung Quốc, Nghiên cứu điều trị xơ gan sau sốt bằng Viên nang “Phù chính hoá ứ” (Thành phần gồm: Giảo cổ lam, bột đông trùng hạ thảo lên men, đào nhân, thông phấn, ngũ vị tử) để điều trị xơ gan kết luận sau 6 tháng điều trị thuốc có hiệu quả và an toàn để điều trị xơ gan vì nó có liên quan đến cải thiện chức năng gan, xơ hóa gan, đông máu, giảm tình trạng tăng áp lực tĩnh mạch cửa, tỷ lệ sống thêm 2 năm cao hơn [28]

Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của bài thuốc “Nhân trần cao thang” đạt hiệu quả trong việc thúc đẩy lợi mật và giảm vàng da, chống tổn thương gan do hóa chất, tổn thương gan do miễn dịch, tổn thương gan do nhiễm độc nội tiết cấp tính, chống tổn thương gan nhiễm mỡ và chống xơ hóa gan [29].

Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của cao chiết Tiểu sài hồ thang trong điều trị bệnh lý về gan đã được chứng minh lâm sàng có tác dụng ức chế sự phát triển của viêm gan, chống xơ hóa gan, ngăn ngừa ung thư và có tác dụng bảo vệ gan do rượu [30].

Quan sát tác dụng chữa bệnh của Nhân trần truật phụ thang trong điều trị âm hoàng: có 74 bệnh nhân mắc chứng âm hoàng được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm, mỗi nhóm 37 trường hợp. Chia làm 2 nhóm điều trị, gồm 1 nhóm chứng và nhóm điều trị bằng Thuốc sắc Nhân trần truật phụ thang. Sau 1 tháng điều trị, Kết quả: Nhóm điều trị có hiệu quả rõ rệt là 24 trường hợp. Có hiệu quả điều trị là 10 trường hợp, kém hiệu quả 3 trường hợp, tổng tỷ lệ có hiệu quả là 91,89% [31].

Tại Trung Quốc, 45 trường hợp bệnh nhân Âm hoàng được chia ngẫu nhiên thành nhóm điều trị 23 trường hợp và nhóm chứng 22 trường hợp. Nhóm chứng được điều trị cơ bản và nhóm điều trị cơ bản Điều trị kết hợp đốt lửa dây rốn. Sự cải thiện các triệu chứng lâm sàng, dấu hiệu, chức năng gan của bệnh nhân trong nhóm làm giảm số ngày nằm viện, chi phí và tăng sự hài lòng của bệnh nhân. Kết quả: Nhóm điều trị tốt hơn đáng kể so với nhóm chứng [32].

Nghiên cứu ứng dụng lâm sàng của thuốc sắc Nhân trần cao thang trong điều trị chấn thương gan liên quan đến nhiễm trùng huyết tại Khoa chăm sóc sức khỏe quan trọng của Đại học Y học cổ truyền Nam Kinh trực thuộc Bệnh viện Nam Kinh Trung Quốc và Tây y tổng hợp từ tháng 1 Năm 2014 đến tháng 12 năm 2015 và được chẩn đoán nhiễm trùng huyết. 40 bệnh nhân bị tổn thương gan liên quan được chia thành nhóm điều trị thông thường và nhóm điều trị Nhân trần cao thang theo bảng số ngẫu nhiên, với 20 trường hợp trong mỗi nhóm. Nhóm đối chứng điều trị thông thường được thực hiện trong phù hợp với hướng dẫn điều trị nhiễm trùng huyết nặng và sóc nhiễm trùng năm 2012. Nhóm điều trị Nhân trần cao thang được cho ăn với Nhân trần cao thang (Nhân trần 18g, Chi tử 9g, Đại hoàng thô 9g) trên cơ sở điều trị tiêu chuẩn đạt kết quả điều trị hiệu quả và hài lòng của người bệnh [33].

- Một số liệu lâm sàng của 36 bệnh nhân dùng bài thuốc ôn dương hoạt huyết thoái hoàng thang, gồm 28 nam và 8 nữ; tuổi Người cao nhất 69 tuổi và

trẻ nhất 19 tuổi; 13 trường hợp viêm gan B mạn tính, 7 trường hợp xơ gan thể hoạt động, 5 trường hợp viêm gan mãn tính nặng, 8 trường hợp của hội chứng ú mật, 3 trường hợp vàng da thể mật [34].

- Nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang cứng CTHeptaB đã chứng minh viêm nang cứng CTHeptaB có tác dụng vào vệ gan, chống oxy hóa, chống viêm. Kết quả, Trên chuột nhất trắng gây tổn thương và hủy hoại tế bào gan bằng paracetamol, CTHeptaB liều 0,96g/kg/ ngày và 1,92g/kg/ngày có tác dụng. Tác dụng của CTHeptaB liều 0,96g/kg/ngày và 1,92g/kg/ngày có xu hướng tốt hơn so với silymarin liều 70 mg/kg (mặc dù chưa đạt ý nghĩa thống kê) [35].

- Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết chùm ngây (*Moringa oleifera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng carbon tetrachloride (CCl₄). Kết quả, Dịch chiết chùm ngây ở liều 0,5 ml/kg khối lượng cơ thể/ngày có tác dụng bảo vệ gan thông qua việc làm giảm nồng độ AST, ALT, LDH, MDA và hạn chế tổn thương gan gây ra bởi CCl₄ trên mô hình chuột nhất trắng dòng BALB/c. Ngoài ra, trong nghiên cứu này, các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy dịch chiết chùm ngây ở liều 0,5 ml/kg khối lượng cơ thể/ngày có tác dụng bảo vệ gan tương đương so với đối chứng tham khảo là silymarin (liều 50 mg/kg khối lượng cơ thể/ngày). Kết quả này đã mở ra tiềm năng ứng dụng của cây chùm ngây trong việc bảo vệ và phục hồi chức năng gan trước các tác nhân gây oxy hóa mạnh [36].

- Tác dụng bảo vệ gan của viên nang đinh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) harms) trên mô hình gây tổn thương gan mạn tính bằng ethanol. Nghiên cứu đã chứng minh chế phẩm viên nang Đinh lăng có tác dụng làm giảm hoạt độ AST và ALT, giảm hàm lượng MDA và phục hồi glutathion nội sinh trên mô hình gây tổn thương gan dài ngày bằng rượu [37].

1.3. TỔNG QUAN VỀ CÁC DƯỢC LIỆU DÙNG CHO BÀO CHẾ VIÊN NANG GYDENPHY

1.3.1. Quả Me rừng

- *Tên gọi khác*: chùm ruột núi, mận rừng, mắc kham, mạy kham (Tày)...

- *Tên khoa học*: Phyllanthi Fructus là quả của cây *Phyllanthus emblica* L. Họ Thầu dầu (Euphorbiaceae).



Hình 1.3. Quả Me rừng

- *Tính vị quy kinh*: Vị chua ngọt, đắng, tính mát.
- *Công năng*: Nhuận phế hóa đờm sinh tân.
- *Tác dụng dược lý*

Tác dụng bảo vệ tế bào gan: Quả Me rừng có nhiều thành phần hóa học như tannin, vitamin C, acid gallic, các flavonoid...là những hoạt chất có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan [38]. Một số nghiên cứu đã công bố về tác dụng bảo vệ tế bào gan của quả me rừng do Ethanol gây ra (2017) [39], làm giảm men gan, chống oxy hoá trên chuột gây nhiễm mỡ gan (2017) [40], trên chuột gây độc gan bằng CCl₄, bằng paracetamol [41],...Ngoài ra, quả me rừng còn có nhiều tác dụng quý khác như hạ lipid máu, hạ glucose máu, hạn chế phát triển tế bào ung thư, kháng khuẩn, kháng virus...

1.3.2. Giảo cổ lam



Hình 1.4. Giảo cổ lam

- *Tên gọi khác:* Cam Trà vạn, Thất diệp đởm, cây trường sinh, Ngũ diệp sâm.
- *Tên khoa học:* *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb). Makino họ Bầu bí (Cucurbitaceae)
- *Tính vị và công năng:* Vị đắng, tính bình, cường dương, bổ âm.
- *Tác dụng dược lý*

Tác dụng bảo vệ gan:

Trong thành phần Cây giảo cổ lam chứa các hợp chất flavonoid và saponin có tác dụng chống viêm, chống oxy hoá, bảo vệ gan tốt. Trên chuột nhắt trắng gây độc gan bằng paracetamol, phân đoạn chiết saponin của giảo cổ lam liều 200 mg/kg và 600 mg/kg thể trọng chuột có tác dụng hạn chế tổn thương gan thông qua làm hạn chế tăng trọng lượng gan tương đối và hoạt độ AST, ALT, làm giảm nồng độ MDA trong dịch đồng thể gan, hạn chế được tổn thương gan trên giải phẫu vi thể gan, tương đương với Sylimarin liều 70 mg/kg thể trọng chuột [42]. Tác dụng chống oxy hoá bảo vệ tế bào gan khỏi tác hại của tetrachloruacarbon (CCl₄) và rượu ethanol được thể hiện rõ qua chỉ số AST và ALT giảm rõ rệt sau khi dùng thuốc [43], [44].

Ngoài ra giảo cổ lam còn được chứng minh có nhiều tác dụng nổi bật khác như chống viêm, chống oxy hoá, hạ glucose máu, hạ lipid máu,...

1.3.3. Thạch học tía



Hình 1.5. Thạch học tía

- *Tên gọi khác:* kim thoa thạch học, thiết bì thạch học, hắc tiết thảo, hoàng thảo.
- *Tên khoa học:* *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. Họ Lan (Orchidaceae)
- *Tính vị, quy kinh và công năng:* vị ngọt nhạt, tính hơi lạnh, đi vào 3 kinh phế, vị, thận có tác dụng ôn thận, trợ dương, sinh tân dịch, bồi bổ khí huyết.
- *Tác dụng dược lý*

Nghiên cứu hoạt động chống oxy hóa và sự ổn định của các thành phần màu hoa trong Thạch học đã chỉ ra Các ion kim loại Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} Làm tăng độ hấp thụ chiết xuất và màu sắc từ Thạch học vì vậy thạch học tía là 1 trong số những loại thạch học nhiều hoạt chất nhất [45].

Tác dụng bảo vệ gan: Nhiều nghiên cứu đã khẳng định tác dụng bảo vệ gan, chống lại Tổn thương gan do Acetaminophen gây ra của thạch học tía, chủ yếu là của các polysaccharides chiết xuất từ thạch học tía [46] [47].

Ngoài ra, thạch học tía còn thể hiện tác dụng tốt trong hạ đường huyết giảm biến chứng thận do ĐTĐ, điều chỉnh rối loạn lipid máu [48]. Dịch chiết từ thạch học tía làm hạ đường khi thử trên chuột bị gây tăng đường trong máu bằng adrenalin và bằng streptozotocin do tác động kích thích sự bài tiết insulin từ tế bào beta, đồng thời ngăn sự bài tiết glucagon ở tế bào alpha, giảm

sự phân hủy glycogen trong cơ thể, làm tăng tổng hợp glycogen trong gan.

Các tác dụng khác của thạch học tía như tăng cường miễn dịch, chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, bảo vệ tim...cũng được báo cáo [49].

Như vậy, Theo quan điểm YHCT các vị thuốc dùng trong viên nang Gydenphy bao gồm: Giảo cổ lam có tác dụng bổ khí hoạt huyết (Thúc đẩy sự lưu thông máu và dinh dưỡng đến tế bào, tăng cường hoạt động của các cơ quan), Thạch học tía bổ âm sinh tân chỉ khát (Tăng cường chuyển hóa đạm - đường - mỡ và quá trình chuyển hóa nước ở tế bào gan), quả Me rừng thanh nhiệt sinh tân hóa đờm (Chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan). Ba vị thuốc này hỗ trợ nhau giúp hóa thấp, trừ đàm thanh nhiệt hoạt huyết, có thể hỗ trợ điều trị bệnh nhân có chứng Dương hoàng của YHCT. Trên lâm sàng thường gặp ở đối tượng có các bệnh Đái tháo đường, mỡ máu có sử dụng thuốc điều trị Hạ mỡ máu và Hạ đường huyết gây ra các biến chứng tăng men gan, suy giảm chức năng gan.

1.4. TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM.

1.4.1. Tổng quan về thử nghiệm độc tính cấp

1.4.1.1. Mục tiêu: Thử độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của thuốc, dự đoán triệu chứng và dự kiến biện pháp điều trị ngộ độc cấp; thiết lập mức liều cho những thử nghiệm độc tính và tác dụng cũng như phạm vi an toàn của thuốc nghiên cứu tiếp theo. Do vậy, các phép thử độc tính cấp cần xác định.

a) Liều an toàn;

b) Liều dung nạp tối đa;

c) Liều gây ra độc tính có thể quan sát được;

d) Liều thấp nhất có thể gây chết động vật thí nghiệm (nếu có);

e) Liều LD50 gần đúng (nếu có thể xác định được);

f) Những triệu chứng ngộ độc điển hình có thể quan sát được trên động vật và khả năng hồi phục (nếu có).

1.4.1.2. Nguyên tắc lựa chọn mô hình thử

- Tùy theo mục đích của mỗi nghiên cứu và loại mẫu thử và những thông tin sẵn có để lựa chọn mô hình thử thích hợp. Loại động vật gặm nhấm thường được sử dụng là chuột nhắt, chuột cống; loài không gặm nhấm có thể dùng là chó hoặc khỉ. Số nhóm và số lượng cho mỗi nhóm tùy theo mô hình áp dụng.

- Thử sơ bộ: thường được thực hiện trong hầu hết các mô hình thử. Dựa vào kết quả trong thử nghiệm sơ bộ để lựa chọn, bố trí thử nghiệm chính thức. Với những trường hợp thông tin cho thấy mẫu thử hoặc các chất liên quan có thể không độc hoặc ít độc, có thể thử trên một loài động vật (gặm nhấm). Đối với các chế phẩm có độc cao hoặc có yêu cầu đặc biệt về khoa học, cần thiết thử trên hai loài ĐVTN (gặm nhấm và không gặm nhấm).

- Khuyến cáo: Để bảo vệ động vật, các mô hình sử dụng số ít động vật thí nghiệm được ưu tiên lựa chọn.

1.4.1.3. Theo dõi, đánh giá.

- Theo dõi ĐVTN trong vòng 7 ngày sau khi dùng thuốc. Thời gian theo dõi có thể ngắn hơn (5 ngày) nếu thấy các biểu hiện ngộ độc đã hết, hoặc kéo dài hơn (14 ngày) nếu biểu hiện ngộ độc chưa rõ ràng hoặc cần theo dõi thêm về khả năng hồi phục. Ghi chép và mô tả bất kì triệu chứng, biểu hiện khác thường nào của ĐVTN, nếu có.

Các chỉ tiêu cần quan sát bao gồm.

- Tình trạng hoạt động, khả năng tiêu thụ thức ăn, nước uống, tình trạng phân, nước tiểu.

- Trọng lượng cơ thể: xác định trọng lượng trước khi kết thúc thí nghiệm.

- Biểu hiện độc cấp tính đặc biệt ngay sau khi dùng thuốc, những biểu hiện bất thường trên thần kinh, vận động như hành vi, cử động, đi lại, co giật, biểu hiện của các chức năng hô hấp, tuần hoàn, tiêu hóa như nhịp tim, nhịp thở, nôn mửa, phản xạ của giác quan như mất mũi, biểu hiện tình trạng chất bài tiết,... của ĐVTN. Chú ý phân biệt với các biểu hiện do tác dụng dược lý của thuốc (an thần, gây ngủ, hạ huyết áp...).

- Xác định số lượng ĐVTN có biểu hiện ngộ độc; thời gian bắt đầu thể hiện triệu chứng độc, thời gian kéo dài các triệu chứng, khả năng hồi phục.

- Số lượng ĐVTN bị chết (nếu có) thời gian chết ứng với mỗi mức liều đã thử.

- Chết tiên đoán. Những ĐVTN ở tình trạng suy kiệt, hấp hối kéo dài, không có khả năng sống sót (ĐVTN không thể ăn uống trong khoảng thời gian theo dõi, được tiên đoán là sẽ chết), thì được tính như là trường hợp ĐVTN bị chết.

Mô để quan sát đại thể những động vật bị chết trong thời gian theo dõi. Nếu quan sát trên đại thể thấy những biểu hiện bất thường, làm tiêu bản vì thế để quan sát rõ hơn nếu có điều kiện [50].

1.4.2. Tổng quan về thử nghiệm đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan.

Để đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của các chế phẩm, mô hình nghiên cứu thường được tiến hành trên động vật gây tổn thương tế bào gan. Nhiều loại hóa chất khác nhau được sử dụng để gây tổn thương tế bào gan trên động vật thực nghiệm như: paracetamol, carbon tetrachlorid, D-galactosamin, ethanol, erythromycin estolate, aflatoxin B [51]. Trong các mô hình đánh giá tác dụng bảo vệ gan, các tác nhân gây tổn thương gan thường được sử dụng với liều lượng cao để gây độc cho gan, từ đó xuất hiện các triệu chứng nhiễm độc bên ngoài, thể trạng chung của động vật nghiên cứu và có những sự thay đổi trong các xét nghiệm các chỉ tiêu sinh hóa, các chỉ tiêu về huyết học và các chỉ tiêu và mô bệnh học ở các thời điểm khác nhau của quá trình nghiên cứu. Tuy

nhiên việc sử dụng hợp lý các mô hình này đòi hỏi nhà nghiên cứu cần có kiến thức về cơ chế tác động của các tác nhân được sử dụng lên cơ thể động vật đặc biệt là các ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của gan. Cho đến nay hai thuốc thường xuyên được sử dụng nhất gây tổn thương gan đó là paracetamol (acetaminophen) và carbon tetrachloride (CCl₄). Trong đó, Paracetamol (PAR) hay Acetaminophen là thuốc giảm đau hạ sốt thường xuyên được sử dụng trên lâm sàng. Tuy nhiên đây cũng là tác nhân gây tổn thương gan mạnh khi dùng quá liều.

Bảng 1.1: Một số hoá chất thường gây tổn thương gan trên thực nghiệm [52]

Hoá chất sử dụng	Ưu điểm	Nhược điểm
Paracetamol	Dễ sử dụng, có liên quan đến lâm sàng	Khả năng tác động vào quá trình trao đổi chất
CCl ₄	Dễ sử dụng, cũng có thể tạo mô hình tổn thương gan mãn tính	Không phù hợp với lâm sàng; tác động vào quá trình trao đổi chất
Thioacetamide	Dễ sử dụng	Không phù hợp với lâm sàng; tác động vào quá trình trao đổi chất
Furosemide	Dễ sử dụng	Không phù hợp với lâm sàng; tác động vào quá trình trao đổi chất
Bromobenzene	Dễ sử dụng	Không phù hợp với lâm sàng; tác động vào quá trình trao đổi chất
Rượu	Dễ sử dụng	Không phù hợp với lâm sàng; tác động vào quá trình trao đổi chất

Dựa vào các ưu nhược điểm của các mô hình sử dụng hoá chất gây tổn thương tế bào gan như trình bày ở bảng trên, mô hình gây tổn thương gan bằng Paracetamol là mô hình sẽ sử dụng, liên quan nhiều đến lâm sàng, gây ra tình trạng tổn thương cấp tính tế bào gan phù hợp cho nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của các chế phẩm nghiên cứu có nguồn gốc từ thảo dược.

CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu

Viên nang Gydenphy, là sản phẩm của đề tài cấp tỉnh Cao Bằng, được bào chế từ quả me rừng, giảo cổ lam và thạch học tía. Sản phẩm do Học viện Quân y nghiên cứu bào chế, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

* Thành phần viên nang Gydenphy

Bảng 2.2. Thành phần viên nang Gydenphy

Bột cao khô Quả Me rừng	Phyllanthi Fructus quả của cây <i>Phyllanthus emblica</i> L. Họ Thầu dầu (Euphorbiaceae).	Hai trăm hai tư miligam	224mg
Bột cao khô Giảo cổ lam	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb). Makino họ Bầu bí (Cucurbitaceae)	Chín mươi miligam	90mg
Bột cao khô Thạch học tía	<i>Dendrobium officinale Kimura et</i> <i>Migo</i> . Họ Lan (Orchidaceae)	Tám sáu miligam	86mg
Tá dược (Tinh bột ngô, Natri starch glycolat, Magnes i stearat, aerosil, Lactose)		Vừa đủ	1 viên (450mg)

Viên nang Gydenphy có chứa 400 mg cao dược liệu, tương ứng với 450 mg bột trong viên nang. Dựa trên liều dùng dân gian đối với ba dược liệu thành phần (quả me rừng, giảo cổ lam, thạch học tía), và kết quả đánh giá hàm lượng hoạt chất của các dược liệu trong viên nang, liều dự kiến sử dụng trên người là 6 viên nang/người/ngày, tương ứng 2400 mg/người/ngày. Tính quân bình một người 50kg thì liều dùng dự kiến trên người sẽ là 48 mg/kg/ngày. Quy đổi theo hệ số quy đổi từ người sang động vật thực nghiệm, liều tương

đương trên chuột nhất với hệ số quy đổi là 12 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột là 576mg/kg/ngày. Bột trong viên nang được cân chính xác trên cân 10^{-4} , được hòa tan trong nước cất, cho chuột uống bằng kim chuyên dụng (kim cong đầu tù).

2.1.2. Động vật nghiên cứu

Chuột nhất trắng, cả hai giống, chủng Swiss, số lượng 110 con, khỏe mạnh, trọng lượng 18 – 22g. Tiêu chuẩn đánh giá chuột khỏe mạnh, đủ điều kiện gồm: lông mượt, mắt trong, hậu môn khô, hoạt động, vận động bình thường, ăn uống bình thường, chất thải bình thường. Việc lựa chọn chuột nghiên cứu được tiến hành bởi 2 kỹ thuật viên có nhiều kinh nghiệm. Sau khi lựa chọn xong, trực tiếp cán bộ nghiên cứu kiểm tra, đánh giá lại.

Động vật thí nghiệm do Ban chăn nuôi - Học viện Quân y cung cấp, nuôi dưỡng trong phòng nuôi động vật thí nghiệm ít nhất một tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Động vật ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động vật nghiên cứu, nước sạch đun sôi để nguội uống tự do.

2.2. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Dược Lý, Viện Đào tạo Dược, Học Viện Quân Y.

Thời gian: từ 06/2021 đến 09/2021.

2.3. PHƯƠNG TIỆN TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

- *Thuốc và hóa chất dùng trong nghiên cứu:*
 - Effergal (paracetamol) viên sủi 500mg của hãng Pháp.
 - Silymarin (biệt dược Legalon) dạng viên nén, hàm lượng 70mg của hãng Madaus (Korea).
 - Kít định lượng ALT, AST của hãng Hospitex Diagnostics (Italy) (Đức).
 - Các hóa chất nghiên cứu dùng để xác định hàm lượng MDA, GSH trong gan: ascorbic acid, muối Mohr, thiobarbituric acid...

- Các hóa chất làm tiêu bản mô bệnh học: Hematoxylin, Eosin, cồn (ethanol) tuyệt đối, Alun (ammonium hay potassium), Oxyt thủy ngân (đỏ).

• *Máy móc và dụng cụ phục vụ nghiên cứu:*

- Kim đầu tù cho chuột uống, cốc chia vạch, bơm kim tiêm 1ml.
- Máy xét nghiệm huyết học 30TS, CH Đức
- Máy xét nghiệm sinh hóa Screen-Master của hãng Hospitex Diagnostic, Italy.
- Cân phân tích của Nhật, độ chính xác 10^{-4} gam.
- Kính hiển vi quang học, tủ sấy.
- Dụng cụ dùng cho nhuộm mô bệnh học: máy đúc khối parafin, bể dàn bệnh phẩm, máy cắt lát mỏng (microtome), bể nhuộm, khuôn nhựa, giá đựng tiêu bản, phiến kính, lá kính...



Hình 2.1. Kim đầu tù cho chuột uống thuốc

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp của Gydenphy trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam [51] [53], tiến hành theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [54].

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn 12 giờ, nước uống tự do. Sau 12 giờ, chuột được chia ngẫu nhiên thành các lô, mỗi lô 10 con. Các lô thử được cho uống viên nang Gydenphy với thể tích 0,2 ml/10g, uống 3 lần/ngày, mỗi lần cách nhau 6 tiếng. Thao tác cho chuột uống thuốc được thực

hiện bởi một kỹ thuật viên có nhiều kinh nghiệm. Mức liều cho uống ở mỗi lô tăng dần.

Theo dõi, đánh giá tình trạng chung của chuột ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau khi cho chuột uống thuốc lần cuối. Tình trạng chung của chuột được đánh giá thông qua các chỉ tiêu sau:

Theo dõi, đánh giá tình trạng hoạt động, vận động của chuột: các chuột có biểu hiện của trạng thái kích thích thần kinh hay không (như tăng hoạt động, dễ bị kích thích bởi các tác nhân ánh sáng, tiếng động...); có biểu hiện của trạng thái ức chế thần kinh hay không (giảm hoạt động, lơ đãng, hay nằm nhiều...); có biểu hiện về tổn thương thần kinh vận động hay không (dáng đi lảo đảo, bị run các chi, nặng có thể có co giật, hay yếu cơ đi lại khó khăn...).

Theo dõi, đánh giá tình trạng ảnh hưởng tới thần kinh thực vật: có tình trạng bị ra mồ hôi hoặc bị khô đỏ da hay không; đồng tử mắt có biểu hiện bị co, giãn hay không...

Theo dõi, đánh giá tình trạng hô hấp:

+ Chuột có biểu hiện bị khó thở không, khi khó thở chuột sẽ có biểu hiện co rút các cơ thở vùng cổ, ngực và có biểu hiện tím tái do thiếu oxy. Dựa vào sự co rút các cơ thở đánh giá biểu hiện khó thở dạng nhanh nông hay có biểu hiện ức chế làm chậm nhịp thở...

+ Chuột có biểu hiện của ho không: khi ho chuột rùn người lại, cơn ho gây vận động đột ngột của cùng đầu và cổ. Khi phát hiện nghi ngờ chuột có biểu hiện bị ho, cho chuột vào ống có gắn thiết bị khuếch đại âm thanh để nghe và đếm số tiếng ho của chuột.

– Theo dõi, đánh giá tình trạng ăn uống của chuột: ngày đầu tiên do đưa lượng thuốc nhiều vào dạ dày, việc theo dõi đánh giá chỉ mang tính tham khảo. Từ ngày thứ 2 trở đi, quan sát đánh giá sự ảnh hưởng của thuốc đến hoạt động ăn uống của chuột, lượng thức ăn và nước uống mà chuột tiêu thụ.

- Theo dõi, đánh giá tình trạng chất thải của chuột: các chuột có biểu hiện của đi ngoài phân nát hay lỏng nước không, xuất hiện ở những mức liều nào, sau dùng thuốc bao lâu, sau bao lâu thì hồi phục. Quan sát hậu môn các chuột. Những chuột không bị đi ngoài thì hậu môn khô. Các chuột có biểu hiện đi ngoài hậu môn ướt, dính phân, có thể có viêm tấy đỏ...
- Theo dõi đánh giá những biểu hiện bất thường khác như bị đau quặn bụng, bị ngứa đưa chân lên gãi...
- + Theo dõi, đánh giá số chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau khi cho chuột uống thuốc lần cuối. Với mỗi chuột bị chết, cần ghi chép đầy đủ các biểu hiện của chuột trước khi chết, thời điểm xuất hiện các biểu hiện đó, thời gian kéo dài của các biểu hiện đó và thời điểm khi chuột chết.

Tiến hành phẫu tích quan sát tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết (nếu có) để xác định nguyên nhân gây độc.

Quá trình theo dõi được thực hiện bởi các nghiên cứu viên có kinh nghiệm, chia thành nhiều ca để theo dõi liên tục, mỗi ca gồm 2 người theo dõi.

Nếu có chuột chết, tìm liều cao nhất không gây chết chuột (0%), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100%) và các liều trung gian. Số chuột chết được đếm theo từng lô. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của thuốc thử. Tiến hành phẫu tích quan sát tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết (nếu có) để xác định nguyên nhân gây độc.

Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột và số chuột chết ở mỗi lô (nếu có) cho đến hết 7 ngày sau khi uống thuốc. Các dấu hiệu bất thường của chuột cũng như số chuột chết trong thời gian sau 72 giờ cho đến hết 7 ngày sau khi uống thuốc được dùng để xem xét đánh giá về khả năng gây độc muộn của chế phẩm nghiên cứu [55].

2.2.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol

Tác dụng bảo vệ gan của chế phẩm được đánh giá trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng Paracetamol.

Chuột nhắt trắng chia ngẫu nhiên làm 5 lô, mỗi lô 10 con.

Lô 1 (chứng): uống nước cất 0,2 ml/10g.

Lô 2 (mô hình): uống nước cất 0,2 ml/10g + paracetamol 400 mg/kg.

Lô 3 (silymarin): uống silymarin 70 mg/kg/24h + paracetamol 400 mg/kg.

Lô 4 (trị 1): uống Gydenphy liều 576 mg/kg/24h + paracetamol 400 mg/kg

Lô 5 (trị 2): uống Gydenphy liều 1152 mg/kg/24h + paracetamol 400 mg/kg

Các chuột được cho uống thuốc hoặc nước cất với cùng thể tích 10ml/kg, liên tục trong 8 ngày, mỗi ngày một lần vào buổi sáng. Ngày thứ 8, sau khi cho uống thuốc 1 giờ, gây tổn thương gan chuột ở các lô 2, 3, 4, 5 bằng uống paracetamol 400 mg/kg. Chuột ở lô 1 được uống với cùng thể tích. Sau gây độc 48 giờ, lấy máu đo hoạt độ enzym AST, ALT huyết thanh để đánh giá tổn thương hủy hoại tế bào gan. Tách nhanh gan ngay lúc đó, quan sát hình ảnh đại thể, rửa sạch bằng nước muối sinh lý, thấm khô bằng giấy lọc và cân khối lượng tươi của gan để xác định chỉ số gan. Sau đó, cắt thùy trái của gan để đánh giá hình ảnh vi thể, cắt thùy phải gan nghiền đồng thể để xác định hàm lượng GSH, MDA gan.

- Xác định chỉ số gan

Chỉ số gan (%) = Khối lượng gan (g) x 100 (%) / Khối lượng cơ thể (g).

- Xác định hàm lượng MDA gan

Sử dụng phương pháp của I.U.A. Vladymyrop và cộng sự, 1972 [56].

Cân mỗi mẫu 100 mg gan. Nghiền khô với tốc độ 1000 vòng/phút trong 3 phút, sau đó thêm 5ml dung dịch đệm Tris (pH = 7,4), nghiền với tốc độ 1000 vòng/phút trong 2 phút. Ủ ấm 37⁰C trong 45 phút.

Thêm 1ml dung dịch acid tricloacetic (TCA) 30%, lắc kỹ cho phản ứng tạo tủa. Lọc loại bỏ tủa (Bỏ một phần dung dịch lọc đầu, nếu cần). Lấy 2ml dung dịch trong, thêm vào 2ml dung dịch acid thiobarbituric (TBA) 0,25%. Đun cách thủy ở 100⁰C trong 20 phút. Để nguội đến nhiệt độ phòng.

Đo quang bước sóng 532nm. Tất cả các giai đoạn chế hoá mẫu tiến hành trong điều kiện đá đang tan.

Hàm lượng MDA được tính theo công thức:

$$C = \frac{D \times 2 \times V \times 1000}{\epsilon \times v \times 1 \times m}$$

Trong đó:

C: Hàm lượng MDA (mol/g tổ chức)

D: Mật độ quang học đo được của mẫu đo.

V: Tổng thể tích dịch đồng thể và acid tricloacetic (ml); ϵ : Hệ số tắt mol ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

v: Thể tích dịch đo; l: Chiều dày cuvet; m: số mg tổ chức sử dụng.

Thay các giá trị cụ thể trong điều kiện đã tiến hành thí nghiệm, ta có:

$$C = D \times 6,92$$

- Xác định hàm lượng GSH gan Theo phương pháp của G. A. Hazenton và C. A. Lang, 1980 [57].

Cân chính xác 270 mg/mẫu gan chuột. Thêm 3 ml dd acid metaphosphoric 5%, nghiền với tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó thêm 1ml dung dịch acid tricloacetic (TCA) 30%, lắc kỹ cho phản ứng tạo tủa. Lọc loại bỏ tủa. Lấy 0,5ml dung dịch trong, thêm vào 4,5ml dung dịch thuốc thử Ellman 0,1 mM/ml trong hỗn hợp đệm Na₃PO₄ 0,1M và EDTA 0,05M. Ủ ở nhiệt độ 25⁰C trong 2 phút. Đo quang ở bước sóng $\lambda = 412\text{nm}$.

Hàm lượng GSH gan được tính theo công thức:

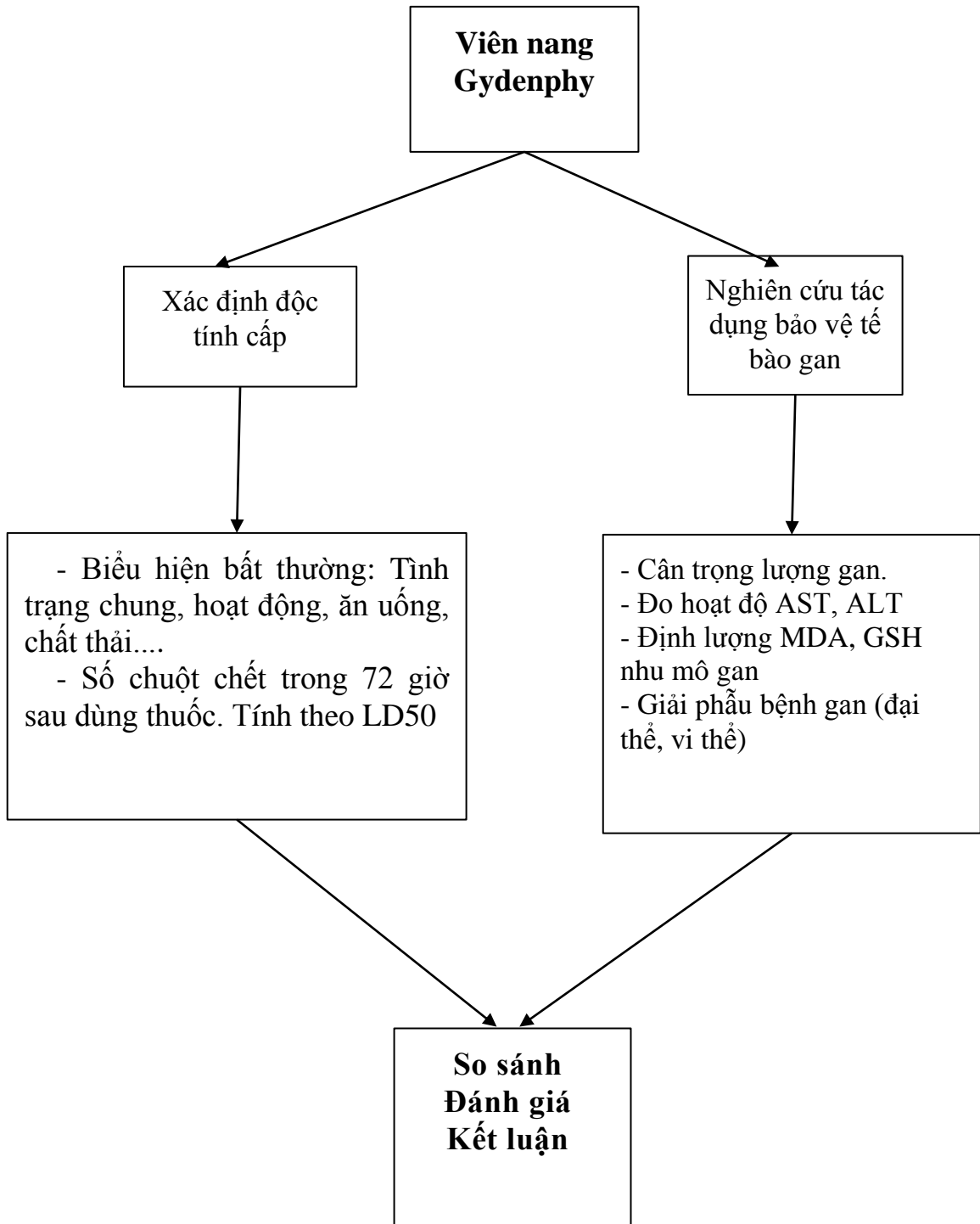
$$X = \frac{C \times 5 \times V}{0,5 \times m}$$

Trong đó: C: Hàm lượng GSH trong 1ml dung dịch đo (mg/ml).; X: Hàm lượng GSH (mg/g tổ chức).; V: Tổng thể tích dịch đồng thể và acid trichloroacetic (ml); m: Khối lượng tổ chức (mg). Việc xác định hàm lượng GSH trong dung dịch đo được tiến hành dựa vào phương pháp thêm chuẩn với chất chuẩn Glutathion của hãng Sigma, Mỹ. Thay các giá trị cụ thể trong điều kiện đã tiến hành thí nghiệm, ta được cách tính hàm lượng GSH trong gan theo công thức: $X = 2,74 \times D$ (mg/g tổ chức).

Trong đó D là giá trị mật độ quang học đo được của mẫu đo.

2.5. XỬ LÝ SỐ LIỆU

- Số liệu định lượng sau khi thu thập được làm sạch, nhập vào máy tính với phần mềm Epi Data 3.1 và được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0 cho các thông tin mô tả và phân tích thống kê.
- Áp dụng các phương pháp phân tích mô tả: tính tỷ lệ phần trăm, giá trị trung bình, độ lệch chuẩn.



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP CỦA VIÊN NANG “GYDENPHY”

3.1.1. Kết quả theo dõi, đánh giá tình trạng chung của chuột trong vòng 72 giờ sau uống thuốc

- *Kết quả về tình trạng hoạt động, vận động của chuột:* các chuột ở tất cả các lô hoạt động, vận động bình thường, không có chuột nào có biểu hiện của các trạng thái kích thích hoặc ức chế thần kinh; không có chuột nào có biểu hiện về tổn thương thần kinh vận động.

- *Kết quả về ảnh hưởng tới thần kinh thực vật:* các chuột ở tất cả các lô đều không thấy có biểu hiện về ảnh hưởng của thuốc lên tình trạng thần kinh thực vật; không có chuột nào có tình trạng bị ra mồ hôi hoặc bị khô đỏ da; đồng tử mắt của các chuột bình thường, không có chuột nào có biểu hiện bị bị co, giãn đồng tử.

- *Kết quả về ảnh hưởng tới tình trạng hô hấp:* Các chuột ở tất cả các lô đều có tình trạng hô hấp bình thường. Chuột không có biểu hiện gì của khó thở, không thấy có tím tái hoặc các dấu hiệu bất thường khác.

- *Kết quả về tình trạng ăn uống của chuột:* Từ ngày thứ 2 trở đi các chuột ở tất cả các lô đã ăn uống bình thường, không có biểu hiện của việc bỏ ăn cũng như không có biểu hiện của việc ăn uống tăng lên.

- *Kết quả về tình trạng chất thải của chuột:* các chuột đi ngoài phân khuôn, màu sắc bình thường. Kiểm tra hậu môn của các chuột thấy hậu môn khô, không có tẩy đỏ.

- *Kết quả về đánh giá những biểu hiện bất thường khác:* Các chuột ở tất cả các lô đều không có biểu hiện bất thường gì khác (không bị đau quặn bụng, không bị ngứa đưa chân lên gãi...).

3.1.2. Kết quả theo dõi, đánh giá số chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau uống Gydenphy.

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở Bảng 3.1

Bảng 3.1. Kết quả đánh giá số chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau uống Gydenphy.

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	Liều sử dụng (g/kgTLCT)	Thể tích cho uống	Số chuột sống/chết sau 72 giờ
Lô 1	10	5,0	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0
Lô 2	10	7,5	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0
Lô 3	10	10,0	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0
Lô 4	10	12,5	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0
Lô 5	10	15,0	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0
Lô 6	10	17,5	0,2 mL/10g x 3 lần	10/0

Chuột nhắt trắng được uống thuốc thử với các mức liều khác nhau từ liều thấp nhất là 5,0 g/kg thể trọng đến liều cao nhất là 17,5 g/kg thể trọng, 0,2mL/10g, một ngày 3 lần, mỗi lần cách nhau 3 giờ.

So với liều dự kiến có tác dụng trên chuột nhắt trắng là 576 mg/kg, mức liều 17,5 g/kg gấp khoảng 30,38 lần. Như vậy, chuột đã uống đến liều gấp trên 30 lần liều dự kiến có tác dụng mà không có chuột nào chết, không có dấu hiệu bất thường nào ở các chuột.

3.1.3. Kết quả theo dõi, đánh giá tình trạng chung và số chuột chết ở mỗi lô trong thời gian sau 72 giờ cho đến hết 7 ngày sau uống thuốc

3.1.3.1. Kết quả theo dõi, đánh giá tình trạng chung của chuột ở mỗi lô trong thời gian sau 72 giờ cho đến hết 7 ngày sau uống thuốc

- *Kết quả về tình trạng hoạt động, vận động của chuột:* các chuột ở tất cả các lô hoạt động, vận động bình thường, không có chuột nào có biểu hiện của các trạng thái kích thích hoặc ức chế thần kinh; không có chuột nào có biểu hiện về tổn thương thần kinh vận động.

- *Kết quả về ảnh hưởng tới thần kinh thực vật:* các chuột ở tất cả các lô đều không thấy có biểu hiện về ảnh hưởng của thuốc lên tình trạng thần kinh thực vật; không có chuột nào có tình trạng bị ra mồ hôi hoặc bị khô đỏ da; đồng tử mắt của các chuột bình thường, không có chuột nào có biểu hiện bị bị co, giãn đồng tử.

- *Kết quả về ảnh hưởng tới tình trạng hô hấp:* Các chuột ở tất cả các lô đều có tình trạng hô hấp bình thường. Chuột không có biểu hiện gì của khó thở, không thấy có tím tái, không có ho.

- *Kết quả về tình trạng ăn uống của chuột:* Các chuột ở tất cả các lô đã ăn uống bình thường, không có biểu hiện của việc bỏ ăn cũng như không có biểu hiện của việc ăn uống tăng lên.

- *Kết quả về tình trạng chất thải của chuột:* Các chuột ở tất cả các lô đi ngoài bình thường, phân khuôn, hậu môn khô.

- *Kết quả về đánh giá những biểu hiện bất thường khác:* Các chuột ở tất cả các lô đều không có biểu hiện bất thường gì khác (không bị đau quặn bụng, không bị ngứa đưa chân lên gãi...).

3.1.3.2. Kết quả theo dõi, đánh giá số chuột chết ở mỗi lô trong thời gian sau 72 giờ cho đến hết 7 ngày sau uống thuốc

Trong thời gian sau 72 giờ cho đến hết 7 ngày sau uống thuốc, không có chuột nào bị chết.

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA VIÊN NANG “GYDENPHY”

3.2.1. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hoạt độ enzym AST máu chuột

Kết quả được trình bày ở các bảng 3.2

Bảng 3.2. Hoạt độ enzym AST ở các lô nghiên cứu.

Lô nghiên cứu		<i>n</i>	Hoạt độ AST (U/l) (Mean ± SD)	% tăng giảm so với (1)	% tăng giảm so với (2)
Lô chứng sinh lý (không gây độc)	(1)	10	141,25 ± 81,68	-	Giảm 66,07 %
Lô mô hình (gây độc không trị)	(2)	10	416,31 ± 106,82	Tăng 194,73%	-
Lô tham chiếu (uống silymarin)	(3)	10	203,84 ± 96,47	Tăng 44,31 %	Giảm 51,04 %
Lô trị 1 (uống Gydenphy liều 1)	(4)	10	211,96 ± 110,26	Tăng 50,06 %	Giảm 49,09 %
Lô trị 2 (uống Gydenphy liều 2)	(5)	10	199,89 ± 101,13	Tăng 41,52%	Giảm 51,99 %
<i>p</i>			$p_{2-1} < 0,01$; $p_{3,4,5-1} < 0,05$; $p_{3,4,5-2} < 0,05$; $p_{4,5-3} > 0,05$; $p_{4-5} > 0,05$		

Nhận xét:

- Hoạt độ enzyme AST ở lô mô hình tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p_{2-1} < 0,01$). Phần trăm hoạt độ enzyme AST ở lô mô hình tăng hơn so với lô chứng là 194,73%. Paracetamol gây độc gan làm tăng hoạt độ AST trong máu chuột nghiên cứu.

- So với lô mô hình, hoạt độ enzyme AST máu chuột ở lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p_{3,4,5-2} < 0,05$). Phần trăm hoạt độ enzyme AST máu ở các lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 giảm hơn so với lô mô hình lần lượt là 51,04%, 49,09% và 51,99%. Silymarin liều 70 mg/kg/ngày, Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày đều thể hiện rõ tác dụng làm giảm hoạt độ enzyme AST trong máu chuột so với lô chứng gây độc, chứng tỏ có tác dụng bảo vệ tế bào tránh bị tổn thương gan gây ra do paracetamol liều cao. Tuy nhiên, hoạt độ enzyme AST ở các lô dùng thuốc còn cao hơn so với lô chứng sinh lý ($p_{3,4,5-1} < 0,05$).

- So với lô tham chiếu, hoạt độ enzyme AST trong máu chuột ở lô trị 1 và lô trị 2 cao hơn không có ý nghĩa thống kê ($p_{4,5-3} > 0,05$). Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày có tác dụng hồi phục tổn thương tế bào gan do đó làm giảm hoạt độ enzyme AST trong máu chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày.

- So sánh giữa 2 lô dùng Gydenphy, ở lô dùng liều cao hoạt độ enzyme AST thấp hơn so với ở lô dùng liều thấp, có thể Gydenphy có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p_{4-5} > 0,05$).

3.2.2. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hoạt độ enzym ALT máu chuột

Kết quả được trình bày ở các bảng 3.3

Bảng 3.3. Hoạt độ enzym ALT ở các lô nghiên cứu

Lô nghiên cứu		<i>n</i>	Hoạt độ ALT(U/l) (Mean ± SD)	% tăng giảm so với (1)	% tăng giảm so với (2)
Lô chứng sinh lý (không gây độc)	(1)	10	72,96 ± 12,37	-	Giảm 46,25 %
Lô mô hình (gây độc không trị)	(2)	10	135,73 ± 14,62	Tăng 86,03 %	-
Lô tham chiếu (uống silymarin)	(3)	10	94,39 ± 11,81	Tăng 29,37 %	Giảm 30,46 %
Lô trị 1 (uống Gydenphy liều 1)	(4)	10	99,54 ± 12,26	Tăng 36,43 %	Giảm 26,66 %
Lô trị 2 (uống Gydenphy liều 2)	(5)	10	92,68 ± 11,65	Tăng 27,03 %	Giảm 31,72 %
<i>p</i>			$p_{2-1} < 0,01$; $p_{3,4,5-1} < 0,05$; $p_{3,4,5-2} < 0,05$; $p_{4,5-3} > 0,05$; $p_{4-5} > 0,05$		

Nhận xét:

- Hoạt độ enzyme ALT ở lô mô hình tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh lý ($p_{2-1} < 0,01$). Phần trăm hoạt độ enzyme ALT ở lô mô hình tăng hơn so với lô chứng sinh lý là 86,03 %. Paracetamol gây độc gan làm tăng hoạt độ enzyme ALT trong máu chuột nghiên cứu.

- So với lô mô hình, hoạt độ enzyme ALT máu chuột ở lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p_{3,4,5-2} < 0,05$). Phần trăm hoạt độ enzyme ALT máu ở các lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 giảm hơn so với lô mô hình lần lượt là 30,46%, 26,66% và 31,72%. Silymarin liều 70 mg/kg/ngày, Gydenphy liều 576mg/kg/ngày và liều 1152mg/kg/ngày đều thể hiện rõ tác dụng làm giảm hoạt độ enzyme ALT trong máu chuột so với lô chứng gây độc, chứng tỏ có tác dụng bảo vệ tế bào tránh bị tổn thương gan gây ra do paracetamol liều cao. Tuy nhiên, hoạt độ enzyme AST ở các lô dùng thuốc còn cao hơn so với lô chứng sinh lý ($p_{3,4,5-1} < 0,05$).

- So với lô tham chiếu, hoạt độ enzyme ALT trong máu chuột ở lô trị 1 và lô trị 2 cao hơn không có ý nghĩa thống kê ($p_{4,5-3} > 0,05$). Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày có tác dụng hồi phục tổn thương tế bào gan do đó làm giảm hoạt độ enzyme ALT trong máu chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày.

- So sánh giữa 2 lô dùng Gydenphy, ở lô dùng liều cao hoạt độ enzyme ALT thấp hơn so với ở lô dùng liều thấp, có thể Gydenphy có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p_{4-5} > 0,05$).

3.2.3. Ảnh hưởng của Gydenphy lên trọng lượng gan chuột

Kết quả được trình bày ở các bảng 3.4

Bảng 3.4. Trọng lượng gan tương đối của chuột ở các lô nghiên cứu

Lô nghiên cứu		<i>n</i>	Trọng lượng gan tương đối (g/10g) (Mean ± SD)	% tăng giảm so với (1)	% tăng giảm so với (2)
Lô chứng sinh lý (không gây độc)	(1)	10	0,43 ± 0,12	-	Giảm 29,51%
Lô mô hình (gây độc không trị)	(2)	10	0,61 ± 0,16	Tăng 41,86 %	-
Lô tham chiếu (uống silymarin)	(3)	10	0,49 ± 0,14	Tăng 13,95 %	Giảm 19,67 %
Lô trị 1 (uống Gydenphy liều 1)	(4)	10	0,51 ± 0,13	Tăng 18,60 %	Giảm 16,39 %
Lô trị 2 (uống Gydenphy liều 2)	(5)	10	0,48 ± 0,11	Tăng 11,63 %	Giảm 21,31 %
<i>p</i>			$p_{2-1} < 0,01$; $p_{3,4,5-1} < 0,05$; $p_{3,4,5-2} < 0,05$; $p_{4,5-3} > 0,05$; $p_{4-5} > 0,05$		

Nhận xét:

- Trọng lượng gan tương đối ở lô mô hình tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng với $p_{2-1} < 0,01$, tăng hơn so với lô chứng là 41,86 %. Paracetamol gây độc gan dẫn đến viêm gan làm tăng trọng lượng gan tương đối chuột nghiên cứu.

- So với lô mô hình, trọng lượng gan tương đối của chuột ở lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p_{3,4,5-2} < 0,05$). Trọng lượng gan tương đối của chuột ở các lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 giảm hơn so với lô mô hình lần lượt là 19,67%, 16,39% và 21,31%. Silymarin liều 70 mg/kg/ngày, Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày đều thể hiện rõ tác dụng tác dụng bảo vệ tế bào gan, làm giảm quá trình viêm gan do đó làm giảm sự tăng trọng lượng gan chuột gây độc. Tuy nhiên, trọng lượng gan chuột ở các lô dùng thuốc vẫn còn cao hơn so với lô chứng sinh lý ($p_{3,4,5-1} < 0,05$).

- So với lô tham chiếu, trọng lượng gan tương đối của chuột ở lô trị 1 và lô trị 2 cao hơn không có ý nghĩa thống kê ($p_{4,5-3} > 0,05$). Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày có tác dụng hồi phục làm giảm quá trình viêm, giảm sự tăng trọng lượng gan tương đối của chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày.

- So sánh giữa 2 lô dùng Gydenphy, ở lô dùng liều cao trọng lượng gan tương đối thấp hơn so với ở lô dùng liều thấp, có thể Gydenphy có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.4. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hàm lượng malondialdehyde (MDA) gan chuột

Kết quả được trình bày ở các bảng 3.5

Bảng 3.5. Hàm lượng malondialdehyde (MDA) gan chuột ở các lô nghiên cứu.

Lô nghiên cứu		<i>n</i>	Hàm lượng MDA ($\mu\text{mol/mg protein}$) (Mean \pm SD)	% tăng giảm so với (1)	% tăng giảm so với (2)
Lô chứng sinh lý (không gây độc)	(1)	10	6,85 \pm 1,51	-	Giảm 33,30 %
Lô mô hình (gây độc không trị)	(2)	10	10,27 \pm 2,36	Tăng 49,93%	-
Lô tham chiếu (uống silymarin)	(3)	10	8,03 \pm 1,94	Tăng 17,23 %	Giảm 21,81 %
Lô trị 1 (uống Gydenphy liều 1)	(4)	10	8,19 \pm 1,82	Tăng 19,56 %	Giảm 20,25 %
Lô trị 2 (uống Gydenphy liều 2)	(5)	10	7,96 \pm 1,67	Tăng 16,20 %	Giảm 22,49 %
<i>p</i>			$p_{2-1} < 0,01$; $p_{3,4,5-1} < 0,05$; $p_{3,4,5-2} < 0,05$; $p_{4,5-3} > 0,05$; $p_{4-5} > 0,05$		

Nhận xét:

- Hàm lượng MDA trong gan chuột ở lô mô hình tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p_{2-1} < 0,01$). Phần trăm hàm lượng MDA trong gan chuột ở lô mô hình tăng hơn so với ở lô chứng là 49,93%. Paracetamol gây độc gan làm tăng stress oxy hoá trong gan, do đó làm tăng hàm lượng MDA trong gan chuột nghiên cứu.

- So với lô mô hình, hàm lượng MDA trong gan chuột ở lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($p_{3,4,5-2} < 0,05$). Phần trăm hàm lượng MDA trong gan chuột ở các lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 giảm hơn so với lô mô hình lần lượt là 21,81%, 20,25% và 22,49%. Silymarin liều 70 mg/kg/ngày, Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày đều thể hiện rõ tác dụng làm giảm hàm lượng MDA trong gan chuột so với lô chứng gây độc, chứng tỏ có tác dụng chống oxy hoá, làm giảm stress oxy hoá, giảm quá trình peroxid hoá lipid, là cơ chế giúp bảo vệ tế bào gan. Tuy nhiên, hàm lượng MDA trong gan chuột ở các lô dùng thuốc vẫn còn cao hơn so với lô chứng sinh lý ($p_{3,4,5-1} < 0,05$).

- So với lô tham chiếu, hàm lượng MDA trong gan chuột ở lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{4,5-3} > 0,05$). Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày có tác dụng chống oxy hoá do đó làm giảm hàm lượng MDA trong gan chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày.

- So sánh giữa 2 lô dùng Gydenphy, ở lô dùng liều cao hàm lượng MDA trong gan chuột thấp hơn so với ở lô dùng liều thấp, có thể Gydenphy có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p_{4-5} > 0,05$).

3.2.5. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hàm lượng glutathion (GSH) gan chuột

Kết quả được trình bày ở các bảng 3.6

Bảng 3.6. Hàm lượng glutathion (GSH) gan chuột ở các lô nghiên cứu

Lô nghiên cứu		<i>n</i>	Hàm lượng GSH ($\mu\text{mol/mg protein}$) (Mean \pm SD)	% tăng giảm so với (1)	% tăng giảm so với (2)
Lô chứng sinh lý (không gây độc)	(1)	10	8,41 \pm 1,92	-	Tăng 35,21 %
Lô mô hình (gây độc không trị)	(2)	10	6,22 \pm 1,07	Giảm 26,04 %	-
Lô tham chiếu (uống silymarin)	(3)	10	7,01 \pm 1,43	Giảm 16,65 %	Tăng 12,70 %
Lô trị 1 (uống Gydenphy liều 1)	(4)	10	6,85 \pm 1,18	Giảm 18,55 %	Tăng 10,13 %
Lô trị 2 (uống Gydenphy liều 2)	(5)	10	7,14 \pm 1,29	Giảm 15,10 %	Tăng 14,79 %
<i>p</i>			$p_{2-1} < 0,01$; $p_{3,4,5-1} < 0,05$; $p_{3,4,5-2} < 0,05$; $p_{4,5-3} > 0,05$; $p_{4-5} > 0,05$		

Nhận xét:

- Hàm lượng GSH trong gan chuột ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p_{2-1} < 0,01$). Phần trăm hàm lượng GSH trong gan chuột ở lô mô hình giảm hơn so với ở lô chứng là 26,04%. Paracetamol gây độc gan làm tăng stress oxy hoá trong gan, gan huy động tiêu thụ GSH để chống oxy hoá do đó làm giảm hàm lượng GSH trong gan chuột nghiên cứu.

- So với lô mô hình, hàm lượng GSH trong gan chuột ở lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p_{3,4,5-2} < 0,05$). Phần trăm hàm lượng GSH trong gan chuột ở các lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 tăng hơn so với ở lô mô hình lần lượt là 12,70%, 10,13% và 14,79%. Silymarin liều 70 mg/kg/ngày, Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày đều thể hiện rõ tác dụng làm tăng hàm lượng GSH trong gan chuột so với lô chứng gây độc, chứng tỏ có tác dụng chống oxy hoá, làm giảm stress oxy hoá, giảm quá trình peroxid hoá lipid, là cơ chế giúp bảo vệ tế bào gan. Tuy nhiên, hàm lượng GSH trong gan chuột ở các lô dùng thuốc vẫn còn thấp hơn so với lô chứng sinh lý ($p_{3,4,5-1} < 0,05$).

- So với lô tham chiếu, hàm lượng GSH trong gan chuột ở lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{4,5-3} > 0,05$). Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày có tác dụng chống oxy hoá do đó làm tăng hàm lượng GSH trong gan chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày.

- So sánh giữa 2 lô dùng Gydenphy, ở lô dùng liều cao hàm lượng GSH trong gan chuột cao hơn so với ở lô dùng liều thấp, có thể Gydenphy có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p_{4-5} > 0,05$).

3.2.6. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hình ảnh đại thể của gan chuột

Kết quả được trình bày ở bảng 3.7 và hình 3.1.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hình ảnh đại thể gan chuột

Lô nghiên cứu	Đại thể
Lô chứng sinh lý (không gây độc)	Gan màu nâu đỏ thẫm đồng đều. Bề mặt gan nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết. Mật độ gan mềm, không phù nề, không xung huyết
Lô mô hình (gây độc không trị)	Gan nhạt màu. Bề mặt gan sù sì hơn. Gan to hơn, có hình ảnh xung huyết.
Lô tham chiếu (uống silymarin)	Gan màu nâu đỏ thẫm đồng đều. Bề mặt gan nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết. Một số có biểu hiện xung huyết nhẹ không đáng kể. Đại thể gan không khác biệt nhiều so với ở lô chứng sinh lý.
Lô trị 1 (uống Gydenphy liều 1)	Gan màu nâu đỏ thẫm đồng đều. Bề mặt gan nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết. Một số có biểu hiện xung huyết nhẹ không đáng kể. Đại thể gan không khác biệt nhiều so với ở lô chứng sinh lý.
Lô trị 2 (uống Gydenphy liều 2)	Gan màu nâu đỏ thẫm đồng đều. Bề mặt gan nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết. Một số có biểu hiện xung huyết nhẹ không đáng kể. Đại thể gan không khác biệt nhiều so với ở lô chứng sinh lý.

Hình 3.1. Ảnh hưởng của viên nang Gydenphy đến hình ảnh đại thể Gan chuột



Lô chứng sinh lý (không gây độc)
Đại thể gan bình thường



Lô mô hình (gây độc không trị)
Gan bạc màu, sung huyết



Lô tham chiếu (Sylimarin)
Đại thể gan bình thường



Lô trị 1 uống Gydenphy (liều 1)
Đại thể gan bình thường



Lô trị 2 (Uống Gydenphy liều 2)
Đại thể gan bình thường

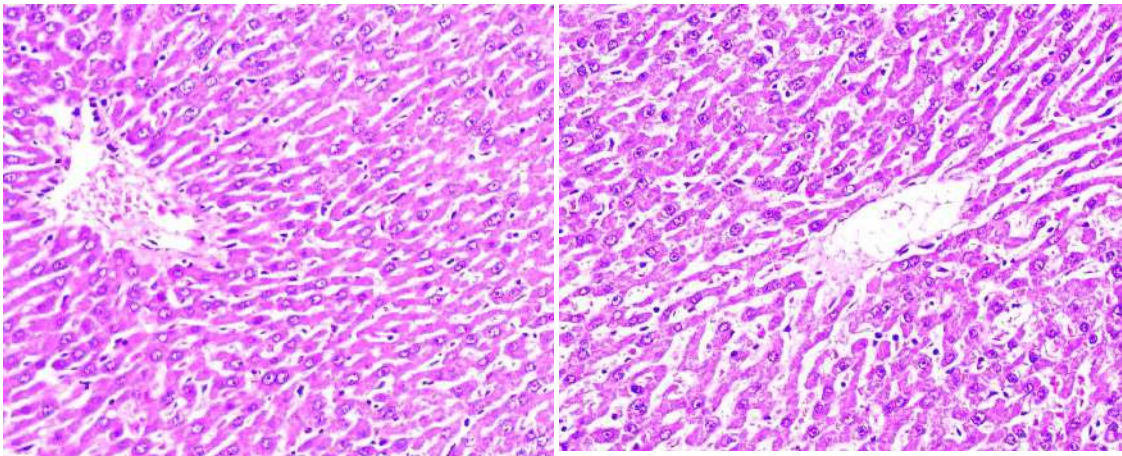
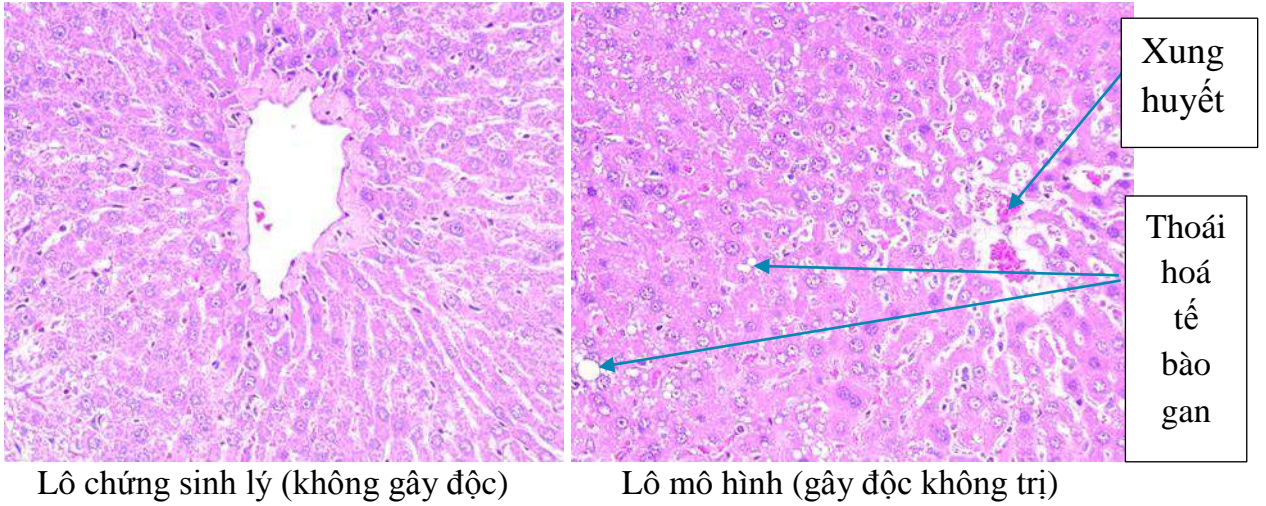
Hình 3.1. Hình ảnh đại thể gan chuột đại diện ở các lô nghiên cứu. Ở lô mô hình gan to, nhạt màu, bề mặt gan xù xì hơn, có những điểm sung huyết trên bề mặt gan. Ở các lô tham chiếu, lô trị 1 và lô trị 2, hình ảnh đại thể gan cải thiện rõ rệt, không khác biệt nhiều so với ở lô chứng sinh lý.

3.2.7. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hình ảnh vi thể của gan chuột

Kết quả được trình bày ở bảng 3.8 và hình 3.2.

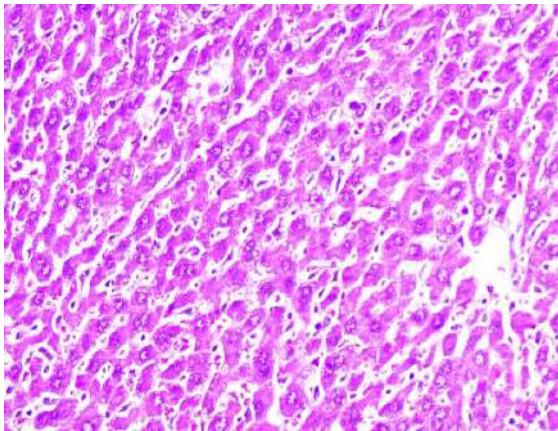
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của Gydenphy lên hình ảnh vi thể gan chuột

Lô nghiên cứu	Vi thể
Lô chứng sinh lý (không gây độc)	Hình ảnh vi thể nhuộm HE của gan cho thấy cấu trúc các bè gan, khoảng cửa bình thường, các xoang mạch nan hoa và tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy không bị sung huyết. Các tế bào gan bình thường gan bình thường. Không có hình ảnh viêm, thoái hóa, hoại tử.
Lô mô hình (gây độc không trị)	Hình ảnh vi thể nhuộm HE của gan cho thấy có hình ảnh xâm nhập viêm, thoái hóa nhẹ tế bào gan. Các xoang mạch nan hoa và tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy không bị sung huyết nhẹ
Lô tham chiếu (uống silymarin)	Các tế bào gan sắp xếp thành dải, bè, cấu trúc các bè gan, khoảng cửa bình thường. Tế bào gan không bị thoái hóa. Có hình ảnh sung huyết nhẹ không đáng kể ở các xoang mạch.
Lô trị 1 (uống Gydenphy liều 1)	Các tế bào gan sắp xếp thành dải, bè, cấu trúc các bè gan, khoảng cửa bình thường. Tế bào gan không bị thoái hóa. Có hình ảnh sung huyết nhẹ không đáng kể các xoang mạch.
Lô trị 2 (uống Gydenphy liều 2)	Các tế bào gan sắp xếp thành dải, bè, cấu trúc các bè gan, khoảng cửa bình thường. Tế bào gan không bị thoái hóa. Có hình ảnh sung huyết nhẹ không đáng kể.



Lô tham chiếu (uống silymarin)

Lô trị 1 (uống Gydenphy liều 1)



Lô trị 2 (uống Gydenphy liều 2)

Hình 3.2. Hình ảnh vi thể gan chuột đại diện ở các lô nghiên cứu. Ở lô mô hình có thoái hoá tế bào gan, xung huyết tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy. Ở các lô tham chiếu, lô trị 1 và lô trị, hình ảnh vi thể gan cải thiện rõ rệt, có xung huyết nhẹ ở tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy, còn lại không khác biệt nhiều so với ở lô chứng

Hình 3.2. Hình ảnh vi thể gan chuột đại diện ở các lô nghiên cứu

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP CỦA VIÊN NANG “GYDENPHY”

Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới [58], [59] và Bộ Y tế Việt Nam [51], ngoại trừ các bài thuốc cổ phương được chiết xuất theo phương pháp truyền thống, tất cả các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu đều phải đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn trên động vật thực nghiệm trước khi đưa vào thử nghiệm trên người. Viên nang Gydenphy với hoạt chất chiết xuất từ dược liệu, là dạng chế phẩm mới, do đó là đối tượng cần được đánh giá về độc tính cấp.

Chuột nghiên cứu được lựa chọn bao gồm cả chuột đực và chuột cái, kết quả nghiên cứu vì thế bao hàm cho cả 2 giống. Đường đưa thuốc sử dụng là đường uống, theo đúng như đường dự kiến sử dụng trên người. Khi sử dụng đường uống, để bảo đảm cho chuột dùng được một lượng thuốc lớn với độ chính xác cao, việc đưa thuốc cưỡng bức vào dạ dày chuột qua kim cong đầu tù chuyên dụng được thực hiện. Thao tác này có thể gây tổn hại đường thực quản dạ dày gây xuất huyết hoặc thủng dạ dày, hoặc có thể đưa nhầm thuốc vào đường hô hấp gây sặc thuốc, suy hô hấp làm chuột chết. Ngoài ra thao tác bắt chuột nếu thực hiện không tốt sẽ gây tổn thương chuột, thậm chí có thể làm chết chuột.

Việc theo dõi đánh giá tình trạng chung của chuột, cũng như số chuột chết ở mỗi lô đòi hỏi phải theo dõi thường xuyên liên tục, tránh việc để sót các dấu hiệu bị độc. Khi tiến hành công việc theo dõi này, chúng tôi luôn phân thành ca với mỗi ca ít nhất có 2 người theo dõi và việc theo dõi được tiến hành liên tục. Việc phẫu tích chuột được chuẩn bị sẵn sàng để nếu có chuột chết cần phải tiến hành phẫu tích ngay nhằm đánh giá nguyên nhân gây chết chuột. Các nguyên nhân gây chết chuột có thể là do độc tính của thuốc

như gây kích thích thần kinh làm chuột co giật, suy hô hấp và chết; hoặc gây suy gan, suy thận; nhưng cũng có thể do đi lỏng nhiều gây rối loạn điện giải mà chết; do tắc ruột; do tổn thương gây chảy máu trong... Trong nghiên cứu về độc tính cấp của viên nén Gydenphy, không có chuột nào bị chết nên không có bất kỳ các nguyên nhân nào kể trên.

Tác dụng bảo vệ tế bào gan của quả Me rừng, Thạch học tía, Giảo cổ lam đã được đánh giá trên nhiều mô hình gây độc tế bào gan bởi các tác nhân khác nhau bao gồm CCl_4 , ethanol, N - nitrosodiethylamin, arsen, paracetamol... Trong các mô hình gây độc tế bào gan, mô hình gây độc tế bào gan cấp tính bằng Paracetamol được sử dụng phổ biến hơn, khởi phát bằng việc quá tải các gốc tự do, dẫn tới stress oxy hóa tế bào gan. Trong khi đó, cao chiết quả Me rừng, Thạch học tía, Giảo cổ lam chứa nhiều hoạt chất chống oxy hóa và giảm viêm tế bào như vitamin C, các tannin, flavonoid từ đó góp phần làm giảm tổn thương tế bào gan thông qua cơ chế này.

Kết quả nghiên cứu độc tính cấp đường uống của viên nang Gydenphy trên chuột nhắt trắng cho thấy với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24h là 7,5g/kg thể trọng, gấp trên 30 lần (30, 38 lần) liều dự kiến có tác dụng, các chuột vẫn khỏe mạnh, lông mượt, mắt trong, ăn uống và hoạt động bình thường, không có chuột nào chết.

Việc chưa tìm thấy LD_{50} của viên nang Gydenphy theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24h là 7,5g/kg, gấp 30,38 lần mức liều dự kiến có hiệu quả, cùng với việc không phát hiện thấy các biểu hiện bất thường của tình trạng bị độc khi dùng thuốc liều cao, chứng tỏ viên nang Gydenphy có tính an toàn cao [55].

Kết quả nghiên cứu với tính an toàn cao của viên nang Gydenphy trong thử nghiệm độc tính cấp là phù hợp với tính an toàn của các dược liệu thành phần gồm quả me rừng, giảo cổ lam và thạch học tía. Đây là các dược liệu

được dân gian sử dụng nhiều, sử dụng từ lâu và hầu như chưa thấy báo cáo về độc tính của các dược liệu này.

Các nghiên cứu độc tính của Giảo cổ lam, cho thấy rằng các chất chiết xuất từ thực vật tương đối an toàn trong các thí nghiệm độc tính cấp tính và dài hạn ở liều lượng đã cho trong khi không có nghiên cứu độc tính nào được báo cáo. Attawish và cộng sự (2004) đã tiến hành nghiên cứu độc tính trường diễn của dịch chiết nước Giảo cổ lam ở chuột Wistar với các liều uống khác nhau từ 6 đến 750 mg dịch chiết/kg/ngày trong 24 tuần. Vào cuối giai đoạn, trọng lượng cơ thể, trọng lượng các cơ quan tương đối, các thông số huyết học và sinh hoá máu, cũng như mô bệnh học của các cơ quan nội tạng của mỗi nhóm chuột được theo dõi về những thay đổi giải phẫu và sinh lý của chuột [60] [58].

Thạch học tía đã được đánh giá có tính an toàn cao trong các thử nghiệm độc tính cấp, độc tính di truyền và độc tính bán trường diễn trong 90 ngày ở chuột [61] [62]. Kết quả đánh giá độc tính cấp của Thạch học tía không có chuột chết cũng như các dấu hiệu bị độc của chuột. Kết quả đánh giá độc tính di truyền của Thạch học tía cho thấy không gây tổn thương tinh trùng chuột, không gây tổn thương các nhiễm sắc thể tuỷ xương và tinh hoàn chuột. Kết quả đánh giá độc tính bán trường diễn trong 90 ngày ở chuột cũng cho thấy không làm biến đổi các chỉ số huyết học, sinh hoá máu, không ảnh hưởng đến chức năng và mô bệnh học gan, thận chuột.

Độc tính cấp tính liều gây chết trung bình in vivo hoặc LD50 của dịch chiết là 1125 mg/kg BW. Các thông số khác như trọng lượng cơ thể và tỷ lệ sống sót không cho thấy tác dụng phụ đối với Chiết xuất methanolic của quả Quả me rừng, Middha và cộng sự (2015) báo cáo độc tính của chiết xuất methanolic của quả me rừng, cho thấy với liều 200 mg/kg và 400 mg/kg dùng trên chuột nhắt trong 1 tháng không thấy có bất kỳ tác dụng gây độc nào.

LD50 của chiết xuất methanolic của quả me rừng được xác định là 1125 mg/kg thể trọng [63]. Trước đó, Golechha và cộng sự, 2014 đã chỉ ra rằng quả Me rừng liều 300–500 mg/kg không cho thấy bất kỳ tác dụng phụ nào [64].

Các kết quả này cho thấy Giảo cổ lam, Thạch học tía, quả me rừng có tính an toàn cao khi đánh giá trên động vật thực nghiệm.

4.2. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ VỀ TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN CỦA VIÊN NANG GYDENPHY TRÊN CHUỘT NHẮT TRẮNG GÂY TỔN THƯƠNG GAN BẰNG PARACETAMOL.

4.2.1. Đánh giá mô hình gây độc gan bằng Paracetamol

Paracetamol (acetaminophen) là một trong những loại thuốc không kê đơn được sử dụng rộng rãi nhất, nó là thuốc hạ sốt và giảm đau tiêu chuẩn cho các trạng thái đau nhẹ đến trung bình. Được von Mering sử dụng lần đầu trên lâm sàng vào năm 1893. Paracetamol không xuất hiện trên thị trường cho đến năm 1950 ở Hoa Kỳ và 1956 ở Úc [65]. Được FDA Hoa Kỳ phê duyệt vào năm 1951 Paracetamol là một dẫn xuất p-aminophenol có hoạt tính giảm đau và hạ sốt. Có thể ức chế con đường oxit nitric (NO) qua trung gian của nhiều loại thụ thể dẫn truyền thần kinh bao gồm N-methyl-D-aspartate (NMDA) và chất P, dẫn đến nâng cao ngưỡng đau. Hoạt động hạ sốt có thể là kết quả của sự ức chế tổng hợp và giải phóng prostaglandin trong hệ thần kinh trung ương (CNS) và tác động qua trung gian prostaglandin trên trung tâm điều nhiệt ở vùng dưới đồi trước [66]. Paracetamol là thuốc hạ sốt thông thường, an toàn với liều lượng điều trị nhưng có thể gây hoại tử gan ở người, chuột cống và chuột nhắt với liều lượng độc hại. Paracetamol làm tăng peroxy hóa lipid trong gan đã được chứng minh là một đặc điểm thường xuyên xảy ra sau khi ngộ độc chất độc với gan. Nó được chuyển hóa chủ yếu ở gan thành các liên hợp glucuronid và sulfat bài tiết. Paracetamol được chuyển hóa thành chất chuyển hóa tạo thành phân điện phân nhỏ, N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI), trong quá trình dùng quá liều paracetamol sẽ làm cạn kiệt

glutathione và bắt đầu liên kết cộng hóa trị với protein tế bào và gây tổn thương tế bào. Do tổn thương gan, chức năng vận chuyển của tế bào gan bị rối loạn dẫn đến rò rỉ màng sinh chất, do đó làm tăng nồng độ enzyme trong huyết thanh [67].

Mô hình nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của viên nang Gydenphy trên chuột nhắt trắng mô phỏng tổn thương gan thường gặp do dùng thuốc. Phản ánh sát tổn thương thực tế do tính phổ biến trên lâm sàng. Trong nghiên cứu này, việc uống paracetamol (400 mg/kg) bằng đường uống gây ra sự gia tăng đáng kể: Paracetamol gây độc gan làm tăng hoạt độ AST, ALT trong máu chuột nghiên cứu. Hoạt độ enzyme AST, ALT ở lô mô hình tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p_{2-1} < 0,01$). Phần trăm hoạt độ enzyme AST ở lô mô hình tăng hơn so với lô chứng là 194,73%. Phần trăm hoạt độ enzyme ALT ở lô mô hình tăng hơn so với lô chứng sinh lý là 86,03%. Paracetamol gây độc gan dẫn đến viêm gan làm tăng trọng lượng gan tương đối chuột nghiên cứu. Trọng lượng gan tương đối ở lô mô hình tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng với ($p_{2-1} < 0,01$), tăng hơn so với lô chứng là 41,86%. Paracetamol gây độc gan làm tăng stress oxy hoá trong gan, do đó làm tăng hàm lượng MDA trong gan chuột nghiên cứu. Hàm lượng MDA trong gan chuột ở lô mô hình tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p_{2-1} < 0,01$). Phần trăm hàm lượng MDA trong gan chuột ở lô mô hình tăng hơn so với ở lô chứng là 49,93%. Paracetamol gây độc gan làm tăng stress oxy hoá trong gan, gan huy động tiêu thụ GSH để chống oxy hoá do đó làm giảm hàm lượng GSH trong gan chuột nghiên cứu. Hàm lượng GSH trong gan chuột ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p_{2-1} < 0,01$). Phần trăm hàm lượng GSH trong gan chuột ở lô mô hình giảm hơn so với ở lô chứng là 26,04%. Giải phẫu đại thể gan gây độc không trị: Có đặc điểm gan nhạt màu, bề mặt gan sù sì hơn, gan to hơn, có hình ảnh xung huyết; Giải phẫu vi thể gan gây độc không trị: Hình ảnh vi thể nhuộm HE của gan cho thấy có hình

ảnh xâm nhập viêm, thoái hóa nhẹ tế bào gan, các xoang mạch nan hoa và tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy không bị sung huyết nhẹ.

4.2.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang Gydenphy.

Viên nang Gydenphy được bào chế tại Học viện Quân y từ 3 dược liệu thu hái ở Cao Bằng là Giảo cổ lam, Quả Me rừng, Thạch斛 tía. Kết quả nghiên cứu cho thấy viên nang có tác dụng tốt làm giảm tổn thương tế bào gan thông qua chỉ số ALT và AST giảm, và vi thể gan hầu như không còn hình ảnh thoái hóa tế bào gan. Mặc dù việc tìm hiểu về cơ chế tác dụng bảo vệ gan của viên nang chưa được đánh giá sâu trong nghiên cứu này, tuy nhiên có thể thấy rõ vai trò của tác dụng chống viêm và tác dụng chống oxy hóa trong cơ chế tác dụng bảo vệ gan của viên nang Gydenphy. Tác dụng chống viêm của viên nang được thể hiện thông qua chỉ số về trọng lượng gan tương đối giảm, gan giảm xung huyết cả trên hình ảnh đại thể và vi thể. Tác dụng chống oxy hóa của viên nang thể hiện qua chỉ số hàm lượng MDA trong gan giảm, hàm lượng GSH trong gan tăng. Tác dụng bảo vệ gan cùng với các tác dụng chống viêm, chống oxy hóa đều là những tác dụng được chứng minh là có ở các dược liệu thành phần. Kết quả đánh giá về tác dụng bảo vệ gan của viên nang Gydenphy vì thế hoàn toàn phù hợp với các báo cáo về các tác dụng của các dược liệu thành phần.

Quả me rừng chứa nhiều chất chống oxy hóa như vitamin C, các flavonoid... được chứng minh có khả năng thu dọn gốc tự do, ngăn cản stress oxy hóa. Hơn thế nữa, kết quả in vitro cho thấy cao định chuẩn quả Me rừng hiện tại được sử dụng trong nghiên cứu có khả năng thu dọn gốc tự do O_2^- và DPPH [68]. Tác dụng bảo vệ gan của quả Me rừng in vivo đã được đánh giá trên nhiều mô hình gây độc tế bào gan bởi các tác nhân khác nhau bao gồm CCl_4 , ethanol, N-nitrosodiethylamin, paracetamol... [67] [69] [70]. Hoạt chất quả Me rừng chứa nhiều hoạt chất chống oxy hóa và giảm viêm tế bào như vitamin C, các tannin, flavonoid từ đó góp phần làm giảm tổn thương tế bào

gan do cơ chế stress oxy hoá. Chiết xuất Methanolic của Quả me rừng đã được đánh giá về các hoạt động bảo vệ gan và chống oxy hóa ở chuột. Chiết xuất thực vật (200 và 300 mg/kg) cho thấy hoạt động bảo vệ gan và chống oxy hóa đáng kể chống lại độc tính gan do acetaminophen gây ra như được đánh giá từ các enzym đánh dấu huyết thanh và mức độ chống oxy hóa trong các mô gan. Acetaminophen gây ra sự gia tăng đáng kể aspartate amino transferase (AST), alanin amino transferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin toàn phần, gamma glutamate transpeptidase (GGTP), lipid peroxidase (LPO) với việc giảm tổng số protein, superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) và glutathione S-transferase (GST). Điều trị chuột với các liều lượng khác nhau của chiết xuất thực vật (200 và 300 mg/kg) đáng kể ($P < 0.001$) thay đổi các enzym đánh dấu huyết thanh và mức độ chống oxy hóa gần như bình thường đối với chuột được điều trị bằng acetaminophen. Hoạt tính của chiết xuất ở liều 300 mg/kg có thể so sánh với thuốc tiêu chuẩn, silymarin (50 mg/kg). Các thay đổi mô bệnh học của mẫu gan được so sánh với đối chứng tương ứng. Kết quả cho thấy đặc tính bảo vệ gan và chống oxy hóa của Quả me rừng chống lại độc tính trên gan do acetaminophen ở chuột [71]. Ngoài ra, nhiều hoạt chất được phân lập từ quả me rừng như axit gallic, axit ellagic, axit mucic 1,4-lacton 3-O-gallate, isocorilagin, chebulanin, axit chebulagic và mallotusin được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa khi đánh giá bằng các mô hình in vitro của các gốc anion superoxide, các gốc DPPH và các gốc ABTS, khả năng chelat hóa của ion đen và khả năng ức chế peroxy hóa lipid do Fe (II) tương ứng [62]. Kết quả cho thấy tất cả các phenol được thử nghiệm đều cho thấy hoạt động loại bỏ gốc mạnh mẽ, khả năng chelate Fe^{2+} tốt và khả năng ức chế tốt quá trình peroxy hóa lipid. Trong số mallotusin và axit mucic, 1,4-lacton 3-O-gallate được báo cáo lần đầu tiên có hoạt tính chống oxy hóa [62]. Đã có một số nghiên cứu công bố các hợp chất polyphenolic chứa trong cao chiết quả Me

rừng có thể gây ra quá trình tự chết theo chu trình đối với các dòng tế bào ung thư ở người [72]. Tế bào HepG2 (ung thư biểu mô tế bào gan), là một dòng tế bào ung thư dễ bị ảnh hưởng bởi quá trình tự chết tế bào theo chu trình do các hợp chất trong dịch chiết quả Me rừng gây nên. Gần đây, dịch chiết của quả Me rừng đã được chứng minh gây nên quá trình tự chết tế bào trên một số 6 dòng tế bào ung thư khác nhau (Hela, A549, HepG2, MRC5, SK-OV3, MDA-MB-231) ở các mức nồng độ khác nhau [73]. Vì vậy, để lựa chọn khoảng nồng độ cao định chuẩn quả Me rừng không gây chết tế bào HepG2 trong các thử nghiệm Oil red O và Western Blot, đánh giá khả năng sống sót của tế bào khi ủ với cao định chuẩn quả Me rừng trên tế bào ung thư gan HepG2 ở các mức nồng độ khác nhau là rất cần thiết. Trước tiên, nghiên cứu đánh giá tỷ lệ tế bào HepG2 sống sót khi ủ với cao định chuẩn quả Me rừng ở các nồng độ 3, 10, 30, 100 μ M thông qua thử nghiệm MTT. Kết quả nghiên cứu hiện tại cho thấy rằng mức nồng độ cao định chuẩn quả Me rừng <100 μ M đảm bảo tỷ lệ tế bào HepG2 sống sót trên 80%. Một nghiên cứu tương tự đánh giá khả năng sống sót của tế bào HSC-T6 khi ủ với cao chiết quả Me rừng cũng cho thấy nồng độ dịch chiết quả Me rừng <150 μ M có tỷ lệ tế bào sống sót trên 80% [74]. Nghiên cứu của Mahesh Mysore Shivananjappa và cộng sự cũng chỉ ra rằng dịch chiết quả Me rừng ở nồng độ lên tới 100 μ g/ml không ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào HepG2. Tuy nhiên, dịch chiết ở nồng độ \geq 250 μ g/ml làm giảm đáng kể khả năng sống sót của các tế bào HepG2 (21-62% tế bào sống sót) [75] [76].

Giảo cổ lam đã được truyền thống sử dụng như một phương thuốc dân gian chữa nhiều bệnh, bao gồm bệnh đái tháo đường, hội chứng chuyển hóa, bệnh lý về gan và các bệnh thoái hóa thần kinh ở Trung Quốc, Việt Nam và một số nước ở Đông và Đông Nam Á [77]. Giảo cổ lam được tìm thấy sớm nhất trong Bản thảo cương mục của một nhà thảo dược nổi tiếng Trung Quốc, Lý Thời Trân (1578), bao gồm một phác thảo và mô tả Giảo cổ lam có vị

đáng, tính bình, cường dương, bổ âm có công dụng trong điều trị tiểu máu, phù nề, đau của hầu họng, nhiệt, phù nề cổ, khối u và chấn thương. Điều tra hoạt chất của Giảo cổ lam được bắt đầu với việc phân lập và xác định panaxadiol và 2 α -hydroxypanaxadiol từ một phần giàu saponin thủy phân của các bộ phận trên không của Giảo cổ lam (Nagai và cộng sự, 1976). Takemoto và cộng sự (1977, 1979, 1980) chứng minh các saponin chiết xuất từ giảo cổ lam có tác dụng tốt trong bảo vệ gan cùng nhiều tác dụng quý khác như hạ glucose máu, hạ lipid máu, chống viêm, bảo vệ tim mạch... [78]. Takemoto cũng đã tổng quan về các thử nghiệm lâm sàng có đối chứng ngẫu nhiên được thực hiện để đánh giá tác dụng bảo vệ gan, hạ glucose máu, hạ lipid máu... của các chất chiết xuất từ giảo cổ lam cho thấy hiệu quả tiềm năng của dược liệu này, đồng thời chỉ ra Giảo cổ lam có vai trò điều trị hỗ trợ hiệu quả cho liệu pháp ăn kiêng cho bệnh nhân gan nhiễm mỡ không do rượu [78]. Ảnh hưởng của saponin trong Giảo cổ lam đối với mức gốc tự do ở chuột bị xơ gan do miễn dịch rất tích cực. Một số dữ liệu cho thấy Giảo cổ lam có thể thúc đẩy tái tạo gan và có giá trị nhất định trong điều trị viêm gan nặng [79]. Trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol, saponin Giảo cổ lam liều 200 mg/kg và 600 mg/kg có tác dụng làm hạn chế tổn thương gan thông qua làm hạn chế tăng khối lượng gan tương đối và hoạt độ AST, ALT; làm giảm nồng độ MDA trong dịch đờng thể gan; hạn chế được tổn thương trên giải phẫu vi thể gan. Tác dụng này tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg thể trọng chuột. So sánh tác dụng của saponin Giảo cổ lam liều 200 mg/kg và liều 600 mg/kg thấy rằng liều 200 mg/kg thể trọng chuột của saponin giảo cổ lam có tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hoá tốt hơn liều 600 mg/kg thể trọng chuột. So sánh tác dụng của Saponin toàn phần các thử nghiệm trước đây cho thấy tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hoá của saponin cao hơn nhiều lần so với dung dịch chiết cao toàn phần [80]. Hiệu quả chống oxy hoá rõ rệt của

các saponin Giảo cổ lam có thể rất có giá trị trong điều trị và phòng ngừa nhiều bệnh như xơ vữa động mạch, bệnh gan và các triệu chứng viêm [81].

Tác động của polysaccharid được phân lập từ Thạch斛 tía đối với độc tính trên gan do Paracetamol gây ra và các cơ chế cơ bản liên quan được nghiên cứu. Nghiên cứu này cho thấy rằng Thạch斛 tía tạo ra các tác dụng bảo vệ gan có khả năng chống lại tổn thương gan do Paracetamol gây ra. Theo 1 số nghiên cứu tại Trung Quốc đã chứng minh Thạch斛 tía là “1 trong 9 loại thuốc bất tử” do có nhiều tác dụng quý như: Hạ đường huyết, cải thiện chức năng miễn dịch, hạ men gan,... [27]. Một số nghiên cứu khác khám phá ra hiệu ứng homing Kinh lạc của Thạch斛 tía bằng cách đo điện thế Kinh lạc kết quả cho thấy Thạch斛 tía có tính axit yếu thông qua việc đo độ pH. So với nhóm đối chứng, tiềm năng oxy hóa khử của Thạch斛 tía giảm, đồng thời khả năng chống oxy hóa và tổng số khả năng chống oxy hóa tăng lên ($P < 0,01$) làm tăng đáng kể điện thế của Kinh đại tràng, Kinh đờm, Kinh tâm bào, kinh ba đốt Điện áp của Kinh lạc sáu tạng mà Kinh lạc cơ, Kinh tiêu tràng và Kinh bàng quang thuộc về không có ảnh hưởng đáng kể đến điện thế của Kinh lạc ngũ tạng mà Kinh phế, Kinh can, Kinh vị, Kinh thận, Kinh tỳ và Kinh tâm đều có mối quan hệ nhất định với đặc tính chống oxy hóa [82] Nghiên cứu sâu hơn về các cơ chế chỉ ra rằng Thạch斛 tía phát huy tác dụng bảo vệ gan bằng cách ức chế stress oxy hóa và kích hoạt con đường tín hiệu Nrf2-Keap1 [83]. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng tổn thương gan do rượu có liên quan đến nhiễm mỡ, stress oxy hóa và viêm [84] [85]. Thông thường, 90% lượng rượu được thải trừ chủ yếu ở gan [86]. Đầu tiên, rượu được chuyển thành acetaldehyde với sự có mặt của chất xúc tác là alcohol dehydrogenase (ADH) và cytochrome P450 2E1 (CYP2E1). Sau đó, acetaldehyde bị oxy hóa thành axit acetic với sự tham gia của acetaldehyde dehydrogenase (ALDH2). Cuối cùng, axit axetic được chuyển hóa thành cacbon điôxít theo chu trình axit Citric [87]. Tuy nhiên, khả năng chuyển hóa

rượu của gan là rất hạn chế, và độc tính với gan do rượu chủ yếu qua trung gian chuyển hóa thành acetaldehyde [88] [89]. Mặt khác, acetaldehyde có thể gây ra stress oxy hóa, giảm lượng glutathione và tăng sản xuất các loại oxy phản ứng (ROS) [86]. Mặt khác, ROS dư thừa gây tích tụ lipid trong tế bào gan, dẫn đến gan nhiễm mỡ. Ngoài ra, uống quá nhiều rượu sẽ kích hoạt tế bào Kupffer tạo ra một lượng lớn yếu tố hạt nhân kappa-B thúc đẩy việc giải phóng yếu tố hoại tử khối u- α (TNF- α) và các cytokine gây viêm khác [90] [91]. Theo một cách khác, quá trình oxy hóa rượu dẫn đến việc tạo ra nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), chất này ức chế quá trình oxy hóa axit béo nhưng thúc đẩy tổng hợp axit béo và triglyceride [92]. Do đó, ngăn ngừa căng thẳng oxy hóa và viêm sẽ là một phương pháp hiệu quả trong việc trì hoãn quá trình sinh bệnh của tổn thương gan do rượu.

Kết quả thử nghiệm đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang Gydenphy trên chuột nhắt trắng gây độc bằng paracetamol (400 mg/kg) đã chứng minh viên nang Gydenphy ở cả 2 mức liều 576 mg/kg/24h và 1152 mg/kg/24h đều có tác dụng và có xu hướng tốt hơn Silymarin liều 70 mg/kg/24h nhưng chưa có ý nghĩa thống kê. Cụ thể Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm hoạt độ enzyme AST và ALT trong máu chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày. Phần trăm hoạt độ enzyme AST máu ở các lô tham chiếu, lô trị 1 (Gydenphy liều 576 mg/kg/24h) và lô trị 2 (Gydenphy liều 1152 mg/kg/24h) giảm hơn so với lô mô hình lần lượt là 51,04 %, 49,09 % và 51,99 %. Phần trăm hoạt độ enzyme ALT máu ở các lô tham chiếu, lô trị 1 (Gydenphy liều 576 mg/kg/24h) và lô trị 2 (Gydenphy liều 1152 mg/kg/24h) giảm hơn so với lô mô hình lần lượt là 30,46%, 26,66% và 31,72%. Silymarin liều 70 mg/kg/ngày, Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày đều thể hiện rõ tác dụng làm giảm hoạt độ enzyme AST và ALT trong máu chuột so với lô chứng gây độc, chứng tỏ có tác dụng bảo vệ tế bào gan tránh tổn

thương gây ra do paracetamol liều cao. Mặt khác, Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm quá trình viêm, giảm sự tăng trọng lượng gan tương đối của chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày. Trọng lượng gan tương đối của chuột ở các lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 giảm hơn so với lô mô hình lần lượt là 19,67%, 16,39% và 21,31%. So sánh giữa 2 lô dùng Gydenphy, ở lô dùng liều cao trọng lượng gan tương đối thấp hơn so với ở lô dùng liều thấp, có thể Gydenphy có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Một phần cơ chế bảo vệ tế bào gan, giảm viêm gan có lẽ nhờ tác dụng chống oxy hoá của Gydenphy. Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày làm giảm hàm lượng MDA trong gan chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày. Phần trăm hàm lượng MDA trong gan chuột ở các lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 giảm hơn so với lô mô hình lần lượt là 21,81%, 20,25% và 22,49%. MDA là sản phẩm của quá trình oxy hóa, chủ yếu là quá trình peroxid hoá lipid. Việc làm giảm MDA trong gan chuột so với lô chứng gây độc chứng tỏ Gydenphy có tác dụng chống oxy hoá, làm giảm stress oxy hoá, giảm viêm và giảm tổn thương tế bào gan. So sánh giữa 2 lô dùng Gydenphy, ở lô dùng liều cao hàm lượng MDA trong gan chuột thấp hơn so với ở lô dùng liều thấp, có thể Gydenphy có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Tác dụng chống oxy hoá của Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày trong nghiên cứu còn thể hiện qua tác dụng làm tăng hàm lượng GSH trong gan chuột gây độc tương đương với Silymarin liều 70 mg/kg/ngày. Phần trăm hàm lượng GSH trong gan chuột ở các lô tham chiếu, lô trị 1, và lô trị 2 tăng hơn so với ở lô mô hình lần lượt là 12,70%, 10,13% và 14,79%. Silymarin liều 70 mg/kg/ngày, Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày đều thể hiện rõ tác dụng làm tăng hàm lượng GSH trong gan chuột so với lô chứng gây độc, chứng tỏ có tác dụng chống oxy hoá,

làm giảm stress oxy hoá, giảm quá trình peroxid hoá lipid, là cơ chế giúp bảo vệ tế bào gan. So sánh giữa 2 lô dùng Gydenphy, ở lô dùng liều cao hàm lượng GSH trong gan chuột cao hơn so với ở lô dùng liều thấp, có thể Gydenphy có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Hình ảnh đại thể gan chuột ở 2 lô dùng Gydenphy cho thấy Gan màu nâu đỏ thẫm đồng đều. Bề mặt gan nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết. Một số có biểu hiện xung huyết nhẹ không đáng kể. Đại thể gan không khác biệt nhiều so với lô chứng sinh lý. Hình ảnh vi thể gan chuột ở 2 lô dùng Gydenphy cho thấy các tế bào gan sắp xếp thành dải, bè, cấu trúc các bè gan, khoảng cửa bình thường. Tế bào gan không thoái hoá, Có hình ảnh sung huyết nhẹ không đáng kể.

Ngoài ra các dược liệu thành phần còn được báo cáo có tác dụng hạ lipid máu, hạ glucose máu. Việc tăng lipid máu, tăng glucose máu được xem là nguyên nhân gặp ngày càng phổ biến để gây tình trạng tổn thương tế bào gan, đặc biệt trong bệnh gan nhiễm mỡ. Các tác dụng hạ lipid máu, hạ glucose máu của viên nang cũng cần được đánh giá để nâng cao giá trị của chế phẩm, đồng thời hiểu sâu hơn về các cơ chế tham gia bảo vệ tế bào gan của viên nang trong nhiều bệnh lý gan khác nhau.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu thực nghiệm, chúng tôi kết luận:

1. Về độc tính cấp

Chưa tìm thấy LD 50 của viên nang Gydenphy theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống là 17,5 g/kg thể trọng, mà không gây chết chuột nào, không có biểu hiện nào của độc tính cấp.

2. Về tác dụng tác dụng bảo vệ tế bào gan

Viên nang cứng Gydenphy liều 576 mg/kg/ngày và liều 1152 mg/kg/ngày thử nghiệm trên mô hình gây độc gan chuột nhắt trắng bằng paracetamol có tác dụng bảo vệ tế bào gan, thể hiện qua một số chỉ tiêu sau:

- Làm giảm hoạt độ enzyme AST và ALT trong máu chuột so với lô mô hình (gây độc không dùng thuốc, $p < 0,05$).
- Làm giảm quá trình viêm tại gan nên giảm trọng lượng gan tương đối của chuột so với lô mô hình (gây độc không dùng thuốc, $p < 0,05$).
- Làm giảm stress oxy hóa trong gan thông qua chỉ tiêu làm giảm malondialdehyde (MDA) và làm tăng Glutathion (GSH) trong gan chuột.
- Hình ảnh đại thể và vi thể gan của chuột ở các lô gây độc có uống thuốc hầu như không thấy có tổn thương, trong khi hình ảnh đại thể và vi thể gan của chuột ở lô mô hình (gây độc không dùng thuốc) có biểu hiện viêm, thoái hóa nhẹ.
- Các tác dụng này của Gydenphy tương đương với tác dụng của silimarin liều 70 mg/kg/24h.
- Viên nang Gydenphy có xu hướng tăng tác dụng theo mức liều (Tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$)

KIẾN NGHỊ

Sau khi thực hiện xong đề tài, nhóm nghiên cứu có một số kiến nghị như sau:

- Tiếp tục nghiên cứu đánh giá về độc tính bán trường diễn và một số tác dụng của viên nang Gydenphy trên động vật thực nghiệm.
- Tiến hành nghiên cứu đánh giá tính an toàn và tác dụng của viên nang Gydenphy trên lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019).** Burden of liver diseases in the world. *Journal of hepatology*, 70(1), 151–171.
2. **Sharma A, Nagalli S.(2021).** Chronic Liver Disease StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*
3. WHO (2018). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, 26/12/2021.
4. **Gish, R. G., Bui, T. D., Nguyen, C. T., Nguyen, D. T., Tran, H. V., Tran, D. M., Trinh, H. N., (2012).** Liver disease in Viet Nam: screening, surveillance, management and education: a 5-year plan and call to action. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27(2), 238–247.
5. **Guiqiang Wang , Zhongping Duan (2021).** Guidelines for Prevention and Treatment of Chronic Hepatitis B. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 2021;9(5):769-791
6. **Nsibirwa, S., Anguzu, G., Kamukama, S., Ocama, P., & Nankya-Mutyoba, J. (2020).** Herbal medicine use among patients with viral and non-viral Hepatitis in Uganda: prevalence, patterns and related factors. *BMC complementary medicine and therapies*, 20(1), 169.
7. **Rahman, M. A., Ueda, K., & Honda, T. (2021).** A Traditional Chinese Medicine, Maoto, Suppresses Hepatitis B Virus Production. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 581345.
8. **Bui Thanh, Tung & Nhung, Nguyễn Hồng & Ta, Hang & Linh, Vu. (2021).** Herbal Medicine and Its Bioactive Compounds for Treatment of Hepatitis B. 10.4018/978-1-7998-4453-2.ch008.

9. **Tewari, D., Mocan, A., Parvanov, E. D., Sah, A. N., Nabavi, S. M., Huminiecki, L., Ma, Z. F., Lee, Y. Y., Horbańczuk, J. O., & Atanasov, A. G. (2017).** Ethnopharmacological Approaches for Therapy of Jaundice: Part II. Highly Used Plant Species from Acanthaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Combretaceae, and Fabaceae Families. *Frontiers in pharmacology*, 8, 519.
10. **Li, K., Ma, C., Li, H., Dev, S., He, J., & Qu, X. (2019).** Medicinal Value and Potential Therapeutic Mechanisms of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino and Its Derivatives: An Overview. *Current topics in medicinal chemistry*, 19(31), 2855–2867.
11. **Wen-hua Chen, Jian-jun, Wu Xue-fei, Li Jie-miao, Lu Wei Wu, Yi-qi Sun Bo, Zhu Lu-ping Qin (2021).** Isolation, structural properties, bioactivities of polysaccharides from *Dendrobium officinale* Kimura et. Migo, *International Journal of Biological Macromolecules*, ISSN: 0141-8130, Vol: 184, Page: 1000-1013.
12. **Shantan Cheemerla M.D., Maya Balakrishnan M.D., M.P.H. (2021).** Global Epidemiology of Chronic Liver Disease, *American Association for the Study of Liver Diseases*, Volume17, Issue5, Pages 365-370.
13. Gower et al 2014, Schweitzer et al 2015, CDA/WHO
14. **Lushchak V. I. (2014),** "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification", *Chem Biol Interact*, 224, pp. 164-75.
15. **Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, et al. (2017).** Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763.

16. **Sanchez-Valle V., Chavez-Tapia N. C., et al. (2012)**, "Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review", *Curr Med Chem*, 19(28), pp. 4850-60.
17. **Cichoż-Lach H., Michalak A. (2014)**, "Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases", *World J Gastroenterol*, 20(25), pp. 8082-91.
18. **Singal A. K., Jampana S. C., et al. (2011)**, "Antioxidants as therapeutic agents for liver disease", *Liver Int*, 31(10), pp. 1432-48.
19. **Li S., Tan H. Y., et al. (2015)**, "The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases", *Int J Mol Sci*, 16(11), pp. 26087-124
20. **TS. Phạm Bá Toàn và cộng sự (2011)**, Bệnh học nội khoa Y học cổ truyền, *NXB Quân đội nhân dân, Học viện Quân y*, tr. 238-249.
21. **周国亮 (2010)**. 古代治疗黄疸方剂源流及用药规律研究. *辽宁中医药大学*, R289.1R256.4.
22. **刘延洪. (1999)**. 辨证论治阳黄 85 例. *中国中医药信息杂志*, 6(10), 56-56.
23. **张建军. (2001)**. 温阳活血退黄方治疗阴黄证的疗效观察. *湖北中医杂志*.
24. **刘士敬, & 朱倩. (1999)**. 中医急黄病与急性重型肝炎. *光明中医*, 14(1), 4.
25. **谭福雄, 黄峰, 王阳阳, & 杨晨. (2020)**. 黄峰教授从"气虚血瘀"论治虚黄经验. *现代中西医结合杂志*, 29(15), 3.
26. **宁为民 (2005)**. 茵陈蒿汤临床新用[J]. *湖南中医杂志*, 21(4). Pp.66-67.
27. **梁楚燕, 李焕彬, 侯少贞, 张洁, 黄松, & 赖小平. (2022)**. 铁皮石斛护肝及抗胃溃疡作用研究. (2).

28. 邓鑫, 梁健, 刘振威, 吴发胜, 李璇 (2013). Treatment of posthepatic cirrhosis by fuzheng huayu tablet (扶正化瘀片) for reinforcing qi and resolving stasis. *Chinese Journal of Integrative Medicine*
29. 侯金燕 (2015). 茵陈蒿汤保肝作用的药效物质基础研究. *南京中医药大学*, GB / T 7714-2015.
30. 王玉芝. (2000). 小柴胡汤治疗肝病的临床研究. *中成药*, 22(4), 3.
31. 王玉红、张若梅、刘先勇. (2020). 茵陈术附汤加减治疗肝细胞性黄疸疗效观察. *山西中医*, 36(11), pp. 2.
32. 费景兰 (2013). 基于"扶阳化湿法"治疗阴黄 45 例临床观察. 2013 年河南省中医护理学术发展研讨会.
33. 杨润华, 陈娇, 高戎, 陈王凯, 时良玺, & 阚民强. (2016). 茵陈蒿汤治疗脓毒症相关肝损伤的临床应用研究. *中国中西医结合急救杂志*, 23(3), pp. 5.
34. 张建军. (2001). 温阳活血退黄方治疗阴黄证的疗效观察. *湖北中医杂志*(6).
35. Trần Thị Mỹ Linh, Đậu Xuân Cảnh, Lê Thị Tuyết và CS (2020). Nghiên cứu tác dụng của viên nang cứng CT_{HepaB} trên động vật thực nghiệm, *Tạp chí gan mật Việt Nam*, số 41-2020, pp 67-72.
36. Phí Thị Cẩm Miện, Trần Văn Thái và CS (2017). Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết chùm ngây (*Moringa oleifera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng carbon tetrachloride (CCl₄), *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, tập 15, số 2: 225-233.

37. **Trần Công Luận, Nguyễn Hoàng Minh và CS (2017).** Tác dụng bảo vệ gan của nang Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) trên mô hình gây tổn thương gan mạn ethanol. *Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô* 02. pp. 132-140.
38. **Bhakta Prasad Gaire, Lalita Subedi (2013).** Phytochemistry, Pharmacology and Medicinal Properties of *Phyllanthus emblica* Linn. *Chin J Integr Med*, pp. 1-8.
39. **Chaphalkar, R., Apte, K. G., Talekar, Y., Ojha, S. K., & Nandave, M. (2017).** Antioxidants of *Phyllanthus emblica* L. Bark Extract Provide Hepatoprotection against Ethanol-Induced Hepatic Damage: A Comparison with Silymarin. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 3876040.
40. **Huang, C. Z., Tung, Y. T., Hsia, S. M., Wu, C. H., & Yen, G. C. (2017).** The hepatoprotective effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in SD rats. *Food & function*, 8(2), pp. 842–850.
41. **Malar, Vidhya & Mary Mettilda Bai, Silvester. (2009).** Hepato-Protective Activity of *Phyllanthus emblica* Against Paracetamol Induced Hepatic Damage in Wister Albino Rats. *Afric J Basic Appl Sci*. 1.
42. **Thân Kiều My (2010):** Tiếp tục nghiên cứu về thành phần hoá học và tác dụng sinh học của Giảo Cổ Lam. *Luận văn tốt nghiệp thạc sỹ Dược học* - Đại học dược Hà Nội.
43. **Lin Yu, Jianwei Guo, Guobin Yi, Qian Yu (2013).** Protective Effects of *Gynostemma pentaphyllum* Makino Polysaccharide on Alcoholic Hepatic Injuries. *Advanced Materials Research (Volumes 781-784)*, pp, 668-673.
44. **C. Zhang (2013).** “Protective effect of *Gynostemma Pentaphyllum* polysaccharide on liver injure by carbon tetrachloride in rats,” *Chinese*

Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, vol. 19, no. 1, pp. 244–247.

45.张四杰, 钱正, 刘京晶, 张新风, & 斯金平. (2018). 铁皮石斛花中花色成分抗氧化性和稳定性研究. *中国中药杂志*, 43(10), 7.

46.**Hanxiao Tang, Tianwen Zhao, Yunjie Sheng, Ting Zheng, Lingzhu Fu, Yongsheng Zhang (2017).** Dendrobium officinale Kimura et Migo: A Review on Its Ethnopharmacology, Phytochemistry, Pharmacology, and Industrialization. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, Article ID 7436259, 19 pages.

47.**Guosheng Lin, Dandan Luo, Jingjing Liu, Xiaoli Wu, Jinfen Chen, Qionghui Huang, Lingye Su, Lei Zeng, Hongfeng Wang, Ziren Su (2018).** Hepatoprotective Effect of Polysaccharides Isolated from Dendrobium officinale against Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice via Regulation of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018(5), pp, 1-10.

48.**Zhao, M., & Han, J. (2018).** Dendrobium Officinale Kimura et Migo Ameliorates Insulin Resistance in Rats with Diabetic Nephropathy. *Medical science monitor basic research*, 24, pp. 84–92.

49.**Tang, H., Zhao, T., Sheng, Y., Zheng, T., Fu, L., & Zhang, Y. (2017).** Dendrobium officinale Kimura et Migo: A Review on ++

50.Its Ethnopharmacology, Phytochemistry, Pharmacology, and Industrialization. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2017, 7436259.

51. **Bộ Y tế - Cục khoa học công nghệ và đào tạo (2015)**, Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y thuốc từ dược liệu, Hà Nội. (ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015).

52. **Teschke R. (2018).** "Liver injury by carbon tetrachloride intoxication in 16 patients treated with forced ventilation to accelerate toxin removal via the lungs: A clinical report". *Toxics*, 6 (2), 25.
53. **Đỗ Trung Đàm (2014),** Phương pháp xác định độc tính của thuốc, *Nhà xuất bản y học.*
54. **Litchfield J.T. and Wilcoxon F. (1949).** A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments. *J Pharmacol Exp Ther*, **96(2)**, 99–113.
55. **McGill M.R., Jaeschke H. (2019).** "Animal models of drug-induced liver injury". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865 (5), 1031-1039.
56. **Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина (2009).** “Свободные радикалы и Клеточная хемилюминесценция”. *ная хемилюминесценция Успехи биологической химии*, т. 49, 2009, с. 341–388 341.
57. **Hazelton, G. A., & Lang, C. A. (1980).** Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *The Biochemical journal*, 188(1), pp. 25–30.
58. **WHO (2018).** WHO Technical Report Series, No. 1010, 2018.
59. **WHO (2019).** WHO global report on traditional and complementary medicine 2019, *ISBN 978-92-4-151543-6.*
60. **WHO (2007).** WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.
61. **Attawish, A., Chivapat, S., Phadungpat, S., Bansiddhi, J., Techadamrongsin, Y., Mitrijit, O., Chaorai, B., & Chavalittumrong, P. (2004).** Chronic toxicity of *Gynostemma pentaphyllum*. *Fitoterapia*, 75(6). Pp. 539–551.

62. **B, R., Y, V., J, A., N, H., M, G., & V, R. (2008).** Protective effect of *Phyllanthus emblica* on acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 21(1), pp. 57–62.
63. **Middha, S. K., Goyal, A. K., Lokesh, P., Yardi, V., Mojamdar, L., Keni, D. S., Babu, D., & Usha, T. (2015).** Toxicological Evaluation of *Emblica officinalis* Fruit Extract and its Anti-inflammatory and Free Radical Scavenging Properties. *Pharmacognosy magazine*, 11(Suppl 3), S427–S433.
64. **Golechha, M., Sarangal, V., Ojha, S., Bhatia, J., & Arya, D. S. (2014).** Anti-Inflammatory Effect of *Emblica officinalis* in Rodent Models of Acute and Chronic Inflammation: Involvement of Possible Mechanisms. *International journal of inflammation*, 2014, 178408.
65. **Prescott L. F. (2000).** Paracetamol: past, present, and future. *American journal of therapeutics*, 7(2), pp. 143–147.
66. **National Center for Biotechnology Information (2022).** PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminophen. Retrieved February 10, 2022
67. **Dienstag, J. L., & Isselbacher, K. J. (2005).** Liver and biliary tract disease. *Harrison's principle of internal medicine*. pp. 1808–80.
68. **Tatiya, A. U., Surana, S. J., Sutar, M. P., & Gamit, N. H. (2012).** Hepatoprotective effect of poly herbal formulation against various hepatotoxic agents in rats. *Pharmacognosy research*, 4(1), pp. 50–56.
69. **Badmus J.A., Adedosu T.O., Fatoki J.O., et al (2011).** "Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of *Mangifera indica*". *Acta Pol Pharm*, 68 (1), 23-29.
70. **Singh, M. K., Dwivedi, S., Yadav, S. S., Sharma, P., & Khattri, S. (2014).** Arsenic-Induced Hepatic Toxicity and Its Attenuation by Fruit

Extract of *Emblica officinalis* (Amla) in Mice. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 29(1), pp. 29–37.

71. **S.K. Shukla, V. Kumar (2013)**. Bioactive Foods and Supplements for Protection against Liver Diseases. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease*, Elsevier. Chapter 36.

72. **Wei Luo, Mouming Zhao, Bao Yang, Jiaoyan Ren, Guanglin Shen, Guohua Rao (2011)**. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. *Food Chemistry*, Volume 126, Issue 1, ISSN 0308-8146. Pp. 277-282.

73. **Sakagami H., Kishino K., et al. (2009)**, "Selective antibacterial and apoptosismodulating activities of mastic", *In Vivo*, 23(2), pp. 215-23.

74. **Ngamkitidechakul C., Jaijoy K., et al. (2010)**, "Antitumour effects of *Phyllanthus emblica* L.: induction of cancer cell apoptosis and inhibition of in vivo tumour promotion and in vitro invasion of human cancer cells", *Phytother Res*, 24(9), pp.1405-13.

75. **Chi-Cheng Lu, Shu-Han Yang, et al. (2016)**, "Inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* L. on hepatic steatosis and liver fibrosis in vitro", *Journal of Functional Foods*, 20(9), pp. 20-30.

76. **Shivananjappa M. M., Joshi M. K. (2012)**, "Influence of *Emblica officinalis* aqueous extract on growth and antioxidant defense system of human hepatoma cell line (HepG2)", *Pharm Biol*, 50(4), pp. 497-505.

77. **Ngoc-Hieu Nguyen, Thi Kim Quy Ha, Jun-Li Yang, Ha Thanh Tung Pham, Won Keun Oh (2021)**. Triterpenoids from the genus *Gynostemma*: Chemistry and pharmacological activities, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 268. 2021,113574,ISSN 0378-8741.

78. **Chou, S. C., Chen, K. W., Hwang, J. S., Lu, W. T., Chu, Y. Y., Lin, J. D., Chang, H. J., & See, L. C. (2006)**. The add-on effects of

Gynostemma pentaphyllum on nonalcoholic fatty liver disease. *Alternative therapies in health and medicine*, 12(3), pp. 34–39.

79.张玉林, 蒋笑平, 黄河湍, 施志欣 (2001), 绞股蓝总皂甙对免疫性肝纤维化大鼠自由基水平的影响, 《河南中医》, 27-28 页

80.Thân Kiều My, Phạm Thanh Kỳ và cộng sự (2012). Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của Saponin chiết xuất từ Giáo cỏ lam. *Nghiên cứu dược thông tin thuốc số 2/2012*. Pp. 46-50.

81.Lin J.M ., Lin c .c . and al (2000), “Antioxidant and hepatoprotective effects of Anoectochilus formosanus and Gynostemma penta-phyllutri’.
Am J Chin Med, 28(1), p. 87-96.

82.严苏晴, 郭静科, 许明明, 周芳, 陈卢杭, & 王强等. (2021). 铁皮石斛的抗氧化性与其脏腑归经作用差异性的研究. *中国中西医结合杂志*, 41(1), 5.

83.Lin Guosheng, Luo Dandan, Liu Jingjing, Wu Xiaoli, Chen Jinfen, Huang Qionghui, Su Lingye, Zeng Lei, Wang Hongfeng, Su Ziren (2018) Hepatoprotective Effect of Polysaccharides Isolated from *Dendrobium officinale* against Acetaminophen-Induced Liver Injury in Mice via Regulation of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018 (5): pp. 1-10.

84.Tang, X., Wei, R., Deng, A., & Lei, T. (2017). Protective Effects of Ethanolic Extracts from Artichoke, an Edible Herbal Medicine, against Acute Alcohol-Induced Liver Injury in Mice. *Nutrients*, 9(9), pp. 1000.

85. Sun, X., Wang, P., Yao, L. P., Wang, W., Gao, Y. M., Zhang, J., & Fu, Y. J. (2018). Paeonol alleviated acute alcohol-induced liver injury via SIRT1/Nrf2/NF-κB signaling pathway. *Environmental toxicology and pharmacology*, 60, pp. 110–117.

86. Sun, X., Wang, P., Yao, L. P., Wang, W., Gao, Y. M., Zhang, J., & Fu, Y. J. (2018). Paeonol alleviated acute alcohol-induced liver injury via SIRT1/Nrf2/NF- κ B signaling pathway. *Environmental toxicology and pharmacology*, 60, pp. 110–117.
87. Zhang, H. Y., Wang, H. L., Zhong, G. Y., & Zhu, J. X. (2018). Molecular mechanism and research progress on pharmacology of traditional Chinese medicine in liver injury. *Pharmaceutical biology*, 56(1), pp. 594–611.
88. Boye, A., Zou, Y. H., & Yang, Y. (2016). Metabolic derivatives of alcohol and the molecular culprits of fibro-hepatocarcinogenesis: Allies or enemies?. *World journal of gastroenterology*, 22(1), pp. 50–71.
89. Araújo Júnior, R. F., Garcia, V. B., Leitão, R. F., Brito, G. A., Miguel, E., Guedes, P. M., & de Araújo, A. A. (2016). Carvedilol Improves Inflammatory Response, Oxidative Stress and Fibrosis in the Alcohol-Induced Liver Injury in Rats by Regulating Kupffer Cells and Hepatic Stellate Cells. *PloS one*, 11(2), e0148868.
90. Wang, S., Pacher, P., De Lisle, R. C., Huang, H., & Ding, W. X. (2016). A Mechanistic Review of Cell Death in Alcohol-Induced Liver Injury. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 40(6), pp. 1215–1223.
91. Wei, W., Feng, L., Bao, W. R., Ma, D. L., Leung, C. H., Nie, S. P., & Han, Q. B. (2016). Structure Characterization and Immunomodulating Effects of Polysaccharides Isolated from *Dendrobium officinale*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(4), pp. 881–889.
92. Jeon, S., & Carr, R. (2020). Alcohol effects on hepatic lipid metabolism. *Journal of lipid research*, 61(4), pp. 470–479.

PHỤ LỤC 1

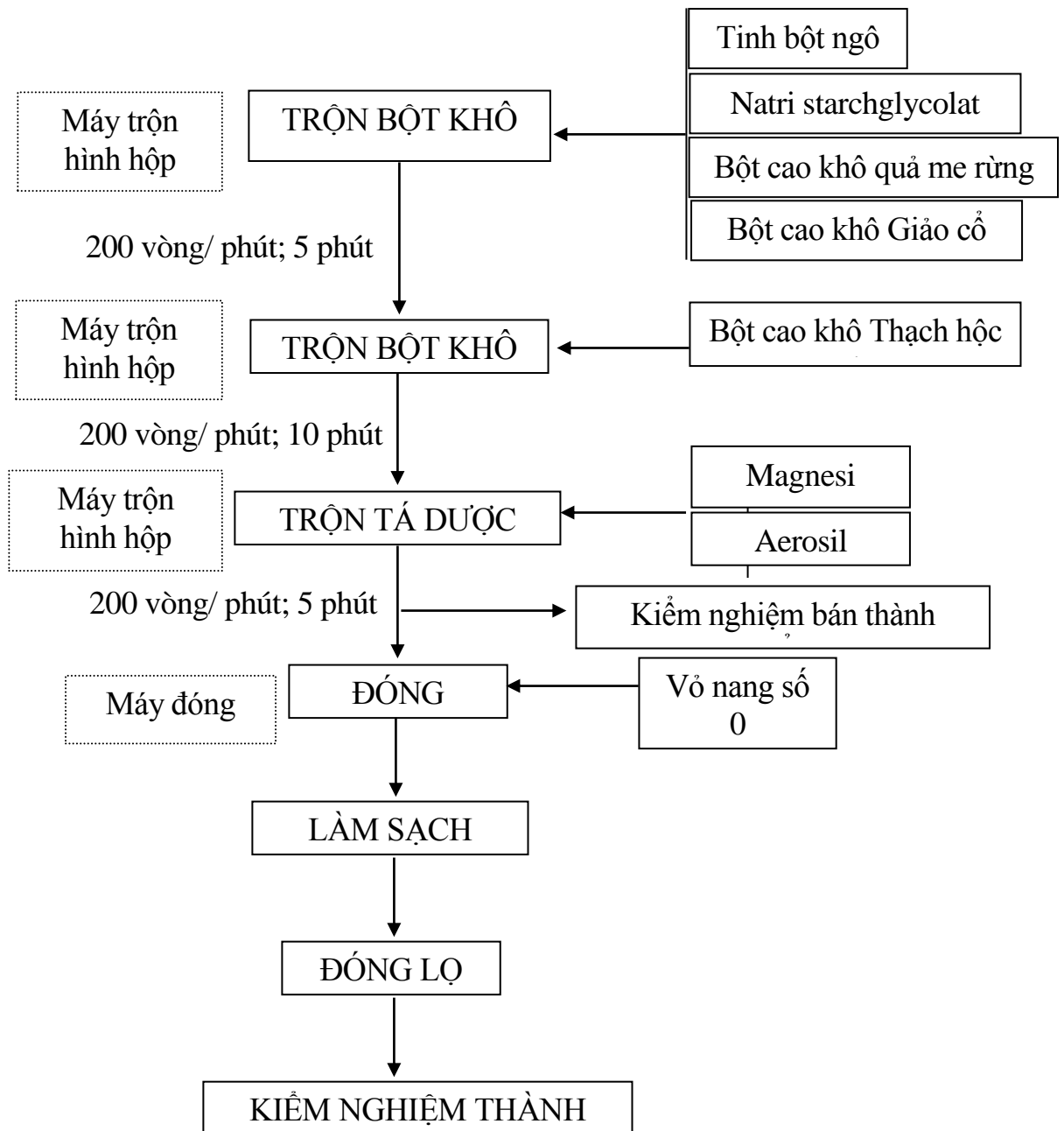
Công thức và quy trình bào chế viên nang GYDENPHY

1. Công thức bào chế viên nang GYDENPHY

Bảng 1. Công thức bào chế cho mẻ 10.000 viên nang GYDENPHY

TT	Thành phần	Tiêu chuẩn	Khối lượng	
			1 viên (mg)	10.000 viên (g)
1	Bột cao khô Quả Me rừng	TCCS	224	2240
2	Bột cao khô Giảo cổ lam	TCCS	90	900
3	Bột cao khô Thạch học tía	TCCS	86	860
4	Tinh bột ngô	BP 2014	20	200
5	Natri starchglycolat	BP 2014	20	200
6	Magnesi stearat	BP 2014	7	70
7	Aerosil	USP 38	3	30
8	Vỏ nang cứng số 0	TCCS		

2. Quy trình bào chế viên nang GYDENPHY



Hình 1. Sơ đồ các giai đoạn bào chế viên nang GYDENPHY

PHỤ LỤC 2

HỌC VIỆN QUẢN Y
VIỆN NC Y DƯỢC HỌC QS
PHÒNG KIỂM NGHIỆM HVQY

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả phân tích chi có giá trị đối với mẫu đem thử)

Số: 05/KN-20

Mẫu Phân tích : Viên nang **Gydenphy**
Số đăng ký :
Nơi sản xuất : Trung tâm nghiên cứu ứng dụng sản xuất TPCN- Học Viện Quản Y
Số kiểm soát : 010520 Ngày sản xuất: 27/9/2019 Hạn dùng: 09/2022
Nơi gửi mẫu : Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam
Yêu cầu phân tích : Kiểm nghiệm chất lượng theo TCCS
Ngày nhận mẫu: 08/8/2020 Số đăng ký KN: 05/20MG
Người nhận mẫu : Lương Thế Như

Tình trạng mẫu khi nhận và khi mở niêm phong để phân tích:
Hộp 100 viên nang cứng đựng trong lọ nhựa.

1. Các chỉ tiêu hóa lý				
	Tên tiêu chí	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả
1.1	Tính chất		Cảm quan	Đạt
1.2	Độ đồng đều khối lượng	%	DDVN V, phụ lục 11.6.	Đạt ($\pm 7,5\%$)
1.3	Độ rã	Phút	DDVN V, phụ lục 11.3	Đạt (< 8 phút)
1.4	Định tính			
	Định tính mac róng		Theo TCCS	Đúng
	Định tính gốc cổ lam		Theo TCCS	Đúng
	Định tính thực hợp tửa		Theo TCCS	Đúng
1.5	Định lượng			
	Hàm lượng polyphenol	mg/viên	Theo TCCS	Đạt (4,0mg)
2. Các chỉ tiêu vi sinh				
	Tên tiêu chí	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả
2.1	TSVKHK	Khuẩn lạc/g	DDVN V – Phụ lục 13.6	240
2.2	Coliforms	Khuẩn lạc/g	DDVN V – Phụ lục 13.6	0

Các bản trích sao y kết quả này sẽ không có giá trị nếu không có sự đồng ý của Phòng kiểm nghiệm HVQY

2.2	<i>Coliforms</i>	Khuẩn lạc/g	DDVN V – Phụ lục 13.6	0
2.3	<i>E. coli</i>	Khuẩn lạc/g	DDVN V – Phụ lục 13.6	0
2.4	<i>S. aureus</i>	Khuẩn lạc/g	DDVN V – Phụ lục 13.6	0
2.5	TSBTNM-M	Bào tử/g	DDVN V – Phụ lục 13.6	2
3. Các chỉ tiêu kim loại nặng				
	Tên tiêu chí	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả
3.1	Giới hạn kim loại nặng	ppm	DDVN V – Phụ lục 9.4.8, phương pháp 3	Đạt (< 10 ppm)

Kết luận: Viên nang Gydenphy đem thử đạt các chỉ tiêu chất lượng theo TCCS.

Hà Nội, ngày 16 tháng 09 năm 2020

PHÒNG KIỂM NGHIỆM
HVQY



TS. Chử Văn Mến



Thiếu tướng Hoàng Văn Lương

