

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



NGUYỄN DUY CƯỜNG

**ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ĐIỀU BIẾN
MIỄN DỊCH CỦA VIÊN NANG
LINH LỘC SƠN TRÊN ĐỘNG VẬT
THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



NGUYỄN DUY CƯỜNG

**ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ĐIỀU BIẾN
MIỄN DỊCH CỦA VIÊN NANG
LINH LỘC SƠN TRÊN ĐỘNG VẬT
THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

Chuyên ngành: Y học cổ truyền

Mã số: 872 0115

Người hướng dẫn khoa học:

HD1: TS. Nguyễn Thị Kim Ngân

HD2: PGS. TS. Phạm Thị Vân Anh

HÀ NỘI, NĂM 2021

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, với tất cả lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Đảng ủy, Ban Giám đốc Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam, Phòng đào tạo Sau đại học, các Bộ môn, Khoa phòng của Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam, là nơi trực tiếp đào tạo và tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và lòng biết ơn sâu sắc đến Đảng ủy, Lãnh đạo Cục Y tế - Bộ Công an, tập thể cấp ủy Lãnh đạo Phòng Tổng hợp đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình tôi học tập, thực hiện và nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Thị Kim Ngân, PGS. TS. Phạm Thị Vân Anh, là những người thầy hướng dẫn trực tiếp luôn theo sát, thường xuyên giúp đỡ, cho tôi nhiều ý kiến quý báu, sát thực trong quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành luận văn này.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể thầy cô, các anh chị kỹ thuật viên, các em sinh viên đang nghiên cứu khoa học tại bộ môn Dược lý, Đại Học Y Hà Nội đã luôn bên tôi, giúp đỡ tôi trong quá trình tôi thực hiện và nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới gia đình, bạn bè đã luôn đồng hành, động viên, chia sẻ với tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Luận văn hoàn thành có nhiều tâm huyết của người viết, song vẫn không thể tránh khỏi sai sót. Xin cảm ơn sự đóng góp chân thành của quý thầy cô, anh chị em bạn bè đồng nghiệp.

Xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả

Nguyễn Duy Cường

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Duy Cương, học viên cao học khóa 12 Học viện Y dược Học cổ truyền Việt Nam, chuyên ngành Y học cổ truyền, xin cam đoan:

Đây là luận văn do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Thị Kim Ngân và PGS. TS. Phạm Thị Vân Anh.

Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam

Các số liệu, 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 trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2021

Tác giả

Nguyễn Duy Cương

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên Tiếng Anh	Tên Tiếng Việt
BC		Bạch cầu
CCR-5	C-C Chemokin receptor 5	
CXC-4	C-X-C receptor 4	
CY	Cyclophosphamid	
CSF	Colony stimulating factor	Yếu tố kích thích tạo cụm
ĐTĐ		Đại thực bào
HCC		Hồng cầu cừu
IL	Interleukin	
INF	Interferon	
Invitro		Thí nghiệm trong ống nghiệm
Invivo		Thí nghiệm trong cơ thể sống
KTMD		Kích thích miễn dịch
NK	Natural kill cell	Tế bào diệt tự nhiên
OA		Ovalbumin, albumin lòng trắng trứng gà với Al(OH) ₃
TNF	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoại tử u
TGF-β	Transforming growth factor β	Yếu tố tăng trưởng gây biến chuyển β
Tc	Cytotoxic T cell	Tế bào T độc
Th	Helper T cell	Tế bào T hỗ trợ
TLLTĐ		Trọng lượng lách tương đối
TLTƯTĐ		Trọng lượng tuyến ức tương đối
TNF	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoại tử khối u

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tổng quan Miễn dịch theo Y học hiện đại.....	3
1.1.1. Khái niệm.....	3
1.1.2. Phân loại miễn dịch.....	3
1.2. Suy giảm miễn dịch.....	11
1.2.1. Suy giảm miễn dịch tiên phát.....	12
1.2.2. Hệ miễn dịch đặc hiệu.....	12
1.2.3. Hệ miễn dịch không đặc hiệu.....	16
1.2.4. Suy giảm miễn dịch liên quan đến nhiễm trùng.....	17
1.2.5. Suy giảm miễn dịch liên quan đến quá trình lão hóa.....	18
1.2.6. Suy giảm miễn dịch liên quan đến các bệnh lý ác tính và các bệnh khác.....	18
1.3. Tổng quan suy giảm miễn dịch theo Y học cổ truyền.....	20
1.3.1. Khái niệm.....	20
1.3.2. Bệnh danh.....	22
1.3.3. Bệnh nguyên.....	22
1.3.4. Các thể lâm sàng.....	23
1.4. Những nghiên cứu trong nước và trên thế giới về tăng cường miễn dịch và suy giảm miễn dịch.....	26
1.4.1. Trên thế giới.....	26
1.4.2. Tại Việt Nam.....	28
1.5. Viên nang Linh lộc sơn.....	29
1.5.1. Phân tích thành phần viên nang Linh lộc sơn theo tác dụng dược lý.....	29
1.5.2. Thành phần viên nang Linh lộc sơn theo Y học cổ truyền.....	31
CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	32

2.1. Chất liệu nghiên cứu	32
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	33
2.3. Địa điểm, thời gian nghiên cứu.....	33
2.4. Dụng cụ, hóa chất nghiên cứu.....	33
2.5. Phương pháp nghiên cứu.....	34
2.6. Phương pháp đánh giá kết quả nghiên cứu	36
2.6.1. Đánh giá tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch chung.....	36
2.6.2. Đánh giá tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu.....	37
2.7. Biến số, chỉ số trong nghiên cứu.....	37
2.8. Phương pháp xử lý số liệu.....	38
2.9. Sai số và biện pháp khống chế sai số	38
2.10. Đạo đức trong nghiên cứu	38
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	40
3.1. Kết quả về tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch chung	40
3.2. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu	49
3.2.1. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào T.....	49
3.2.2. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào B.....	55
CHƯƠNG 4:	57
4.1. Đánh giá tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch chung.	57
4.1.1. Mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid	57
4.1.2. Lựa chọn chứng dương.....	59
4.1.3. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên các chỉ số chung của hệ miễn dịch ...	60

4.2.	Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu	65
4.2.1.	Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào B.....	65
4.2.2.	Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào T	67
4.2.3.	Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch theo YHCT	70
	KẾT LUẬN	72
	KIẾN NGHỊ	73
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	
	PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG BIỂU VÀ SƠ ĐỒ

Bảng 2.1. Thành phần viên nang Linh lộc sơn	32
Sơ đồ 2.1. Nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng Cyclophosphamid..	35
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên trọng lượng lách tương đối.	40
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên trọng lượng tuyến ức tương đối.....	42
Bảng 3.3. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức.....	43
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi.....	44
Bảng 3.5: Ảnh hưởng của Linh lộc sơn lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi	46
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn đến phản ứng bì với kháng nguyên OA	49
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên IL-2 trong máu ngoại vi	51
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên nồng độ TNF – α trong máu ngoại vi.....	53
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên nồng độ IgM trong máu ngoại vi.....	55

ĐẶT VẤN ĐỀ

Miễn dịch là lĩnh vực được ứng dụng nhiều trong y học và ngày càng phát triển khẳng định vai trò của nó trong các bệnh tự miễn hoặc suy giảm miễn dịch. Hệ miễn dịch có vai trò bảo vệ cơ thể trước các tác nhân gây bệnh. Hiện nay, bệnh lý liên quan đến suy giảm miễn dịch ngày càng gia tăng [1],[2].

Miễn dịch trị liệu có vai trò nhất định trong điều trị những bệnh lý này. Bảo vệ và nâng cao hệ miễn dịch của cơ thể có vai trò rất quan trọng trong điều trị các bệnh tự miễn, bệnh ung thư, bệnh mạn tính. Các chất kích thích miễn dịch có nguồn gốc rất đa dạng [2]. Chất kích thích miễn dịch có nguồn gốc sinh học: sản phẩm tiết của các tế bào miễn dịch có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch như các interleukin (IL-2), interferon (interferon α , β) và các yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt, ĐTB (GMCSF)..., gọi chung là các cytokin [2],[3]. Các chất KTMD có nguồn gốc từ vi sinh vật, cấu thành hay chất chuyển hóa của một hoặc nhiều loại vi khuẩn, virus, ký sinh trùng, nấm như BCG,... Các chất này có hiệu quả tốt trong việc tăng cường hệ miễn dịch, tuy nhiên còn nhiều tác dụng không mong muốn. Bên cạnh đó, các thuốc có nguồn gốc sinh học giá thành còn đắt, bệnh suy giảm miễn dịch thường kéo dài, nên chi phí cho một ca bệnh thường rất tốn kém kinh tế và thời gian. Thuốc có nguồn gốc hóa dược có độc tính cao, ảnh hưởng đến chức năng gan thận, một số trường hợp còn gặp tai biến trên lâm sàng [5],[6].

Việt Nam với nền Y học cổ truyền lâu đời, truyền thống sử dụng các cây con làm thuốc vô cùng phong phú, đặc biệt là các thuốc bổ dưỡng tăng cường sức khỏe. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm kiếm chất kích thích miễn dịch nguồn gốc YHCT nhằm tăng thêm sự lựa chọn cho người thầy thuốc đồng thời cung cấp thêm phương pháp điều trị hạn chế được các tác dụng không mong muốn cho người bệnh là rất cần thiết.

Linh lộc sơn dựa trên bài thuốc kinh nghiệm trong đó có sự kết hợp của các vị thuốc Nhân sâm, Nhung hươu, Hoài sơn, Sâm cau, Ba kích, Hà thủ ô do theo lý luận y học cổ truyền có tác dụng ích khí, bổ thận sinh tinh. Do đó Linh lộc sơn có tác dụng tăng cường sức khỏe, tăng cường miễn dịch [7],[8]. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nghiên cứu một cách đầy đủ về bài thuốc này. Vì vậy, để có cơ sở khoa học chính xác trước khi đưa viên nang vào thử nghiệm lâm sàng đồng thời tiến hành những thử nghiệm trên động vật thực nghiệm nhằm minh chứng cho tác dụng của thuốc, chúng tôi tiến hành đề tài **“Đánh giá tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang Linh lộc sơn trên động vật thực nghiệm”** với 2 mục tiêu:

- 1. Đánh giá tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch chung.*
- 2. Đánh giá tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu.*

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan Miễn dịch theo Y học hiện đại

1.1.1. Khái niệm

Miễn dịch là khả năng của cơ thể nhận ra và loại bỏ các vật lạ (kháng nguyên). Hệ miễn dịch là một hệ thống bảo vệ vật chủ gồm nhiều cấu trúc và quá trình sinh học của cơ thể nhằm bảo vệ chống lại bệnh tật. Để được coi là hoạt động bình thường, hệ thống miễn dịch phải phát hiện được rất nhiều yếu tố, gọi là mầm bệnh, có thể là từ virus đến ký sinh trùng, và phải phân biệt chúng với những mô khỏe mạnh của cơ thể [1],[29].

1.1.2. Phân loại miễn dịch

Đáp ứng miễn dịch ở cơ thể con người chia thành 2 loại: đáp ứng miễn dịch tự nhiên và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

Miễn dịch tự nhiên

Miễn dịch tự nhiên là khả năng tự bảo vệ sẵn có và mang tính di truyền trong các cơ thể. Đó là khả năng tự bảo vệ của một cá thể có ngay từ lúc mới sinh, không đòi hỏi phải có sự tiếp xúc trước của cơ thể với kháng nguyên của vật lạ (không cần có giai đoạn mẫn cảm). Cơ chế này phát huy tác dụng dù là kháng nguyên xâm nhập lần đầu hay những lần sau, nhưng nó có vai trò quan trọng ở lần đầu tiên vì lúc này đáp ứng miễn dịch đặc hiệu chưa phát huy tác dụng. Trong nhiều trường hợp miễn dịch tự nhiên là giai đoạn mở đầu cho miễn dịch đặc hiệu [1],[11],[12].

Các hàng rào đáp ứng miễn dịch tự nhiên:

Hàng rào vật lý: Đó là da và niêm mạc có tác dụng ngăn cách nội môi của cơ thể với môi trường xung quanh. Da lành lặn, không bị tổn thương sẽ cản trở sự xâm nhập của kháng nguyên, đặc biệt lớp tế bào ngoài cùng (sừng hoá) luôn được bong ra và đổi mới tạo ra một cản trở vật lý trước sự xâm

nhập của kháng nguyên. Niêm mạc gồm một lớp tế bào có tác dụng cản trở sự xâm nhập của kháng nguyên lạ, vì ngoài tính đàn hồi như da, nó còn được phủ bởi một lớp chất nhầy. Chất nhầy do những tuyến dưới niêm mạc tiết ra tạo nên màng bảo vệ làm cho vi khuẩn và các vật lạ không bám thẳng được vào tế bào, mà sự bám này là điều kiện tiên quyết để chúng có thể xâm nhập vào sâu hơn. Một số niêm mạc như mắt, miệng... thường xuyên được rửa sạch bởi các dịch tiết loãng. Một số niêm mạc khác như niêm mạc đường hô hấp lại có các vi nhung mao luôn rung động cản bụi mang theo vi sinh vật và các vật lạ, không cho chúng vào phế nang và đẩy ra khỏi phế quản cùng với các phản xạ ho và hắt hơi [1],[11],[12].

Hàng rào hóa học: Da và niêm mạc ngoài tác dụng cản trở cơ học chúng còn được tăng cường bởi một số yếu tố hoá học. Trên da có các chất tiết: acid lactic, acid béo của mồ hôi và tuyến mỡ dưới da mà các vi khuẩn không tồn tại lâu được. Tại niêm mạc chất nhầy bảo vệ bề mặt tế bào khỏi bị enzyme của virus tác động. Dịch tiết của các tuyến như nước mắt, nước bọt, nước mũi, sữa... có chứa nhiều lysozym có tác dụng trên vỏ của một số vi khuẩn. Khi kháng nguyên vượt qua được hàng rào da và niêm mạc sẽ gặp phải hàng rào hoá học ngay bên trong cơ thể, đó là dịch nội môi, huyết thanh có chứa lysozym, protein phản ứng C, các thành phần của bổ thể, interferon... Protein phản ứng C là một protein trong huyết thanh có nồng độ tăng cao trong viêm cùng với sự có mặt của ion calci, có tác dụng đối với phế cầu trùng và cố định bổ thể. Bổ thể là một hệ thống gồm nhiều thành phần, bản chất là các chuỗi poly peptid được hoạt hoá theo một trình tự nhất định, khi được hoạt hoá mỗi thành phần của nó sẽ được cắt ra ít nhất là 2 thành phần, mỗi phần có tác dụng riêng. Ví dụ phần C3a và C5a có tác dụng hoá ứng động bạch cầu, gây giãn mạch... Phần C3b, C5b dính vào vi khuẩn giúp cho tế bào thực bào dễ tiếp cận và tiêu diệt vi khuẩn. Interferon là một họ protein được sản xuất bởi nhiều loại tế bào có đặc tính chống một cách không đặc hiệu các

virus, làm cản trở sự xâm nhập và nhân lên của virus. Những tế bào bị nhiễm virus lại có khả năng sinh ra interferon thấm vào các tế bào xung quanh, giúp các tế bào không bị virus xâm nhập tiếp [1],[11],[12].

Hàng rào tế bào: Đây là hàng rào quan trọng và phức tạp nhất. Các tế bào có khả năng thực bào đã được Mechnikoff phát hiện ra từ những năm đầu của thế kỷ XX, gồm hai loại: Tiểu thực bào và đại thực bào. Không những trong máu, trong nội môi có tế bào thực bào mà trên niêm mạc cũng có rất nhiều tế bào có khả năng thực bào di tản từ nội môi ra. Tiểu thực bào là những bạch cầu hạt trung tính. Đại thực bào cũng bắt nguồn từ tuỷ xương, phân hoá thành mono bào ở máu hoặc di tản đến các mô trở thành các tế bào của hệ thống võng nội mô. [1],[11],[12].

Hàng rào thể chất: là tổng hợp tất cả các đặc điểm hình thái và chức năng của cơ thể. Những đặc điểm đó khá bền vững, có tính di truyền quyết định tính phản ứng của cơ thể trước các yếu tố xâm nhập. Chính hàng rào này đã tạo nên sự khác nhau giữa loài này với loài khác, giữa cá thể này với cá thể khác, trước sự tấn công của các vật lạ. Hàng rào thể chất đã tạo nên sự khác biệt về sức đề kháng, tính nhạy cảm giữa các cá thể, các loài.

Viêm không đặc hiệu: Tất cả các cơ chế bảo vệ kể trên có thể thấy ở một hiện tượng rất hay gặp đó là viêm không đặc hiệu (viêm cấp) với biểu hiện là phản ứng tuần hoàn và phản ứng tế bào với các triệu chứng sưng, nóng, đỏ, đau, nhằm tiêu diệt và loại bỏ các tác nhân xâm nhập.

Miễn dịch đặc hiệu

Miễn dịch đặc hiệu (miễn dịch đặc hiệu) là trạng thái miễn dịch xuất hiện khi cơ thể đã có tiếp xúc với kháng nguyên. Kháng nguyên được đưa vào chủ động hay ngẫu nhiên. Miễn dịch đặc hiệu có thể có được khi truyền các tế bào có thẩm quyền miễn dịch hoặc truyền kháng thể vào cơ thể [11],[12].

Hệ thống đáp ứng miễn dịch đặc hiệu:

Để loại trừ kháng nguyên lạ khi xâm nhập vào cơ thể, hệ thống đáp ứng miễn dịch đặc hiệu sử dụng hai phương thức: Đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Cả hai phương thức đáp ứng miễn dịch đều trải qua 3 bước: Nhận diện, hoạt hoá và hiệu ứng

Bước nhận diện kháng nguyên: Khi kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể sống sẽ gặp sức đề kháng đầu tiên của cơ thể là đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Trong phản ứng bảo vệ này, đại thực bào đóng một vai trò rất quan trọng. Nếu hiện tượng thực bào là một phần của đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu thì đồng thời cũng là bước khởi đầu của đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đại thực bào có chức năng xử lý và trình diện kháng nguyên. Những kháng nguyên lạ sau khi bị các tế bào thực bào tiêu trong túi thực bào thì một số sản phẩm giáng hoá của chúng được đưa ra ngoài màng thực bào kết hợp với phân tử MHC II (Phức hợp hoà hợp mô chủ yếu) để trình diện cho các tế bào có thẩm quyền miễn dịch. Lympho bào là những tế bào sẽ tham gia vào đáp ứng miễn dịch đặc hiệu [11],[12],[16].

Bước hoạt hoá: Các lympho bào có receptor tương ứng với tế bào thực bào trình diện (TCR đối với lympho bào T và BCR đối với lympho bào B) sẽ tiếp nhận kháng nguyên. Khi có sự liên kết giữa hai tế bào như thế sẽ tạo ra quá trình hoạt hoá các lympho bào. Nếu là lympho bào B sẽ hình thành đáp ứng miễn dịch dịch thể, nếu là lympho bào T thì sẽ hình thành đáp ứng miễn dịch tế bào. Tế bào trí nhớ: Một số lympho bào B và T đã được miễn cảm sẽ trở thành các tế bào trí nhớ, nếu tiếp xúc lại với kháng nguyên đã gây miễn cảm sẽ tạo ra đáp ứng miễn dịch với cường độ mạnh hơn và thời gian duy trì đáp ứng nhanh và dài hơn [12],[16].

Bước hiệu ứng: Tạo ra các kháng thể hoặc các tế bào T dưới lớp da tiêu diệt kháng nguyên. Khi kháng nguyên được trình diện cho tế bào lympho B thì tế bào B được hoạt hoá (trực tiếp nếu kháng nguyên không phụ thuộc

tuyên ức hoặc gián tiếp qua lympho bào Th nếu kháng nguyên phụ thuộc tuyên ức) và sẽ biệt hoá thành tương bào sản xuất ra kháng thể dịch thể gọi là globulin miễn dịch viết tắt là Ig. Các Ig khi đổ vào dịch nội môi có thể lưu hành trong đó một thời gian, một số có ái tính với tế bào hạt ái kiềm, một số kết hợp với kháng nguyên có khả năng hoạt hoá bổ thể và làm giải phóng các hoá chất trung gian. Những hiện tượng này được thấy trong phản ứng viêm đặc hiệu. Khi đại thực bào trình diện kháng nguyên cho tế bào lympho T (kháng nguyên phụ thuộc tuyên ức) làm cho những tế bào này được miễn cảm trở thành những tế bào T hoạt hoá và một số trở thành tế bào trí nhớ. Tế bào lympho T hoạt hoá sản xuất ra những chất tương tự như globulin miễn dịch, nhưng chỉ có phần hoạt động kết hợp với kháng nguyên là lộ ra khỏi bề mặt của tế bào. Sự kết hợp kháng nguyên ngay trên bề mặt tế bào sẽ kích thích lympho bào tiết ra các lymphokin.

Sự điều hoà đáp ứng miễn dịch: Cũng như mọi đáp ứng của cơ thể sống, đáp ứng miễn dịch một khi xảy ra chịu sự điều hoà phức tạp do nhiều loại tế bào tham gia. Đáng chú ý là T helper (Th: hỗ trợ) và T Suppressor (Ts: T ức chế) và các chất lymphokin [11],[12],[16].

Phân loại miễn dịch đặc hiệu

Miễn dịch đặc hiệu được chia làm hai loại là miễn dịch thể dịch (còn gọi là miễn dịch qua trung gian kháng thể) và miễn dịch tế bào (hay miễn dịch qua trung gian tế bào)

* *Miễn dịch dịch thể* (humoral immunity): do các tế bào lympho B đảm nhiệm với các globulin miễn dịch lưu hành trong các dịch IgG, IgM, IgA, IgE, IgD.

- Kháng thể IgG: có nồng độ cao nhất trong huyết thanh. Phân tử IgG là một monomer gồm hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ. IgG có thể thấy cả trong lòng mạch và ở ngoài lòng mạch. IgG là kết quả miễn dịch đặc hiệu sau khi tiếp xúc với kháng nguyên.

- Kháng thể IgM: IgM monomer xuất hiện trên bề mặt tế bào B. Loại IgM này được phát hiện ở trên bề mặt của 90% số tế bào B trong máu ngoại vi và có vai trò sinh học như một thụ thể dành cho kháng nguyên. IgM là lớp globulin miễn dịch đầu tiên được tổng hợp ở trẻ sơ sinh. Cấu trúc pentamer của IgM làm cho lớp kháng thể này có một số tính chất riêng biệt [11],[12].

- Kháng thể IgA: là lớp globulin miễn dịch chính trong dịch ngoại tiết sữa, nước bọt, nước mắt, dịch nhầy khí phế quản, đường tiết niệu, sinh dục, đường tiêu hóa.

- Kháng thể IgE: nồng độ trong huyết thanh rất nhỏ. Các kháng thể IgE gây ra các phản ứng quá mẫn tức thì với phản ứng của hen, mày đay và sốc phản vệ.

- Kháng thể IgD: được phát hiện lần đầu tiên ở một bệnh nhân bị đa u tủy mà protein đa u tủy của bệnh này không phản ứng với huyết thanh kháng isotype kháng lại cacsisotype đã biết lúc đó là IgG, IgM, IgA.

* *Miễn dịch qua trung gian tế bào*: do các tế bào lympho T đảm nhận với các dưới nhóm chúng: T_{CDH} , T_c , T_s , T_h và các cytokin do chúng tiết ra.

- Chức năng chính của Tế bào T_h :

Tế bào lympho TCD4 gây viêm (T_{h1}) có khả năng nhận diện phức hợp KN – MCH lớp II trên đại thực bào nhiễm để hoạt hóa đại thực bào nhiễm, từ đó đại thực bào hoạt hóa mới có thể tiêu diệt tác nhân gây bệnh.

Tế bào lympho TCD4 hỗ trợ (T_{h2}) có khả năng nhận diện phức hợp KN – MCH trên tế bào trình diện kháng nguyên rồi tiết ra cytokin (IL2, IL6, INF) để kích thích tế bào T gây độc thành tế bào T có hiệu lực (T_c). Từ đó tế bào T_c mới có khả năng ly giải tế bào đích.

- Chức năng chính của tế bào T_c :

Bằng cách ly giải tế bào đích, tế bào T_c có khả năng giết chết các vi sinh vật phát triển trong bào tương mà chủ yếu là virus và một số vi khuẩn. Mặt khác chúng cũng có khả năng giết chết các tế bào ung thư và các tế bào ghép.

Tế bào TCD8 gây độc cũng sản xuất TNF – γ và cả TNF – α để kích hãm sự nhân lên của virus, làm tăng sự xuất hiện các phân tử MHC lớp I và hoạt hóa đại thực bào.

Các tế bào lympho điều hòa miễn dịch thông qua các cytokin: IL2, 3, 4, 6, IFN γ , TNF α ...

Cytokin thuộc họ yếu tố hoại tử khối u (tumor necrosis factor: TNF) hoạt động dưới dạng protein tam trùng phân (trimer). TNF – α là đại diện tiêu biểu cho họ cytokin này. Đây là một yếu tố hoạt hóa tế bào nội mô mạch máu rất mạnh và tăng tính thấm thành mạch. Hiệu ứng này làm tăng các IgG, Bỏ thể và các tế bào đi vào tổ chức gây viêm cục bộ. TNF – α còn có tác dụng toàn thân gây sốt, huy động các chất chuyển hóa và gây sốc [11],[12].

Những đặc điểm cơ bản của đáp ứng miễn dịch đặc hiệu:

Tính đặc hiệu: Kháng thể dù là dịch thể hay tế bào đều đặc hiệu với một epitop kháng nguyên nhất định, ví như chìa khoá với ổ khoá. Tuy vậy nếu có một kháng nguyên có cấu trúc tương tự như kháng nguyên đặc hiệu có thể xảy ra phản ứng chéo.

Tính đa dạng: Số lượng epitop kháng nguyên có trong tự nhiên là vô cùng lớn, vậy mà cơ thể gặp phải vẫn có đủ kháng thể đặc hiệu cho từng loại. Đó là do tính đa dạng về mặt cấu trúc phân cảm thụ của kháng thể.

Trí nhớ miễn dịch: Khi kháng nguyên vào lần 1 và được trình diện cho lympho bào thì dòng này được phân triển, trong đó có một số giữ lại hình ảnh của cấu trúc kháng nguyên để cho đáp ứng lần hai, lần ba... Vì thế đáp ứng miễn dịch lần sau có thời gian tiềm tàng ngắn hơn, cường độ đáp ứng mạnh hơn, thời gian duy trì đáp ứng dài hơn [11],[12].

Sự điều hoà: Hệ thống miễn dịch tự điều hoà thông qua các thông tin do các tế bào tiết ra như phân tử bám dính, cytokin, Ig.

Khả năng phân biệt bản chất kháng nguyên: Trong cuộc đấu tranh sinh tồn hệ miễn dịch giúp cho cá thể sinh vật biết phân biệt kháng nguyên là của

mình thì dung nạp, còn kháng nguyên lạ thì loại bỏ. Đó là cứu cánh của đáp ứng miễn dịch.

Các cơ quan tham gia đáp ứng miễn dịch

Cơ quan lympho trung ương

Tuyến ức

Tuyến ức là nơi trưởng thành của tế bào T. Vùng tủy chứa dày đặc tế bào T lympho và vùng vỏ chứa ít tế bào hơn nhưng chủ yếu là tế bào lympho. Tế bào lympho trong tuyến ức còn gọi là tế bào tuyến ức, là tế bào T ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Hầu hết các tế bào T non đều đi vào vỏ tuyến ức, khi trưởng thành chúng sẽ đi vào vùng tủy, do đó vùng tủy chứa chủ yếu tế bào T đã trưởng thành. Chỉ có tế bào T trưởng thành mới đi qua khỏi tuyến ức để vào máu và mô lympho ngoại biên [1],[11],[12].

Tủy xương

Tủy xương là nơi sản xuất tất cả tế bào máu lưu động kể cả tế bào lympho non. Đây là nơi trưởng thành của tế bào B. Tủy đỏ là loại tủy được tìm thấy trong một cấu tạo lưới dạng mô xốp nằm giữa các bè dài. Những tế bào tiền thân sẽ phát triển đến trưởng thành và đi ra khỏi tủy qua một hệ thống dày đặc các xoang mạch để vào hệ tuần hoàn. Khi tủy xương bị tổn thương, hoặc khi có các nhu cầu tạo ra nhiều tế bào máu mới thì gan và lách cũng bị huy động để làm chức năng tạo máu [1],[11],[12].

Cơ quan lympho ngoại biên

Hạch bạch huyết và hệ thống bạch mạch

Hạch bạch huyết là những mô cơ quan nhỏ dạng nốt của mô lympho được tìm thấy dọc theo hệ thống bạch mạch ở khắp cơ thể. Một hạch bạch huyết có vùng vỏ bên ngoài và vùng tủy bên trong. Chúng chứa các tế bào bạch huyết và có chức năng làm bộ lọc hoặc bẫy giữ lại các phần tử ngoại lai, có thể bị viêm và sưng khi làm nhiệm vụ này [1],[11],[12].

Lách

Lách là vị trí chủ yếu của đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên đến từ máu. Các tiểu động mạch nhỏ được bao bọc bởi các tế bào lympho, đó là vùng tế bào T của lách. Các nang lympho một số có trung tâm mầm được gắn liền với vùng tế bào T giống như trong hạch. Nang lympho là vùng tế bào B. Khi chemokine được sản xuất thì tế bào T được thu hút đến vùng tế bào T nằm bên cạnh các tiểu động mạch, còn tế bào T đi vào các nang. Lách là cơ quan lọc máu quan trọng, do đó khi mất mạch cơ thể rất dễ bị nhiễm trùng với các vi khuẩn có vỏ bọc như phế cầu, màng não vì những vi khuẩn này thường được loại bỏ nhờ sự opsonin hóa và thực bào, mất mạch chức năng này không thực hiện được [1],[11],[12].

Hệ thống miễn dịch da

Da chứa một hệ thống miễn dịch được chuyên môn hóa cao gồm lympho và tế bào trình diện kháng nguyên. Da là cơ quan rộng nhất của cơ thể nên là hàng rào vật lý quan trọng nhất ngăn cách cơ thể với vi sinh vật và các vật thể lạ của môi trường bên ngoài.

Hệ thống miễn dịch niêm mạc

Trong lớp niêm mạc của hệ tiêu hóa và hô hấp có tụ tập nhiều tế bào lympho và các tế bào trình diện kháng nguyên có vai trò khởi động đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên đường tiêu hóa và hô hấp. Lớp biểu mô niêm mạc là hàng rào quan trọng ngăn cản sự xâm nhập của các vi sinh vật [1],[11],[12].

1.2. Suy giảm miễn dịch

Suy giảm miễn dịch là sự thất bại của hệ thống miễn dịch để bảo vệ khỏi bệnh tật hoặc bệnh ác tính. Suy giảm miễn dịch bao gồm

Suy giảm miễn dịch nguyên phát là do các khiếm khuyết di truyền hoặc phát triển trong hệ thống miễn dịch. Những dị tật này có khi biểu hiện sinh ra nhưng có thể khi lớn lên mới xuất hiện.

Suy giảm miễn dịch thứ phát hoặc mắc phải là sự mất chức năng miễn dịch do tiếp xúc với các tác nhân gây bệnh, các yếu tố môi trường, ức chế miễn dịch hoặc lão hóa [1],[11],[12].

1.2.1. Suy giảm miễn dịch tiên phát

- Giảm gammaglobulin liên kết giới tính X (X-linked agammaglobulinemia)

- SGMD thông thường (common variable immunodeficiency)

- SGMD nặng phức tạp (severe combined immunodeficiency) còn gọi là bệnh không có tế bào lympho hay “trẻ bong bóng” – “boy in a bubble” (trẻ sống trong túi bong bóng vô trùng, cách ly môi trường bên ngoài)

Suy giảm miễn dịch thứ phát

Là hậu quả của một hay nhiều thành phần thiết yếu của hệ miễn dịch bị mất đi hoặc hoạt động không bình thường biểu hiện từ lúc sinh do những khiếm khuyết di truyền. Những khiếm khuyết này có thể gặp trong cơ chế miễn dịch đặc hiệu hoặc không đặc hiệu. Chúng được phân loại dựa theo vị trí tổn thương trên con đường phát triển hoặc biệt hóa của hệ miễn dịch.

Những cá thể suy giảm miễn dịch thường nhạy cảm với nhiều tác nhân nhiễm trùng khác nhau. Loại nhiễm trùng thường gặp tùy thuộc bản chất của suy giảm miễn dịch của từng cá nhân [1],[11],[12].

1.2.2. Hệ miễn dịch đặc hiệu

Có rất nhiều tình trạng suy giảm miễn dịch là hậu quả của những khiếm khuyết trong quá trình biệt hóa của tế bào mầm và có thể ảnh hưởng đến tế bào T, tế bào B và/hoặc các globulin miễn dịch thuộc các lớp và phân lớp khác nhau.

** Các rối loạn của tế bào mầm đa chức năng dòng tủy hoặc dòng lympho*

Một chứng bệnh rất hiếm gặp nhưng gây tử vong liên quan đến sự giảm nặng nề hoặc không có tế bào lympho và tế bào hạt trong khi đó hồng cầu và tiểu cầu vẫn bình thường.

** Rối loạn của các tế bào mầm dòng lympho*

Suy giảm miễn dịch kết hợp trầm trọng: Khoảng 50% số bệnh nhân này có suy giảm miễn dịch liên kết nhiễm sắc thể giới tính và một nửa còn lại được di truyền trên nhiễm sắc thể thường. Các chứng suy giảm miễn dịch này được đặc trưng bằng một tình trạng mất miễn dịch tế bào T và B cũng như không có (hoặc có rất ít) tế bào lympho T và B lưu hành trong máu. Trên phim X quang chụp ngực thường không thấy bóng của tuyến ức. Bệnh nhân mắc chứng suy giảm miễn dịch kết hợp trầm trọng này thường rất nhạy cảm với rất nhiều tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, virus, nấm và động vật nguyên sinh.

Chẩn đoán thường dựa vào đếm số lượng tế bào T và B cũng như định lượng globulin miễn dịch trong máu. Điều trị bằng ghép tủy xương hoặc cấy gene nhờ vector chuyển gene là một loại virus sao chép ngược.

** Rối loạn tế bào T*

Hội chứng DiGeorge: Đây là tình trạng suy giảm miễn dịch liên quan đến tế bào T được biết cận kề nhất. Hội chứng này còn được biết dưới một số tên gọi khác như: bất sản/thiếu sản tuyến ức bẩm sinh hoặc suy giảm miễn dịch kèm thiếu năng giáp trạng. Nguyên nhân của hội chứng này là đột biến mất đoạn trên nhiễm sắc thể 22. Đoạn mất có kích thước khác nhau ở từng bệnh nhân nhưng kích thước đoạn mất không tương quan với độ nặng của bệnh. Hội chứng này đi kèm với thiếu năng cận giáp, bệnh tim bẩm sinh, tật tai ở vị trí thấp hơn bình thường và miệng như miệng cá. Những khiếm khuyết này là hậu quả của sự phát triển không bình thường của phôi từ tuần thứ 6 đến tuần thứ 10 trong thai kỳ khi mà tuyến cận giáp, tuyến ức, môi, tai và cung động mạch chủ đang được hình thành. Không phải tất cả trẻ mắc hội

chúng này đều có bất sản tuyến ức. Ghép tuyến ức vào giai đoạn sớm của thai (khoảng từ tuần 13 đến tuần 14 của thai kỳ) có thể có tác dụng điều trị. Ghép tuyến ức muộn hơn sẽ gây thải ghép. Ở bệnh nhân mắc hội chứng DiGeorge nặng, ngay cả việc chủng ngừa bằng các vaccine sống giảm độc lực cũng gây nên nhiễm trùng [1],[11],[12].

** Suy giảm chức năng tế bào T kèm suy giảm chức năng tế bào B*

Chứng thất điều - giãn mạch (Ataxia-telangiectasia): Đây là một khiếm khuyết của tế bào T kèm với mất khả năng phối hợp điều hòa các động tác (thất điều) và giãn các mạch máu nhỏ ở mắt (giãn mạch). Số lượng tế bào T cũng như chức năng của chúng suy biến ở các mức độ khác nhau. Số lượng tế bào B và nồng độ IgM có thể bình thường hoặc thấp. Nồng độ IgG thường giảm và IgA giảm đáng kể (trong 70% trường hợp). Những bệnh nhân này có nguy cơ cao mắc bệnh ác tính nhất là bệnh bạch cầu. Nguyên nhân bệnh là do hiện tượng đứt gãy trên nhiễm sắc thể 14.

Hội chứng Wiskott-Aldrich: Hội chứng này biểu hiện bằng tình trạng suy giảm chức năng tế bào T trong khi số lượng của quần thể tế bào này vẫn ở mức bình thường. Theo thời gian, chức năng của tế bào T càng ngày càng suy giảm nặng hơn. Nồng độ IgM thường giảm trong khi IgG vẫn giữ ở mức bình thường. Cả IgA lẫn IgE đều tăng. Trẻ trai mắc chứng này thường bị bệnh chàm rất nặng và xuất huyết dạng mảng dưới da (do khiếm khuyết số lượng và chức năng tiểu cầu). Trẻ thường rất dễ mắc các nhiễm trùng sinh mủ [1],[11],[12].

Khiếm khuyết MHC (Hội chứng bạch cầu trần: Bare leukocyte syndrome): Hội chứng này biểu hiện bằng một khiếm khuyết phức hợp hòa hợp mô chính (MHC) lớp II trên tế bào trình diện kháng nguyên. Vì sự chọn lọc các tế bào CD4 tại tuyến ức phụ thuộc sự hiện diện của phân tử MHC này do đó bệnh nhân thường có số lượng CD4 giảm và dễ bị nhiễm trùng.

** Rối loạn tế bào lympho B*

Chứng giảm gamma – globulin máu liên kết giới tính ở nữ nhi: còn được gọi là giảm globulin máu Bruton hoặc chứng không có globulin máu, chứng bệnh này là thể nặng nề nhất trong các chứng bệnh gây giảm globulin máu ở người. Lượng tế bào B cũng như nồng độ của tất cả các globulin miễn dịch đều rất thấp. Chẩn đoán dựa trên đếm số lượng tế bào B và định lượng nồng độ các globulin miễn dịch.

Chứng giảm gammaglobulin máu thoáng qua: Trẻ mới sinh có nồng độ IgG tương đương với nồng độ IgG ở mẹ. Thời gian bán hủy của IgG là 30 ngày do đó nồng độ của chúng sau sinh sẽ giảm đi ở trẻ tuy nhiên vào lúc 3 tháng tuổi trẻ bắt đầu tổng hợp được IgG của riêng mình. Vì một lý do nào đó mà sự tổng hợp này ở một số trẻ chỉ bắt đầu sau 2 đến 3 năm. Nguyên nhân có thể là do tế bào T kém phát huy chức năng hỗ trợ của chúng. Khoảng trống trong quá trình tổng hợp IgG này được điều trị bằng liệu pháp bổ sung gamma-globulin.

Thiếu hụt IgA: Thiếu hụt IgA là thể suy giảm miễn dịch thường gặp nhất. Khoảng 20% bệnh nhân thiếu hụt IgA cũng có nồng độ IgG thấp. Những bệnh nhân thiếu hụt IgA thường dễ mắc các bệnh nhiễm trùng đường tiêu hóa, mắt và tai mũi họng. Các đối tượng này cũng có nguy cơ cao mắc bệnh tự miễn, các bệnh ác tính hệ lympho. Khoảng 30 đến 40% bệnh nhân có lưu hành kháng thể kháng IgA và những bệnh nhân này không nên điều trị bằng γ -globulin [1],[11].

Suy giảm miễn dịch tăng IgM: những bệnh nhân mắc chứng bệnh này có nồng độ IgG và IgA thấp nhưng IgM lại cao một cách bất thường. Cơ thể mắc bệnh không thể chuyển sản xuất IgM sang sản xuất các lớp globulin miễn dịch khác nguyên nhân là do khiếm khuyết trên tế bào CD4. Bệnh nhân rất dễ mắc các bệnh nhiễm trùng sinh mủ. Điều trị bằng γ -globulin tĩnh mạch.

Hội chứng tăng sinh lympho liên kết giới tính: mặc dù khoảng 10% bệnh nhân có biểu hiện chứng giảm gamma globulin bẩm sinh nhưng hầu hết bệnh nhân đều bình thường cho đến khi nhiễm virus Epstein – Barr (EBV). Nhiễm EBV dần dần đưa đến bệnh tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm trùng (infectious mononucleosis) rất nặng nề kèm với suy gan, hội chứng tăng sinh tế bào B, thiếu máu bất sản và giảm gamma globulin máu. Khoảng 75% trẻ chết trước 10 tuổi. Nguyên nhân là do bất thường trên chuỗi dài của một nhiễm sắc thể X ở mẹ được truyền cho con trai và trẻ trai này biểu hiện bệnh [1],[11],[12].

1.2.3. Hệ miễn dịch không đặc hiệu

Suy giảm miễn dịch không đặc hiệu tiên phát bao gồm các khiếm khuyết của các tế bào thực bào và tế bào diệt tự nhiên cũng như hệ thống bổ thể.

* *Khiếm khuyết hệ thống thực bào*

Khiếm khuyết của các tế bào thực bào về số lượng và/hoặc chức năng có thể làm tăng khả năng nhạy cảm với nhiều nhiễm trùng khác nhau.

Giảm bạch cầu trung tính theo chu kỳ (*cyclic neutropenia*): Cứ sau thời gian khoảng 3 tuần bình thường thì số lượng bạch cầu trung tính lưu hành trong máu lại giảm thấp trong vòng 1 tuần. Trong thời gian 1 tuần này bệnh nhân dễ mắc nhiễm trùng. Khiếm khuyết này dường như là do rối loạn sự điều hòa trong quá trình tạo bạch cầu trung tính.

Bệnh tạo u hạt mãn tính (*chronic granulomatous disease*): được đặc trưng bằng phì đại các hạch bạch huyết và gan lách to. Khả năng tiêu diệt mầm bệnh nội bào của bạch cầu suy giảm. Ở đa số bệnh nhân, khiếm khuyết này là do bất thường ở NADPH oxidase.

Suy giảm khả năng bám dính bạch cầu: Do bất thường ở các receptor hoặc phân tử integrin nên bạch cầu kém đáp ứng với các tín hiệu hóa ứng động.

** Hội chứng Chediak-Higashi:*

Hội chứng này biểu hiện bằng giảm tốc độ tiêu diệt mầm bệnh nội bào, giảm các hoạt động do hóa ứng động kèm với mất khả năng hòa màng tiêu thể-thực bào. Đôi khi tế bào diệt tự nhiên cũng rối loạn chức năng cũng như bệnh có thể kèm với các bất thường về tiểu cầu và thần kinh.

** Các rối loạn của hệ thống bổ thể:*

Các bất thường hệ thống bổ thể cũng có thể làm tăng nhạy cảm với nhiễm trùng. Có nhiều bất thường di truyền ảnh hưởng đến nhiều thành phần của hệ thống bổ thể làm tăng khả năng mắc bệnh nhiễm trùng. Điển hình nhất và nặng nề nhất là suy giảm C3 do giảm tổng hợp C3 hoặc do suy giảm yếu tố I hoặc yếu tố H

Suy giảm miễn dịch thứ phát

Là sự suy giảm của hệ miễn dịch do các bệnh xảy ra ở một người trước đó khỏe mạnh bình thường. Tình trạng suy giảm này có thể được phục hồi nếu tình trạng bệnh hoặc nguyên nhân gây suy giảm miễn dịch được giải quyết. Suy giảm miễn dịch thứ phát thường gặp hơn suy giảm miễn dịch tiên phát và thường xảy ra ở bệnh nhân nằm viện. Gần như hầu hết các bệnh lý nặng và kéo dài đều có thể gây xáo trộn hệ thống miễn dịch ở một mức độ nào đó.

1.2.4. Suy giảm miễn dịch liên quan đến nhiễm trùng

Các nhiễm trùng do vi khuẩn, virus, động vật nguyên sinh, giun sán và nấm có thể gây nên những bất thường của tế bào T, tế bào B, bạch cầu trung tính và đại thực bào. Điển hình nhất trong nhóm bệnh này là Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS). Các suy giảm miễn dịch thứ phát cũng thường thấy trong những bệnh lý ác tính [12].

Bất thường miễn dịch trong AIDS

Bất thường tế bào lympho: giảm số lượng tế bào T hỗ trợ (CD4) và hậu quả của nó là đảo ngược tỉ suất CD4+/CD8+. Số lượng tế bào diệt tự nhiên (NK) bình thường nhưng chức năng suy giảm.

Bất thường chức năng: Bệnh nhân AIDS tăng cao nguy cơ mắc các nhiễm trùng cơ hội như *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans*, herpes simplex, herpes zoster, cytomegalovirus, *Mycobacterium avium-intracellulare*... Những bệnh nhân này cũng có nguy cơ cao mắc bệnh ác tính như sarcoma Kaposi. Đáp ứng quá mẫn muộn (delayed hypersensitivity response) đối với các kháng nguyên thông thường như uốn ván, bạch hầu, kháng nguyên liên cầu khuẩn, tuberculin, kháng nguyên *Candida*, trichophyton... cũng giảm sút ở bệnh nhân AIDS.

1.2.5. Suy giảm miễn dịch liên quan đến quá trình lão hóa

Các rối loạn này bao gồm suy biến dần vỏ tuyến ức, giảm số lượng tế bào và kích thước tuyến ức, giảm chức năng các tế bào ức chế do đó tăng cao nguy cơ tự hoạt hóa, giảm chức năng tế bào CD4. Ngược lại, chức năng tế bào B ở một mức độ nào đó lại tăng lên.

1.2.6. Suy giảm miễn dịch liên quan đến các bệnh lý ác tính và các bệnh khác

Suy giảm tế bào B thường gặp trong bệnh đa u tủy (multiple myeloma), chứng macroglobin máu Waldenstrom, bệnh bạch cầu kinh dòng lympho và các lymphoma biệt hóa tốt. Bệnh Hodgkin và các khối u đặc tiến triển cũng làm giảm chức năng tế bào T. Tất cả các tác nhân hóa trị liệu dùng trong điều trị ung thư đều có tác dụng phụ ức chế miễn dịch.

Một số bệnh lý khác có thể gây nên suy giảm miễn dịch có thể nêu tên như bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm, đái tháo đường, suy dinh dưỡng protein năng lượng, bông, xơ gan do rượu, viêm khớp dạng thấp, suy giảm chức năng thận.

Mô hình gây suy giảm miễn dịch

Các chất có tác dụng điều biến, tăng cường hoặc điều hòa miễn dịch thường được nghiên cứu trên các mô hình làm suy giảm miễn dịch do những chất này thường ít có tác dụng trên động vật bình thường không suy giảm miễn dịch [6]. Mô hình suy giảm miễn dịch được gây ra bởi các tác nhân gây suy giảm miễn dịch bao gồm: Thuốc hoặc hóa chất; yếu tố vật lý như phóng xạ, bức xạ ion; các tác nhân vi sinh vật như nấm, vi khuẩn, virus.

Hóa chất thường được sử dụng để gây suy giảm miễn dịch gồm corticoid, cyclophosphamid (CY), kháng purin, methotrexat..., trong đó mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY được sử dụng nhiều, chủ yếu trên chuột nhắt trắng hoặc chuột cống trắng [6],[23],[25],[26]. Cyclophosphamid là chất gây độc tế bào được sử dụng nhiều nhất trong nhóm alkyl hóa để điều trị ung thư [27].

Bằng cách alkyl hóa sợi DNA dẫn tới ức chế phân bào. Do vậy, tác dụng CY mạnh nhất lên các mô có tốc độ phân chia nhanh như tủy xương. Tuy nhiên, CY cũng có tác dụng lên các mô khác có tốc độ phân chia chậm hơn (ví dụ gan, thận, tổ chức lympho trưởng thành như lách, tuyến ức) [27].

Có nhiều cách sử dụng cyclophosphamid trong việc gây mô hình suy giảm miễn dịch.

CY có thể được sử dụng ở một liều cao hoặc nhiều liều nhỏ để gây suy giảm miễn dịch. Phan Thị Phi Phi và cộng sự nghiên cứu mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY đã kết luận: dùng CY liều duy nhất 200 mg/kg là tối ưu nhất [23].

Một số nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng CY nhiều liều nhỏ để gây tình trạng suy giảm miễn dịch kéo dài trên động vật. Vigila và cộng sự (2008) sử dụng CY liều 20 mg/kg trong 10 ngày liên tục để gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng, kết quả cho thấy có sự suy giảm tỷ lệ lympho bào T và B trong máu ngoại vi [26]. Chen và cộng sự (2012) sử dụng CY liều 80

mg/kg trong 3 ngày liên tục để gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng, đánh giá sau 10 ngày, kết quả cho thấy sự giảm trọng lượng tương đối lách, làm giảm IL-2, IL-6, IFN- γ [28]. Kyakulaga và cộng sự (2013) sử dụng CY liều 10 mg/kg đường uống trong 30 ngày để gây suy giảm miễn dịch kéo dài trên chuột cống trắng [28].

Một phương pháp khác để gây suy giảm miễn dịch cũng được áp dụng là tia xạ. Tia xạ tác động lên các bộ phận của cơ thể thông qua năng lượng bức xạ, dẫn tới biến đổi các cấu trúc sinh học, phân hủy tạo ra các gốc tự do trong mô và tế bào. Các gốc tự do sinh ra có thể tạo ra các gốc tự do thứ cấp và tiếp tục tấn công các tổ chức, gây chết tế bào. Tác dụng của tia xạ tác động lên hầu hết các cơ quan trong cơ thể, tuy nhiên máu và cơ quan tạo máu là tổ chức đầu tiên bị ảnh hưởng bởi tia xạ, gây ra tình trạng suy giảm miễn dịch [6],[36].

Tia γ (gamma) là tia bức xạ có khả năng đâm xuyên lớn nhất, do vậy thường được sử dụng trong các mô hình suy giảm miễn dịch. Có thể sử dụng tia γ để gây suy giảm miễn dịch chọn lọc trên hệ lympho hoặc không chọn lọc bằng đường chiếu toàn thân. Phạm Thị Vân Anh (2011) sử dụng thành công tia γ liều 1Gy trong 6 ngày liên tục (tổng liều là 6Gy) trên chuột nhắt trắng để gây suy giảm miễn dịch [6]. Tổng liều 5Gy được Xiaogang và cộng sự (2010) sử dụng để gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng [36].

1.3. Tổng quan suy giảm miễn dịch theo Y học cổ truyền

1.3.1. Khái niệm

Hoạt động của hệ miễn dịch tạo ra sức đề kháng cho cơ thể nhằm đối phó với nguyên nhân gây bệnh. Sức đề kháng có vai trò quan trọng với sức khỏe, nó chính là “màng chắn” giúp kháng lại các yếu tố gây bệnh. Hoạt động hệ miễn dịch phải mạnh mẽ, mới duy trì tốt sức đề kháng bệnh tật.

YHCT có hai khái niệm là Chính khí và Tà khí. Chính khí là khả năng phản ứng của cơ thể đối với các nguyên nhân gây bệnh. Tà khí là các nguyên

nhân gây bệnh. Chính khí đầy đủ thì tà khí khó có khả năng gây bệnh. Vì vậy, hai nguyên tắc điều trị lớn của YHCT là PHÙ CHÍNH và TRỪ TÀ.

Trong đó phù chính là dùng các thuốc bổ dưỡng nâng cao chính khí, nâng cao sức đề kháng của cơ thể [7],[31].

Chính khí của cơ thể gồm có 4 mặt chính là Âm, Dương, Khí, Huyết.

Phương thức tác động của chính khí bao gồm:

- Tự mình điều tiết để thích ứng với sự thay đổi của nội và ngoại hoàn cảnh để duy trì cân bằng âm dương.

- Kháng lại tà khí để phòng bệnh hoặc khi cơ thể mắc bệnh thì khu tà và đưa ra ngoài.

- Khả năng cơ thể tự hồi phục sau khi bị bệnh hoặc khi cơ thể bị hư nhược thì tự mình thay đổi và hồi phục sức khỏe.

Từ đó có thể nói Chính khí của Đông y tương quan gần với sức đề kháng của Tây y. Hay nói một cách khác: Lý luận về Chính khí của YHCT và quan điểm miễn dịch học có nhiều điểm gần nhau. Vì vậy, việc tăng cường, bồi bổ chính khí của YHCT cũng có nghĩa tương đương với tăng cường hoạt động hệ miễn dịch của cơ thể.

Một số nghiên cứu cũng đã chứng minh, thuốc YHCT có tác dụng trên miễn dịch tế bào, miễn dịch dịch thể và điều tiết miễn dịch.

Có nhiều báo cáo tổng kết nghiên cứu: thuốc bổ ích khí huyết âm dương đa phần có tác dụng tăng cường miễn dịch.

YHCT đã nghiên cứu 4 bài thuốc: Tứ quân, Tứ vật, Lục vị, Sâm phụ thang. Kết quả cho thấy các bài thuốc trên có khả năng xúc tiến chuyển hoá limpho bào, kích thích phản ứng miễn dịch tế bào và hình thành kháng thể. Các vị thuốc như Nhân sâm, Hoàng kỳ, Linh chi, Bô cốt chỉ, Câu kỷ tử, Mạch môn... có tác dụng rõ rệt lên hệ thống miễn dịch [30].

1.3.2. Bệnh danh

Y học cổ truyền không có bệnh danh cụ thể cho bệnh về suy giảm miễn dịch. Tuy nhiên, nếu căn cứ vào các chứng trạng lâm sàng thì các biểu hiện suy giảm miễn dịch tương ứng với chứng **Chính khí bất túc hay Hư lao** của y học cổ truyền.

Chính khí bất túc là bao gồm Âm, Dương, Khí, Huyết, Tinh, Tân dịch cùng với các tạng phủ công năng hư nhược dẫn đến cơ thể sức đề kháng kém, ngoại tà xâm nhập vào gây ra bệnh tật.

Thiên ‘Thông Bình Hư Thực Luận’ (Tổ Vấn 28) viết: “Tinh khí đoạt thì tinh bị hư” [41].

Thiên ‘Điều Kinh Luận’ (Tổ Vấn 62) viết: “Dương hư thì ngoại hàn, âm hư thì nội nhiệt” [41].

Nạn thứ 14 (Nạn Kinh) nêu lên triệu chứng và phương pháp điều trị chứng Ngũ tổn, cho thấy mối quan hệ hư tổn của ngũ tạng.

Sách “Kim Quỹ Yếu Lược” có nguyên một chương bàn riêng về chứng hư lao, trong đó bàn đến mạch, chú trọng chứng dương hư, đề ra các phương pháp trị như ôn bổ, phù chính khu tà, trừ ứ sinh tân... là những nguyên tắc cơ bản để trị hư lao [40].

Đời nhà Kim, Nguyên điều trị bệnh hư lao thường dùng phương pháp cam ôn bổ Tỳ, tư âm nhuận Phế, thanh Tâm giáng hỏa và bổ dưỡng Can Thận.

Đời nhà Minh, sách “Lý Hư Nguyên Giám” nêu lên lý luận về chứng lý hư và chú trọng đến ba tạng Phế, Tỳ và Thận.

Đời nhà Thanh, sách “Bất Cư Tập” ngoài các yếu tố nêu trên, còn thêm trường hợp ngoại cảm gây nên hư tổn.

1.3.3. Bệnh nguyên

Chính khí bất túc hay Hư lao là chứng bệnh khá phức tạp do nhiều nguyên nhân gây nên sự giảm sút chức năng các tạng phủ sinh ra âm dương

khí huyết đều hư nhưng do có sự thiên thắng nên biểu hiện lâm sàng có những thể bệnh khác nhau. Những nguyên nhân chủ yếu có :

- Tiên thiên bất túc : Yếu tố bẩm sinh, suy yếu, dị dạng từ trong bụng mẹ, dễ mắc cảm nhiễm ngoại tà, tạng Phế bị bệnh trước, từ ngoại cảm dần dần vào nội thương, lúc đầu có thể bị ở một tạng dần dần lan sang các tạng khác, chuyển thành hư lao. Ngoài ra cơ thể suy yếu dễ nhiễm một số bệnh do di truyền: ngũ trì, ngũ nhuyễn từ tuổi nhỏ phát triển thành hư lao. Cũng có khi do sự phát dục kém, khi trưởng thành, thể lực yếu, ốm đau liên miên hoặc sau khi bệnh thể lực yếu, lâu hồi phục, dương khí và âm huyết ngày càng suy dần dần dẫn đến tổn thương ngũ tạng [4], [32].

- Mắc bệnh ngoại cảm hay nội thương lâu ngày không được chữa trị tốt dẫn đến chức năng tạng phủ suy yếu mà thành hư lao.

- Sinh hoạt, làm việc quá sức, ăn uống thiếu điều độ, uống rượu, hút thuốc, gây thương tổn tỳ phế, không hóa sinh được tinh chất, không sinh được khí huyết. Nguồn sinh ra khí huyết không đủ, không điều dưỡng được tạng phủ bên trong, không làm đầy phần doanh vệ bên ngoài, lại kèm bị ngoại cảm hoặc phòng dục tùy tiện gây tổn thương Can Thận ... đều dẫn đến hư lao.

- Thất tình: như tức giận nhiều hại can, vui mừng quá độ hại tâm, lo nghĩ nhiều hại Tỳ, buồn phiền hại Phế, kinh sợ hại Thận , đều là nguyên nhân về tâm thần làm âm dương mất cân bằng, khí huyết hư tổn, tinh hư lao [4],[32]

1.3.4. Các thể lâm sàng

Khí hư

a- Phế khí hư :

- Chứng trạng: mệt mỏi, hơi thở ngắn, lúc nóng lúc lạnh, dễ ra mồ hôi, dễ mắc bệnh ngoại cảm, ho khan, sắc da trắng nhạt, lưỡi nhạt, mạch Nhuyễn, Nhược.

- Biện chứng: Hơi thở ngắn, ra mồ hôi là dấu hiệu Phế khí yếu, bì phu không kín vững. Lúc nóng lúc lạnh: dinh vệ không điều hòa. Dễ cảm, ho khan, thở yếu: dấu hiệu Phế khí hư không bảo vệ được phần biểu. Sắc mặt nhợt, lưỡi nhợt, mạch Nhược: dấu hiệu hư nhược [4],[32].

- Pháp điều trị : Ích khí cố biểu.

- Phương thuốc: BỔ Phế Thang (Hòa tễ cục phương).

b- Tỳ Khí hư:

- Chứng trạng: mệt mỏi, ăn ít, tiêu lỏng, sắc mặt vàng nhợt, lưỡi nhợt, rêu lưỡi trắng nhuận, mạch Nhược.

- Pháp điều trị: Ích khí kiện Tỳ.

- Phương thuốc: Sâm Linh Bạch Truật Tán (Hòa tễ cục phương).

Huyết hư

a- Tâm huyết hư :

- Chứng trạng: hồi hộp hay quên, mất ngủ, mộng nhiều, sắc mặt tái nhợt kém tươi nhuận, môi lưỡi nhợt, mạch Trầm Tế [4],[32]

- Pháp điều trị: Dưỡng tâm, an thần.

- Phương thuốc: Quy Tỳ Thang (Tế sinh phương)

b- Can huyết hư:

- Chứng trạng: Váng đầu, hoa mắt, ù tai, sườn đau, bứt rứt, tính nóng nảy, phụ nữ kinh nguyệt không đều, sắc mặt tái sạm, môi lưỡi nhợt, mạch Huyền Tế.

- Pháp điều trị : BỔ dưỡng can huyết, hoạt huyết, hóa ứ.

- Phương thuốc: Tứ Vật Thang (Hòa tễ cục phương).

Dương hư

a- Tỳ Dương hư:

- Chứng trạng: sợ lạnh, chân tay lạnh, mệt mỏi, lúc gặp lạnh dễ đau bụng, tiêu chảy, sắc mặt vàng sạm hoặc tái nhợt, lưỡi nhợt, bệu, rêu trắng, mạch Trì, Nhược hoặc Tế Nhược [4],[32].

- Pháp điều trị : Ôn trung, kiện tỳ.

- Phương thuốc: Phụ Tử Lý Trung Thang (Hòa tễ cục phương).

b- Thận Dương hư :

- Chứng trạng: sợ lạnh, chân tay lạnh, lưng gối nhức mỏi, trời lạnh nhức nhiều, di tinh, liệt dương, tiểu nhiều, nước tiểu trong hoặc tiểu gắp khó cầm, sắc mặt tái nhợt, giọng nói yếu, có thể hơi ngắn, hụt hơi, thân lười bệu, sắc nhợt, râu trắng, mạch Trầm Trì.

- Pháp điều trị : Ôn bổ thận dương, dưỡng tinh huyết.

- Phương thuốc: Hữu Quy Hoàn (Cảnh nhạc toàn thư)

Tán bột ngày uống 24g.

Ngoài 2 thể bệnh dương hư trên đây, trên lâm sàng nội khoa thường gặp ngoài những triệu chứng dương hư có thêm triệu chứng chức năng của tâm như hồi hộp, khó thở, hay quên, đau ngực... nhưng hay kết hợp với thận dương hư, Phế dương hư hoặc kèm theo phế khí hư, ít khi biến chứng độc lập.

Âm hư

a- Phế Âm hư:

- Chứng trạng: ho khan, ho có máu, họng khô, miệng khô, có khi khàn giọng, người gầy, da nóng, hay sốt về chiều hay về đêm, mồ hôi trộm gò máu hồng, lưỡi đỏ, khô, ít râu, mạch Tế Sác [4],[32].

- Pháp điều trị: Dưỡng âm, thanh nhiệt, nhuận phế, chỉ khái.

- Phương thuốc: Sa Sâm Mạch Đông Thang (Ôn bệnh điều biện)

b-Tâm Âm hư :

- Chứng trạng: hồi hộp, khó ngủ , hay quên, bứt rứt, ra mồ hôi trộm, miệng lở, lưỡi loét, gò má đỏ, sốt về chiều, lưỡi đỏ, ít râu, mạch Tế Sác.

- Pháp điều trị: Tư âm, thanh nhiệt, dưỡng Tâm, an thần.

- Phương thuốc: Thiên Vương Bổ Tâm Đơn (Thế đặc hiệu phương).

c-Tỳ Vị Âm hư:

- Chứng trạng: miệng khô, môi khô, chán ăn, thích uống nước mát, táo bón nặng, có thể nôn khan, mặt đỏ, lưỡi thon, khô, đỏ, có điểm loét hoặc hình địa đồ, mạch Tế Sác [4],[32].

- Pháp điều trị : Tư dưỡng Tỳ Vị.

- Phương thuốc: Ích Vị Thang (Ôn bệnh điều biện).

d- Can Âm hư:

- Chứng trạng: Đau đầu, chóng mặt, ù tai, mắt khô, sợ ánh sáng, người nóng nảy, dễ giận hoặc gân cơ giật, lưỡi kho, â đỏ tía, mạch Huyền Tế Sác.

- Pháp điều trị : Tư âm, tiềm dương.

- Phương thuốc: Bỏ Can Thang (Thảm Thị Dao Hàm - Phó Nhân Vu)

e- Thận Âm hư:

- Chứng trạng: đau lưng, mỏi gối, chân yếu, má đỏ, ù tai, dễ rụng tóc, lưỡi đỏ thẫm, khô bóng, mạch Trầm Tế.

- Pháp điều trị: Tư bổ thận âm.

- Phương thuốc: Đại Bỏ Âm Hoàn (Đan Khê tâm pháp)

1.4. Những nghiên cứu trong nước và trên thế giới về tăng cường miễn dịch và suy giảm miễn dịch.

1.4.1 Trên thế giới

Rao X.Q và cộng sự nghiên cứu 242 bệnh nhân ung thư có hội chứng tỳ hư thấy rằng một số chỉ số miễn dịch như hoạt tính thực bào của đại thực bào, khả năng chuyển dạng lympho bào, tỷ lệ tạo hoa hồng, số lượng các tế bào T_h , NK thấp hơn so với người cho máu bình thường. Sau khi điều trị bằng “Sinh huyết thang” các chỉ số miễn dịch đều được cải thiện [36].

WHO và cơ quan quản lý dược phẩm Hoa Kỳ công nhận tảo Spirullina có tác dụng hỗ trợ trong phòng chống ung thư, đó là do các hoạt hóa chất tăng cường miễn dịch, chống oxi hóa, bảo vệ tế bào, chống đột biến gen trong tảo. Khi uống tảo Spirullina lượng chất phóng xạ đã được đào thải khỏi đường niệu ở người bị nhiễm xạ rất cao [48].

Yao – Haur KouLi – Ming Yang Kuo đã nghiên cứu chứng minh hợp chất triterpene trong cây xạ đen có đánh giá sinh học chống lại ung thư gan và ung thư biểu mô vòm họng và chống sao chép HIV trong tế bào lympho [49].

Toh, Ding – Fung đã có nghiên cứu chứng minh hấp làm thay đổi thành phần hóa học cũng như các hoạt động sinh học chống tăng sinh của Tam thất. Tam thất có chứa các hợp chất tiềm năng đặc biệt làm tăng thành phần saponin trong điều trị ung thư gan [50].

Hứa Kế Bình dùng bài Phù phi (Nguyên sâm, Hoàng kỳ, Sa sâm, Tam thất, Bách hợp, Mạch môn, Lô căn, Nga truật, Ngô công, Cát cánh, Trần bì...) điều trị 2 - 10 tháng trên 63 bệnh nhân UTP, theo dõi trong 5 năm thấy thuốc có tác dụng cải thiện miễn dịch, giảm nhẹ triệu chứng và kéo dài thời gian sống [46]

Phan Mẫn Cầu dùng Phế phụ phương (Bách hợp, Thục địa, Sinh địa, Nguyên sâm, Mạch môn, Đương quy, Bạch thược, Sa sâm, Tang bạch bì, Hoàng cầm, Mẫu đơn, Tầm sa, Bạch hoa xà thiệt thảo) điều trị 40 bệnh nhân UTP tế bào vảy giai đoạn III - IV có so sánh với nhóm chứng dùng hóa trị liệu. Kết quả, thời gian sống thêm của nhóm dùng thuốc YHCT tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm dùng hóa trị liệu [47].

Matsushita và cộng sự (2006) nghiên cứu về mạng lưới cytokin: nghiên cứu đã được tiến hành trên 26 bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống giai đoạn sớm. Tuy nhiên, thời gian bị bệnh trung bình là 2,1 năm tính từ triệu chứng lâm sàng đầu tiên không phải là biểu hiện Raynaud's và nghiên cứu chưa chọn lọc được các bệnh nhân chưa điều trị. Tác giả sử dụng phương pháp ELISA để phân tích nồng độ trong huyết thanh của 9 cytokin: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1, TNF- α , IFN- γ và TGF- β 1. Nghiên cứu này có ưu điểm là theo dõi sự biến đổi nồng độ cytokin kéo dài trong 6 năm. Qua đó, tác giả đưa ra kết luận: sự dịch chuyển mô hình cytokin của Th2 sang Th1 làm cải thiện

bệnh xơ cứng bì hệ thống và có thể là hướng tốt cho phát triển các phương pháp điều trị bệnh [51].

1.4.2. Tại Việt Nam

Nghiên cứu trên cây nhàu của Phạm Huy Quyến đã chứng minh tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ cây nhàu toàn phần trên chuột nhắt và trên invitro [18]

Nguyễn Gia Chấn nghiên cứu về tác dụng kích thích miễn dịch polysaccarid chiết từ đương quy cho thấy tác dụng hồi phục đáp ứng miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể [21]

Đỗ Quốc Việt đã phân lập và xác định được hai cấu trúc anthraglycosid từ thân cây nhàu, và chứng minh được tác dụng chống ung thư của thành phần hóa học này trong thân cây nhàu [24].

Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Minh Đức (2014) nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của cao xương cá sấu hoa cà cho thấy cao xương CSHC liều 3,77 g/kg có khả năng làm tăng khả năng thực bào, tăng trọng lượng tương đối cơ quan miễn dịch và tăng số lượng bạch cầu tổng, bạch cầu lympho, bạch cầu đơn nhân; trong khi liều 1,89 g/kg chỉ làm tăng khả năng thực bào đạt ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng bệnh lý. Các kết quả này cho thấy cao xương CSHC thể hiện tác dụng tăng cường miễn dịch trong suy giảm miễn dịch do cyclophosphamid gây ra. Tuy nhiên, cao xương CSHC chưa cho thấy hiệu quả điển hình trong thử nghiệm gây suy miễn dịch trung gian tế bào (đáp ứng quá mẫn muộn) [33].

Nguyễn Thị Mỹ Nương và cộng sự (2017), Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của Bài thuốc Nam Địa Long trên chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphomide cho kết quả: trên chuột nhắt trắng bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide (CY), Nam Địa Long liều uống 1,2 g/kg và 2,4 g/kg giúp hạn chế tình trạng giảm khối lượng cơ thể chuột, tăng khối lượng tương đối của lách, tuyền ức và làm tăng 42 – 44 % số lượng bạch cầu,

tăng 48 – 53 % lượng bạch cầu lympho, đặc biệt tăng tỷ lệ phần trăm bạch cầu lympho TCD4 (34–43 %) và lympho TCD8 (35–46 %) so với lô chứng bệnh. Như vậy, bài thuốc Nam Địa Long thể hiện tác dụng kích thích miễn dịch, có tiềm năng phát triển thành sản phẩm hỗ trợ trong hóa trị ung thư [34].

Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông (2020) nghiên cứu Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic – viên nén Giải độc gan Tuệ Linh trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng cho kết quả Livganic liều 0,6g/kg đường uống trong 10 ngày liên tục làm tăng nồng độ IgG máu ngoại vi, làm tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA, tăng đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính [35].

1.5. Viên nang Linh lộc sơn

Viên nang Linh lộc sơn có nguồn gốc từ bài thuốc kinh nghiệm của Lương y Nguyễn Kiều - Hiệu trưởng đầu tiên của Trường Trung học YHCT Tuệ Tĩnh, tiền thân của HV YDHCTVN hiện nay. Bài thuốc đã được sử dụng trên lâm sàng và được Công ty TNHH Bách Thảo Dược sản xuất dưới dạng viên nén [phụ lục].

- Thành phần: Nhân sâm 2g; Nhung hươu 1g; Hoài sơn 10g; Sâm cau 5g; Ba kích 10g; Hà thủ ô đỏ 10g.

- Dạng bào chế: Viên nang cứng.

- Công dụng: ích khí, dưỡng huyết, bổ thận sinh tinh.

- Chủ trị: tăng cường sức đề kháng, sức dẻo dai, nâng cao thể trạng, điều trị suy nhược cơ thể, suy nhược thần kinh, suy giảm miễn dịch.

1.5.1. Phân tích thành phần viên nang Linh lộc sơn theo tác dụng dược lý.

Nhân sâm giúp tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể, tăng cường khả năng thực bào của hệ tế bào võng nội bì, tăng hiệu suất chuyển hóa của tế bào lâm ba và globulin IgM, do đó mà nâng cao tính miễn dịch của cơ thể. Theo tài liệu Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam, những thí nghiệm của

Daugolnikol (1950-1952), Brekman và Phruentov (1954-1957) và Abramow (1953) cũng cho biết Nhân sâm có tác dụng tăng cường sức đề kháng của động vật đối với bệnh tật. Nhân sâm có tác dụng gia tăng quá trình ức chế và gia tăng vỏ não, làm hồi phục bình thường khi hai quá trình trên bị rối loạn, saponin lượng nhỏ chủ yếu làm hưng phấn trung khu thần kinh với lượng lớn có tác dụng ức chế; tác dụng tăng sức lao động trí óc và chân tay chống mỏi mệt, làm tăng hiệu suất hoạt động tư duy và thể lực, chống lão hóa, cải thiện chức năng của não ở người lớn tuổi, tăng khả năng tập trung trí tuệ, tăng trí nhớ; giúp cơ thể tăng khả năng thích nghi, khả năng phòng vệ đối với những kích thích có hại [5],[7],[8].

Sâm cau giúp tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể, giúp giảm ức chế thần kinh, giãn cơ, tăng cường sản xuất nội tiết tố nam testosterone; bảo vệ tế bào thần kinh, dịu căng thẳng; kích thích cơ thể sản sinh tế bào lympho lách, tăng cường chức năng hệ miễn dịch cho cơ thể; tăng khối lượng tuyến ức (tuyến này tăng cường hoạt động ở tuổi dậy thì nhưng dần dần nhỏ lại vào các năm sau đó); tăng cường hệ thống miễn dịch, tăng khả năng thích nghi của cơ thể với các hoạt động liên quan đến việc bảo vệ tế bào [5],[7],[8].

Nhung hươu có tác dụng nâng cao tính miễn dịch của cơ thể, làm tăng hồng huyết cầu, huyết sắc tố và sự tăng sinh của tế bào lưới hồng cầu, tăng bạch cầu. Vị thuốc có tác dụng cường tráng, làm giảm mệt mỏi, nâng cao hiệu lực công tác, cải thiện giấc ngủ, tăng thêm ăn, cải thiện trạng thái suy dinh dưỡng và rối loạn chuyển hóa đạm, cải thiện trạng thái chuyển hóa năng lượng thấp làm cho chuột chịu đựng tốt hơn ở môi trường nhiệt độ cao và nhiệt độ thấp [5],[7],[8].

Hoài sơn có chất muxin hòa tan trong nước; trong điều kiện axit loãng và nhiệt độ phân giải thành chất protit và hydrat cacbon. Có tính chất bổ [5],[7],[8].

Hà Thủ Ô đỏ làm chậm nhịp tim, làm tăng nhẹ lưu lượng máu động mạch vành và bảo vệ được cơ tim thiếu máu; giữ được tuyến ức của chuột nhất già không bị teo mà giữ được mức như lúc chuột còn non, tác dụng này có ý nghĩa chống lão hóa nhưng cơ chế còn cần nghiên cứu thêm [7],[8].

Ba kích có chứa hàm lượng dồi dào các thành phần hóa học hỗ trợ điều trị nhiều bệnh, tăng cường sức khỏe cho con người, có tác dụng tăng sức dẻo dai, tăng sức đề kháng, chống viêm [7],[8].

1.5.2. Thành phần viên nang Linh lộc sơn theo Y học cổ truyền.

Theo y học cổ truyền, Nhân sâm có vị ngọt, hơi đắng, tính hơi hàn có tác dụng đại bổ nguyên khí.

Nhung hươu vị ngọt mặn, tính ôn, quy kinh can thận, có tác dụng ích khí, dưỡng huyết.

Hoài sơn vị ngọt tính bình quy kinh phế tỳ thận, có tác dụng ích khí, bổ tỳ, thận, sinh tân, sáp tinh.

Sâm cau vị cay, ấm, tính nhiệt quy kinh Thận, Can có tác dụng bổ thận tráng dương, cường tráng gân cốt.

Hà Thủ Ô đỏ có vị đắng, chát, tính ấm quy vào kinh Can, Thận có tác dụng bổ Can thận ích tinh huyết.

Ba kích vị cay, ngọt, hơi ôn, quy kinh Thận, có tác dụng bổ thận dương, [7],[30].

Linh lộc sơn gồm 6 vị thuốc trên nên có tác dụng bổ khí, dưỡng huyết, bổ thận sinh tinh.

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

2.1. Chất liệu nghiên cứu

- Chất liệu nghiên cứu: viên nang cứng Linh lộc sơn.
- Đơn vị sản xuất: Công ty TNHH Bách Thảo Dược đạt tiêu chuẩn GMP.

Bảng 2.1. Thành phần viên nang Linh lộc sơn

Thành phần	Tên Latinh	Hàm lượng (mg)	Cao khô hỗn hợp (mg)	Tiêu chuẩn
Nhân sâm	<i>Rhizoma et Radix Ginseng</i>	333,3	480	Vị thuốc đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam xuất bản lần thứ 5; Viên nang đạt tiêu chuẩn cơ sở [phụ lục]
Nhung hươu	<i>Cornu cervi pantotrichum</i>	166,6		
Hoài sơn	<i>Tuber Dioscoreae persimilis</i>	1666,6		
Sâm cau (Thân rễ)	<i>Rhizoma Curculiginis</i>	833,3		
Ba kích (rễ)	<i>Radix Morindae officinalis</i>	1666,6		
Hà thủ ô đỏ (rễ)	<i>Radix fallopiae multiflorae</i>	1666,6		
Tá dược Magnesium stearate, tal vừa đủ 1 viên nang cứng 500mg				

- Liều dùng cho người: 1 viên nang cứng tương đương 500mg, ngày dùng 6 viên chia làm 2 lần

- Cyclophosphamid: dạng thuốc bột, biệt dược Endoxan lọ 200 mg của hãng Baxter, Đức.

- Thuốc chống dương: dạng bột, biệt dược Tetramisole hydrochloride (Levamisol) lọ 5 g của hãng Sigma, Đức. Thuốc được dùng làm đối chứng dương trong nghiên cứu miễn dịch.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, thuần chủng, cả hai giống, nặng 20 ± 2 gam do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp.

Động vật được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước uống tại phòng thí nghiệm Bộ môn Dược lý, Trường đại học Y Hà Nội từ 7 - 10 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu

2.3. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

- Địa điểm: Bộ môn Dược lý Trường Đại học Y Hà Nội

- Thời gian: Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 05 năm 2021 đến tháng 11 năm 2021

2.4. Dụng cụ, hóa chất nghiên cứu

- Hồng cầu cừu (HCC): máu tĩnh mạch cừu được lấy trong điều kiện vô trùng, bảo quản trong dung dịch alsever (glucose 24,6g, natricitrat 9,6g, natriclorid 5,05g, nước cất vừa đủ 1200 ml, pH 6,1), ở nhiệt độ 40C, sử dụng trong thời hạn 2 tuần.

- Hoá chất và máy huyết học tự động Exigo - VET của hãng Exigo, Thụy Điển.

- Kit định lượng IgM, TNF- α của Hãng Invitrogen, 542 Flynn Camarillo, Mỹ.

- Nhũ dịch OA (Ovalbumin + Al(OH)₃): dùng làm kháng nguyên gây miễn cảm cho chuột.

2.5. Phương pháp nghiên cứu, thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm, có đối chiếu với nhóm chứng.

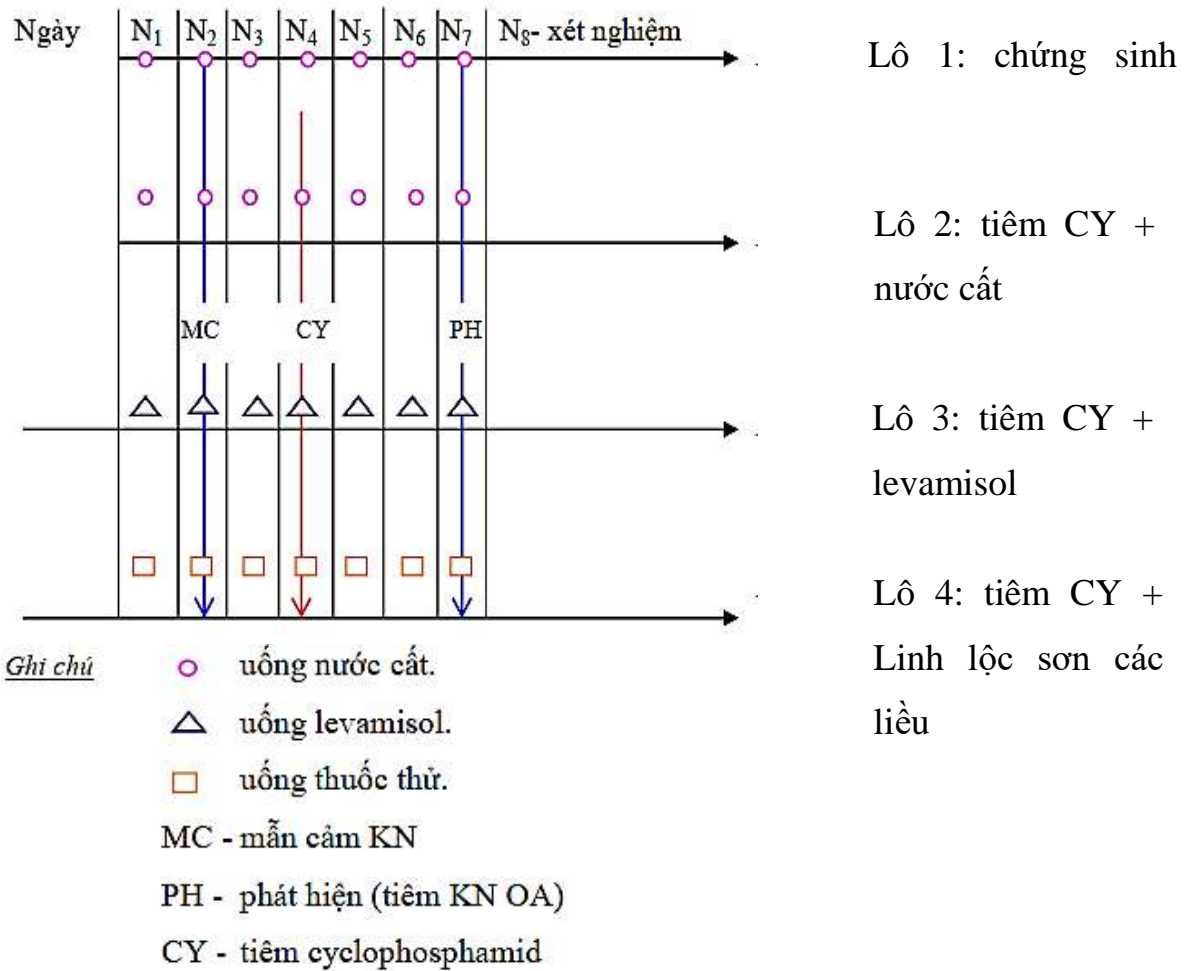
Tiêm màng bụng cyclophosphamid, liều duy nhất 200 mg/kg thể trọng để gây suy giảm miễn dịch [11], [75],[76].

Các bước tiến hành:

Chuột thí nghiệm được chia ngẫu nhiên thành 5 lô:

- Lô 1 (n=10) Chứng sinh học: Uống nước cất
- Lô 2 (n=10) Mô hình: Chuột được tiêm CY liều 200 mg/kg + uống nước cất.
- Lô 3 (n=10) Chứng dương: Chuột được tiêm CY liều 200 mg/kg + uống levamisol liều 100 mg/kg.
- Lô 4 (n=10) CF2 liều 2 mg/kg: Chuột được tiêm CY liều 200 mg/kg + uống Linh lộc sơn liều 8,8g/kg/ngày (tương đương liều điều trị dự kiến trên người).
- Lô 5 (n=10) CF2 liều 4 mg/kg: Chuột được tiêm CY liều + uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg/ngày (gấp 2 lần liều điều trị dự kiến trên người).

Mô hình được tiến hành từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 8. Chuột bắt đầu được uống nước cất, levamisol và thuốc thử liên tục từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7. Ngày thứ 4 của mô hình, tiêm màng bụng cyclophosphamid liều 200mg/kg ở các lô 2, 3, 4 và 5. Ngày thứ 8, giết chuột, lấy máu và các tổ chức lympho để làm xét nghiệm.



Sơ đồ 2.1. Nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng Cyclophosphamid

Trên mô hình nghiên cứu, chuột phải trải qua ba quá trình: mẫn cảm kháng nguyên, ức chế miễn dịch và điều trị thuốc thử.

- *Mẫn cảm kháng nguyên:*

+ Kháng nguyên OA tiêm mũi duy nhất dọc sống lưng chuột liều 0,1 ml/chuột và HCC dung dịch 5%, tiêm màng bụng, thể tích duy nhất 0,5 ml/chuột.

+ Tiêm phát hiện: Kháng nguyên OA và dung dịch NaCl 0,9% được tiêm vào hai gan bàn chân chuột với thể tích 0,05 ml một ngày trước khi giết chuột làm xét nghiệm.

- *Ức chế miễn dịch:*

Dùng tác nhân kinh điển gây tổn thương hệ miễn dịch, tạo máu là CY. CY được sử dụng với liều 200 mg/kg để gây tổn thương hệ thống miễn dịch của chuột.

- *Điều trị thuốc thử:*

+ Chuột ở lô 3 được sử dụng levamisol 100 mg/kg làm thuốc đối chứng dương.

+ Chuột ở các lô 4,5 được uống thuốc thử như trên. Thời gian uống thuốc thử là 7 ngày.

2.6. Phương pháp đánh giá kết quả nghiên cứu

2.6.1. Đánh giá tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch chung.

Chuột được giết, được bộc lộ lách, tuyến ức. Bóc tách lấy toàn bộ lách và tuyến ức và ngâm ngay vào dung dịch nuôi tế bào. Lọc sạch các tổ chức xung quanh, dùng gạc thấm khô rồi đem cân. Ghi lại trọng lượng lách, tuyến ức của từng chuột. Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối bằng tỷ lệ trọng lượng các cơ quan này so với trọng lượng của từng chuột tương ứng

Chỉ số nghiên cứu:

- Trọng lượng lách tương đối.
- Trọng lượng tuyến ức tương đối

Công thức tính là trọng lượng lách, tuyến ức tương ứng với thể trọng chuột.

$$\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức tương đối (\%)} = \frac{\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức (mg)}}{\text{Thể trọng chuột (g)}}$$

- Số lượng bạch cầu chung, bạch cầu hạt trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu mono ở máu ngoại vi.

- Làm giải phẫu vi thể lách – cơ quan lympho ngoại biên.

- Làm giải phẫu vi thể tuyến ức – cơ quan lympho trung ương.

Xét nghiệm giải phẫu vi thể được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu và chẩn đoán sớm Ung thư, do PGS.TS. Lê Đình Roanh đọc và nhận định kết quả

2.6.2. Đánh giá tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu.

** Các thông số đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua tế bào lympho T*

- Đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua phản ứng quá mẫn chậm ở gan bàn chân chuột với kháng nguyên OA.

Trước khi đo kết quả phản ứng quá mẫn chậm với kháng nguyên OA, tiêm 50 μ l kháng nguyên OA (liều phát hiện) vào một bên gan bàn chân chuột, bên còn lại tiêm thể tích tương tự nước muối sinh lý. Sau 24 giờ tiêm kháng nguyên phát hiện, đo bề dày hai gan bàn chân chuột bằng thước palmer.

- Định lượng IL-2 trong máu ngoại biên bằng phương pháp ELISA

- Định lượng nồng độ TNF- α ở máu ngoại vi bằng phương pháp ELISA

** Các thông số đánh giá miễn dịch dịch thể thông qua tế bào lympho B*

Định lượng IgM trong máu ngoại biên bằng phương pháp ELISA.

2.7. Biến số, chỉ số trong nghiên cứu

- Trọng lượng lách tương đối.

- Trọng lượng ức tương đối.

- Vi thể lách và tuyến ức

- Số lượng bạch cầu

- Phản ứng bì với kháng nguyên OA (mm).

- Nồng độ IL-2 trong máu (ng/ml).
- Nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi

2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý bằng phương pháp thống kê y sinh học theo T test - Student và test trước sau (Avant-après). Kết quả được trình bày dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Quy ước:

*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ so với lô chứng sinh học

Δ : $p \leq 0,05$; $\Delta\Delta$: $p \leq 0,01$; $\Delta\Delta\Delta$: $p \leq 0,001$ so với lô mô hình

#: $p \leq 0,05$; ##: $p \leq 0,01$; ###: $p \leq 0,001$ so với lô chứng dương

2.9. Sai số và biện pháp khống chế sai số

- Các chỉ số IL-2, IgM và TNF alpha được đánh giá định lượng trên máy ELISA đạt tiêu chuẩn Labo Dược lý, trường Đại học Y khoa Hà Nội.

- Các phương pháp được xây dựng qui trình chuẩn SOP để hạn chế tối đa các sai số có thể xảy ra trong quá trình xét nghiệm.

+ Động vật khỏe mạnh, cả 2 giống, được chia ngẫu nhiên vào các lô.

+ Qui trình thực hiện các bước thí nghiệm giữa các lô chuột là thống nhất cùng theo SOP.

+ Nhật ký nghiên cứu đầy đủ, lưu trữ số liệu, thông tin bằng sổ ghi chép, chụp ảnh.

+ Xử lý số liệu bằng phần mềm chuyên dụng trên máy tính.

2.10. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên chuột nhắt trắng, số lượng động vật sử dụng trong các mô hình thí nghiệm đủ để thu được kết quả đảm bảo độ tin cậy và đủ xử lý thống kê.

Những chuột chết trong quá trình làm thí nghiệm (nếu có) và số chuột sau khi thí nghiệm hoàn thành đều được xử lý theo đúng quy định rác thải y tế.

Việc lựa chọn động vật thí nghiệm, điều kiện nuôi, chăm sóc và sử dụng động vật đều tuân thủ chặt chẽ theo “Hướng dẫn nội dung cơ bản thẩm định kết quả nghiên cứu tiền lâm sàng thuốc tân dược, thuốc cổ truyền, vắc xin và sinh phẩm y tế” của Bộ y tế.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

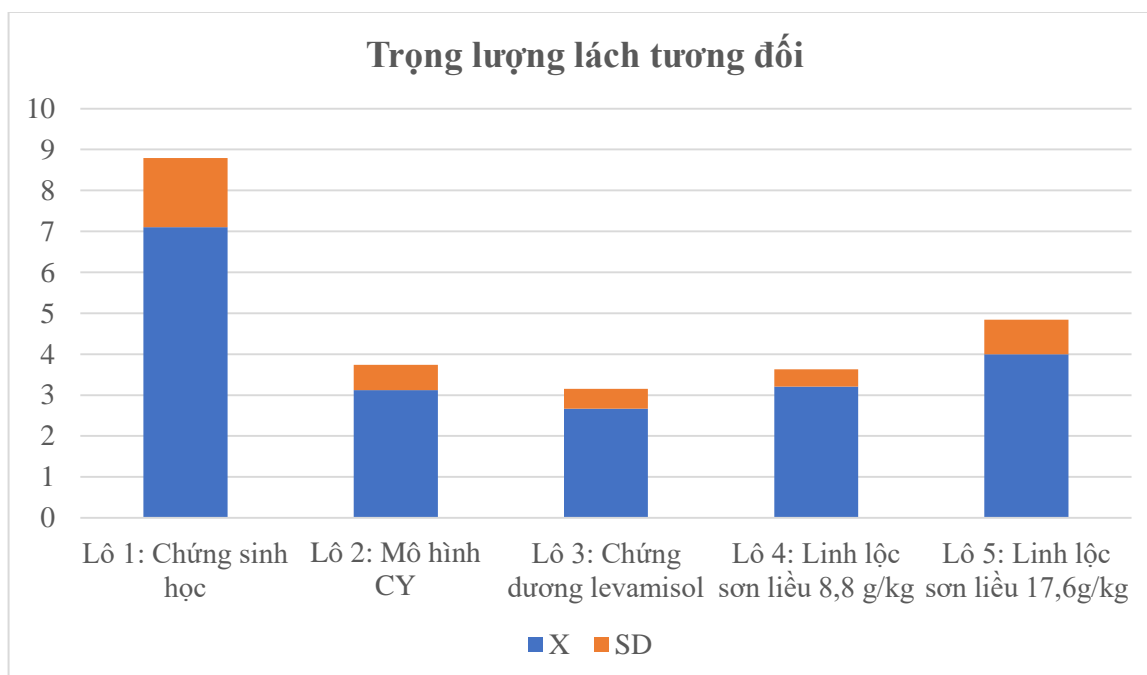
3.1. Kết quả về tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch chung

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên trọng lượng lách tương đối.

Lô	n	Trọng lượng lách tương đối
Lô 1: Chứng sinh học	10	7,10 ± 1,69
Lô 2: Mô hình CY	10	3,12 ± 0,62***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	2,67 ± 0,48***
Lô 4: Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg	10	3,21 ± 0,42***
Lô 5: Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	10	4,00 ± 0,84*** ^Δ

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$



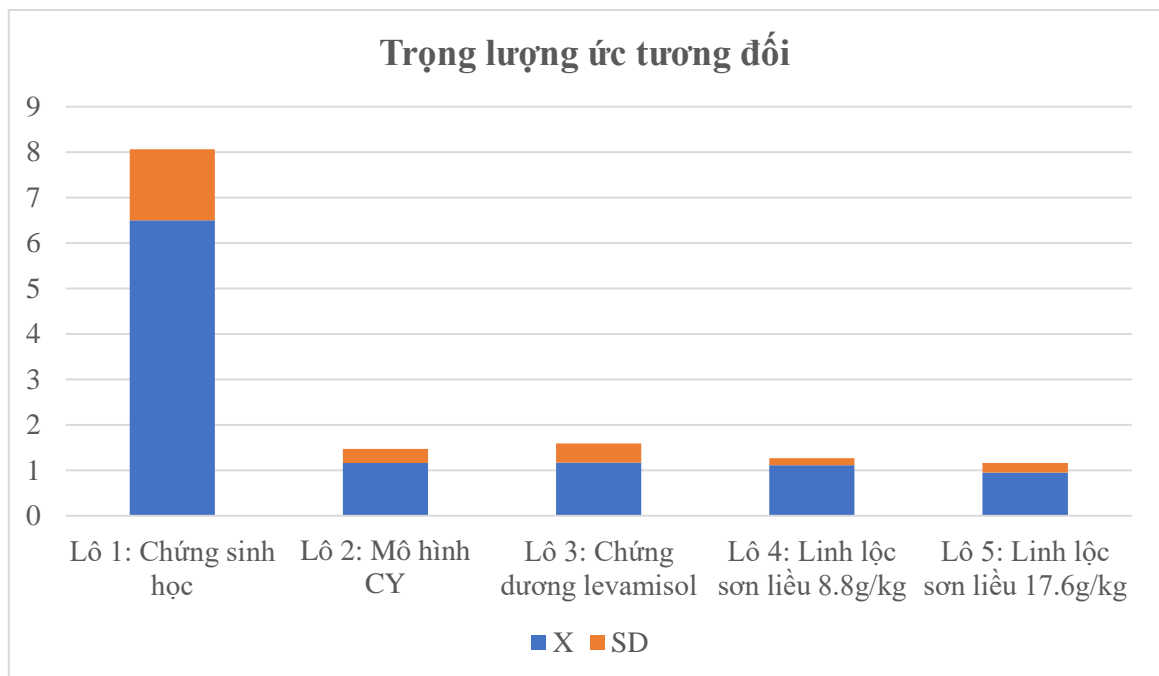
Nhận xét:

- **Lô mô hình (lô 2): Trọng lượng lách tương đối giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).**
- **Lô uống levamisol (lô 3): Trọng lượng lách tương đối không có sự khác biệt so với lô mô hình ($p > 0,05$).**
- **Lô uống Linh lộc sơn liều 8,8g/kg: Trọng lượng lách tương đối có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).**
- **Lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg: Trọng lượng lách tương đối tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với $p < 0,05$.**

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên trọng lượng tuyến ức tương đối

Lô	n	Trọng lượng ức tương đối
Lô 1: Chứng sinh học	10	6,50 ± 1,56
Lô 2: Mô hình CY	10	1,16 ± 0,31***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	1,17 ± 0,42***
Lô 4: Linh lộc sơn liều 8,8g/kg	10	1,11 ± 0,16***
Lô 5: Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	10	0,95 ± 0,21***

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$



Nhận xét:

- **Lô mô hình (lô 2):** Trọng lượng tuyến ức tương đối giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).
- **Lô uống levamisol (lô 3):** Trọng lượng tuyến ức tương đối không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).
- **Các lô uống Linh lộc sơn (lô 4 và lô 5):** Trọng lượng tuyến ức tương đối không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).

Bảng 3.3. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tủy ức

Lô nghiên cứu	Lách	Tủy ức
Lô 1 Chứng sinh học	3/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh lách bình thường.	3/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh tủy ức bình thường.
Lô 2 Mô hình	2/3 mẫu bệnh phẩm giảm nặng số lượng lympho bào của tủy trắng, 1/3 mẫu bệnh phẩm giảm nhẹ số lượng lympho bào của tủy trắng.	3/3 mẫu bệnh phẩm giảm nặng số lượng lympho bào.
Lô 3 Levamisol	3/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào của tủy trắng so với mô hình.	1/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào so với mô hình. 2/3 mẫu bệnh phẩm có số lượng lympho bào không tăng, gần như mô hình.
Lô 4 Linh lộc sơn liều 8,8g/kg	1/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhiều số lượng lympho bào của tủy trắng. 2/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào của tủy trắng	3/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào.
Lô 5 Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	2/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhiều số lượng lympho bào của tủy trắng. 1/3 mẫu bệnh phẩm tăng vừa số lượng lympho bào của tủy trắng.	1/3 mẫu bệnh phẩm tăng vừa số lượng lympho bào ở vùng tủy so với mô hình. 2/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào ở vùng tủy so với mô hình.

Hình ảnh giải phẫu vi thể tủy lách và tủy ức được thể hiện trong Phụ lục 1.

Nhận xét:

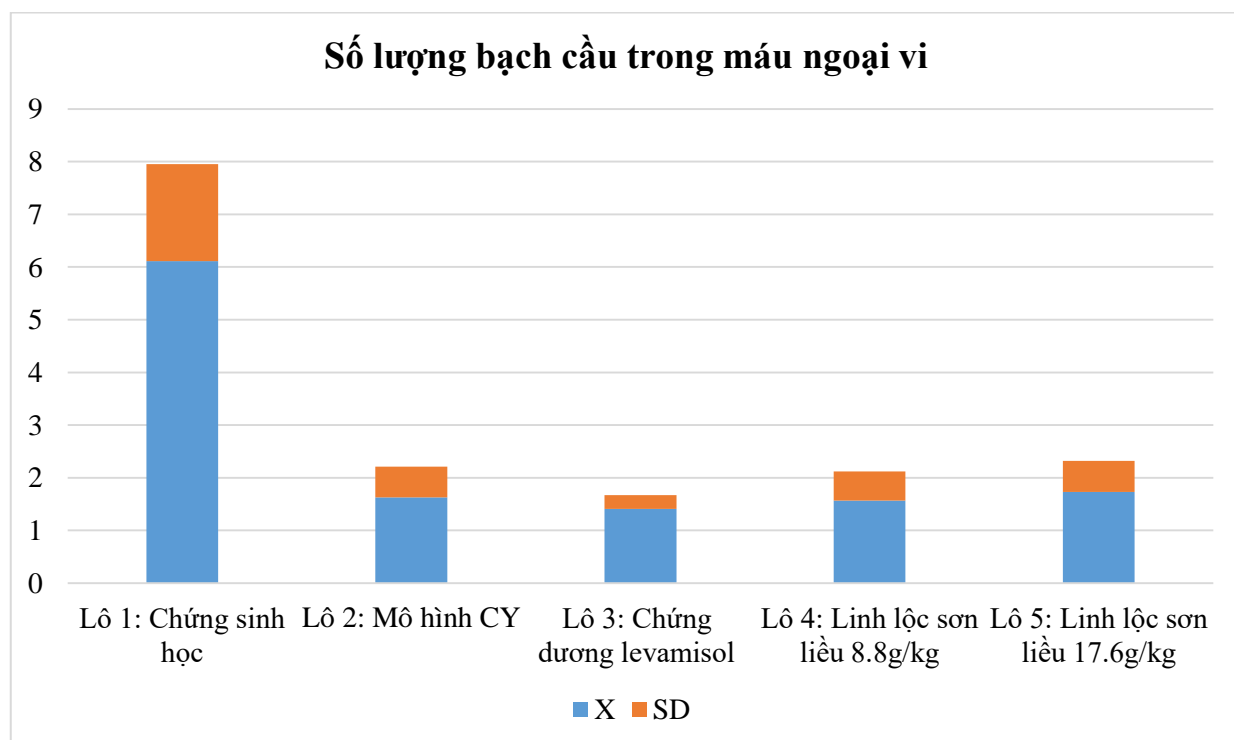
Kết luận về giải phẫu bệnh: CY gây tổn thương rõ rệt cơ quan lympho trung ương là tuyến ức và lách. Levamisol có tác dụng hạn chế một phần tổn thương gây ra do CY so với lô mô hình. Linh lộc sơn cả 2 liều đều giúp cải thiện rõ rệt tổn thương của lách và tuyến ức gây ra do CY so với lô mô hình.

» *Số lượng bạch cầu*

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi

Lô	n	Số lượng bạch cầu
Lô 1: Chứng sinh học	10	6,11 ± 1,84
Lô 2: Mô hình CY	10	1,63 ± 0,58***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	1,41 ± 0,26***
Lô 4: Linh lộc sơn liều 8,8g/kg	10	1,57 ± 0,55***
Lô 5: Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	10	1,73 ± 0,59***

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$.



Nhận xét:

- **Lô mô hình (lô 2): Số lượng bạch cầu giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).**
- **Lô uống levamisol (lô 3): Số lượng bạch cầu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).**
- **Lô uống Linh lộc sơn liều 8,8g/kg: Số lượng bạch cầu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).**
- **Lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg: Số lượng bạch cầu có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).**

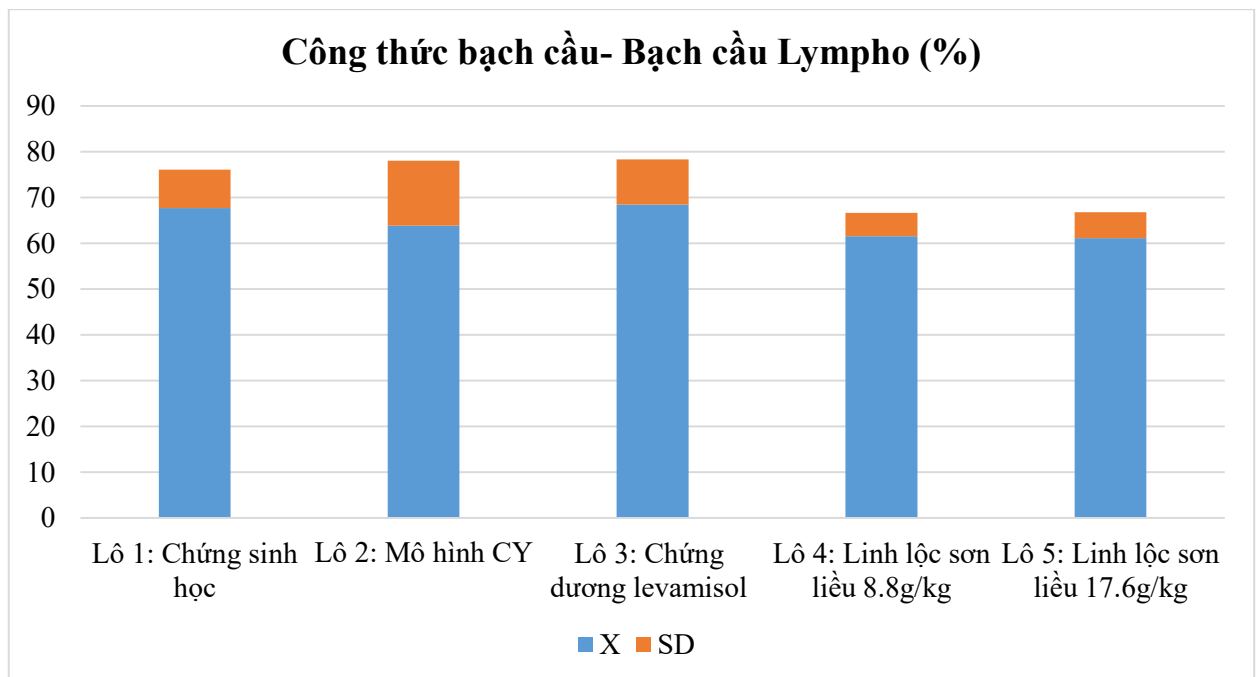
» Công thức bạch cầu

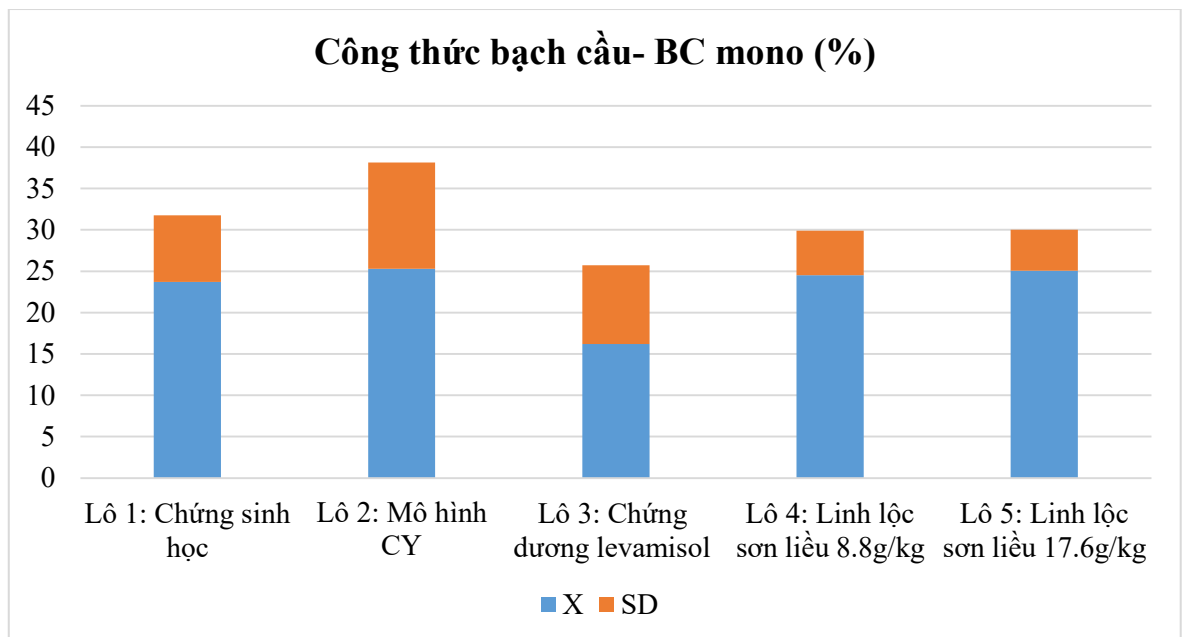
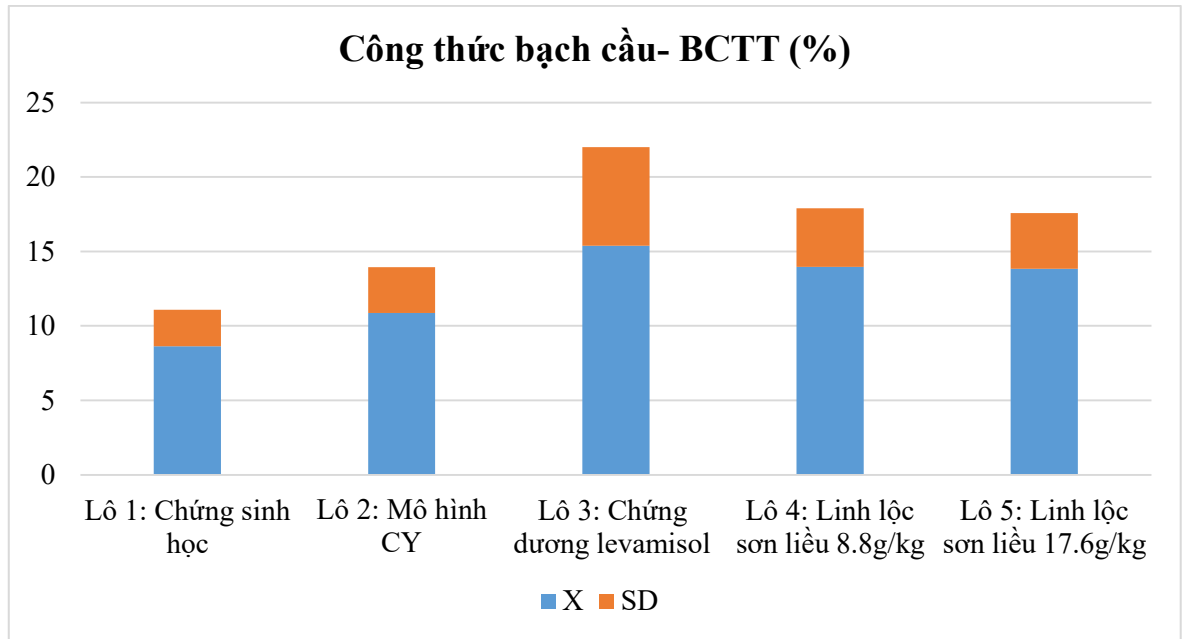
Bảng 3.5: Ảnh hưởng của Linh lộc sơn lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi

Lô	Công thức bạch cầu (G/l)		
	BC lympho (%)	BCTT (%)	BC mono (%)
Lô 1: Chứng sinh học	67,66 ± 8,42	8,63 ± 2,45	23,71 ± 8,03
Lô 2: Mô hình CY	63,83 ± 14,21	10,87 ± 3,08	25,30 ± 12,83
Lô 3: Chứng dương levamisol	68,42 ± 9,89	15,38 ± 6,62 **	16,20 ± 9,50
Lô 4: Linh lộc sơn liều 8,8g/kg	61,50 ± 5,10	13,97 ± 3,93 **	24,53 ± 5,37
Lô 5: Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	61,12 ± 5,62	13,83 ± 3,74 **	25,05 ± 4,97

Chú thích: **: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,01$

BC: Bạch cầu; BCTT: Bạch cầu trung tính.





Nhận xét:

- *Lô mô hình (lô 2): Số lượng bạch cầu lympho có xu hướng giảm so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Số lượng bạch cầu trung tính và bạch cầu mono không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng học ($p > 0,05$).*
- *Lô uống levamisol (lô 3): Số lượng bạch cầu lympho có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Số lượng bạch cầu trung tính và bạch cầu mono không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).*
- *Các lô uống Linh lộc sơn (lô 4 và lô 5): Số lượng các loại bạch cầu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).*

3.2. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu

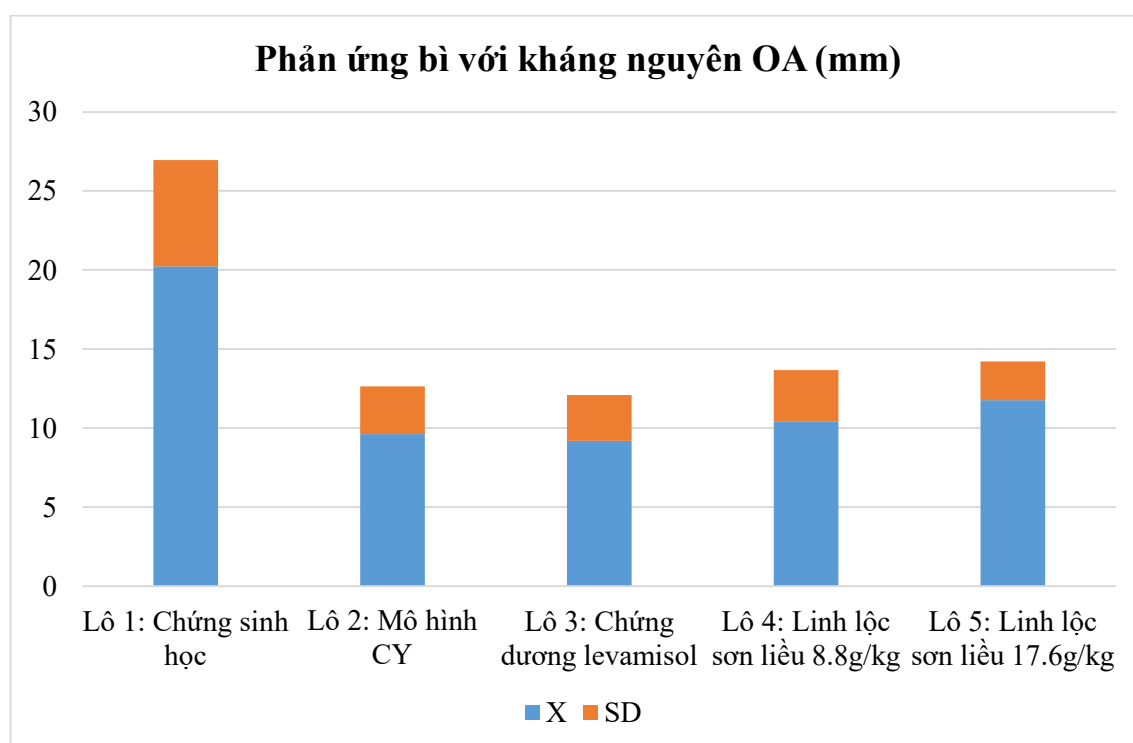
3.2.1. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào T

3.2.1.1. Phản ứng bì với kháng nguyên OA

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn đến phản ứng bì với kháng nguyên OA

Lô	n	Phản ứng bì với kháng nguyên OA (mm)
Lô 1: Chứng sinh học	10	20,24 ± 6,72
Lô 2: Mô hình CY	10	9,62 ± 3,01***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	9,20 ± 2,90***
Lô 4: Linh lộc sơn liều 8,8g/kg	10	10,44 ± 3,23***
Lô 5: Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	10	11,77 ± 2,45**

Chú thích: **,***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,01$ và $p < 0,001$.



Nhận xét:

- *Lô mô hình (lô 2): Phản ứng bì giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với $p < 0,001$.*
- *Lô uống levamisol (lô 3): Phản ứng bì không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).*
- *Các lô uống Linh lộc sơn (lô 4 và lô 5): Phản ứng bì có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).*

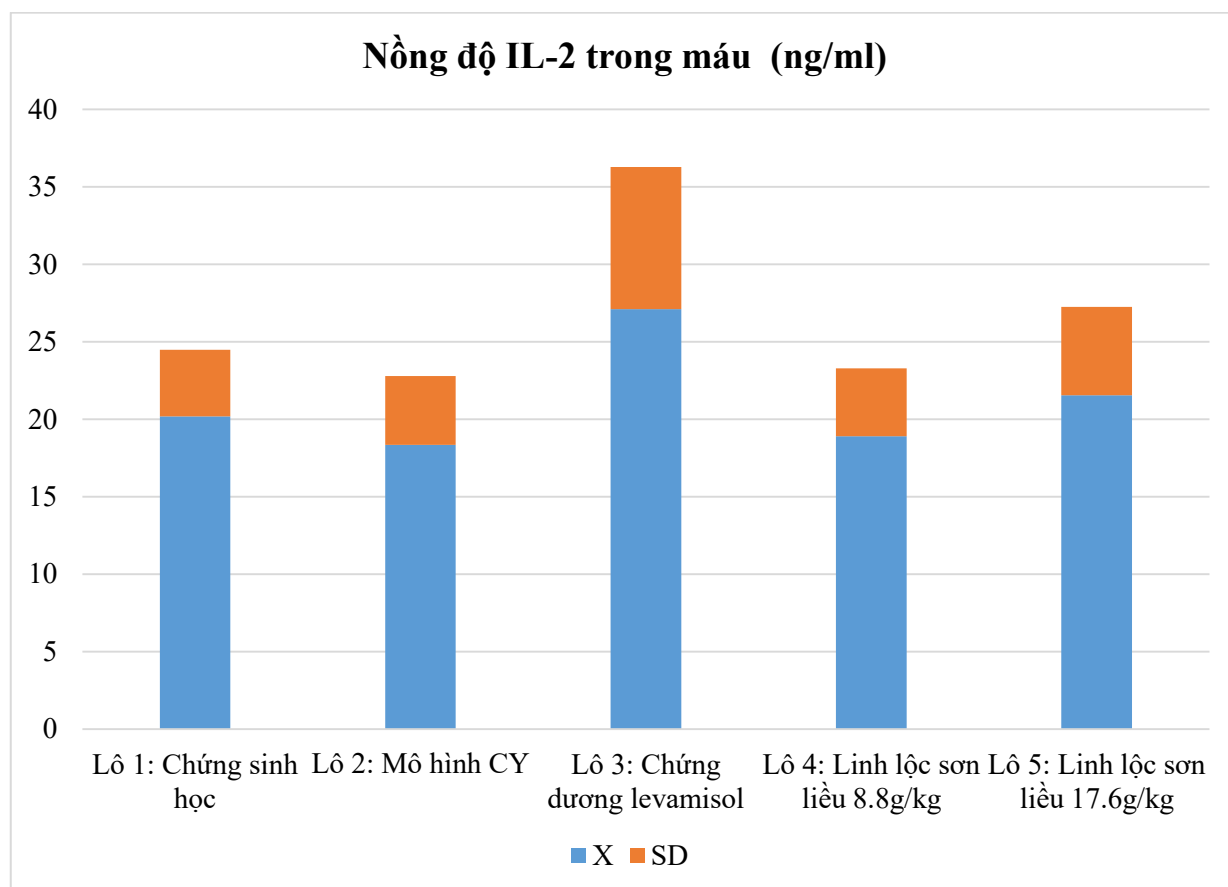
3.2.1.2. Định lượng các cytokine trong máu

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên IL-2 trong máu ngoại vi

Lô	n	Nồng độ IL-2 trong máu (ng/ml)
Lô 1: Chứng sinh học	10	20,18 ± 4,30
Lô 2: Mô hình CY	10	18,34 ± 4,44
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	27,09 ± 9,18* ^Δ
Lô 4: Linh lộc sơn liều 8,8g/kg	10	18,89 ± 4,39
Lô 5: Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	10	21,55 ± 5,70

Chú thích: *: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$.

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$.



Nhận xét:

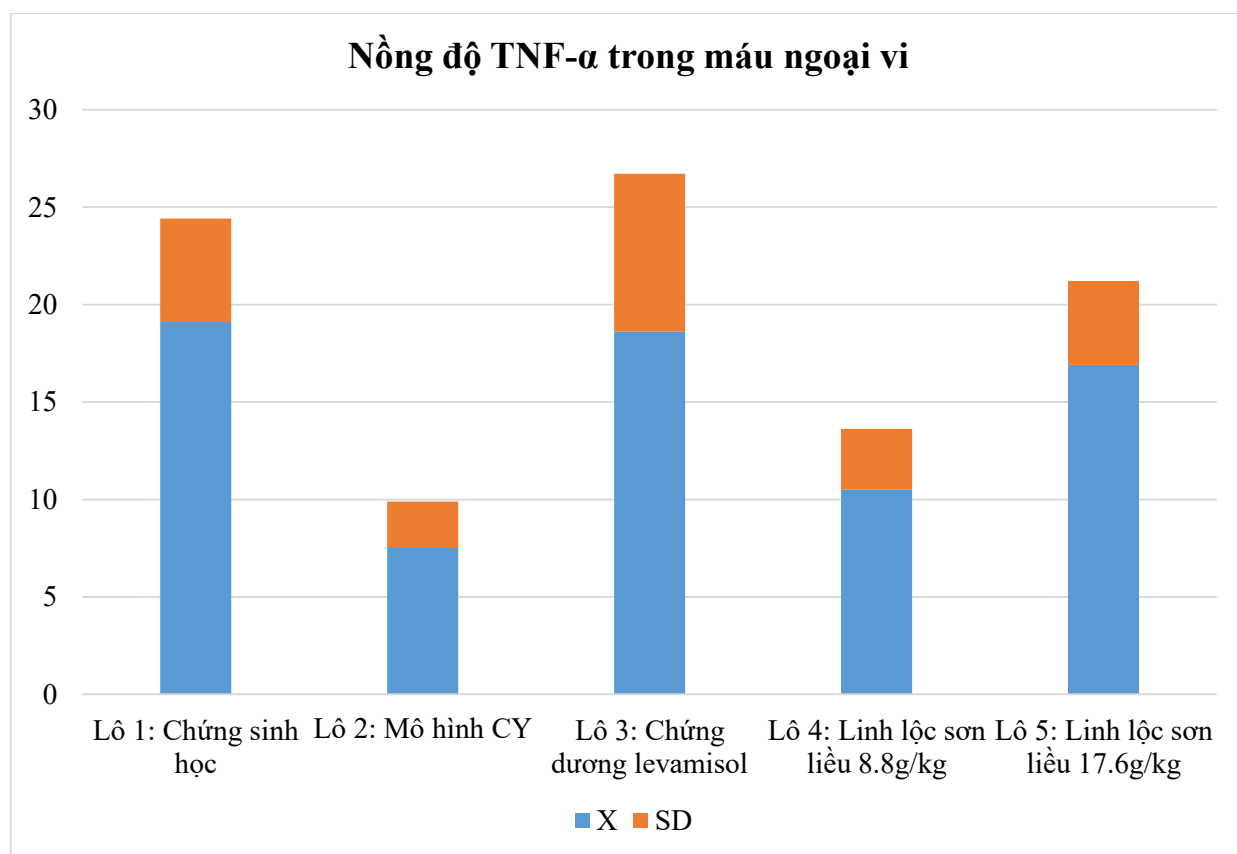
- *Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi có xu hướng giảm so với lô chứng sinh học, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).*
- *Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$).*
- *Lô uống Linh lộc sơn liều 8,8g/kg và liều 17,6/kg: Nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).*

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi

Lô	n	Nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi
Lô 1: Chứng sinh học	10	19,11 \pm 5,30
Lô 2: Mô hình CY	10	7,51 \pm 2,38***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	18,61 \pm 8,10 ^{△△△}
Lô 4: Linh lộc sơn liều 8,8g/kg	10	10,52 \pm 3,10*** [△]
Lô 5: Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	10	16,90 \pm 4,30 ^{△△△}

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$.

^{△, △△△}: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$ và $p < 0,001$.



Nhận xét:

- ***Lô mô hình (lô 2): Nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với $p < 0,001$.***
- ***Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với $p < 0,001$.***
- ***Lô uống Linh lộc sơn liều 8,8g/kg: Nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với $p < 0,05$.***
- ***Lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg: Nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình với $p < 0,001$. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ TNF- α giữa lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg và lô chứng sinh học ($p > 0,05$)***

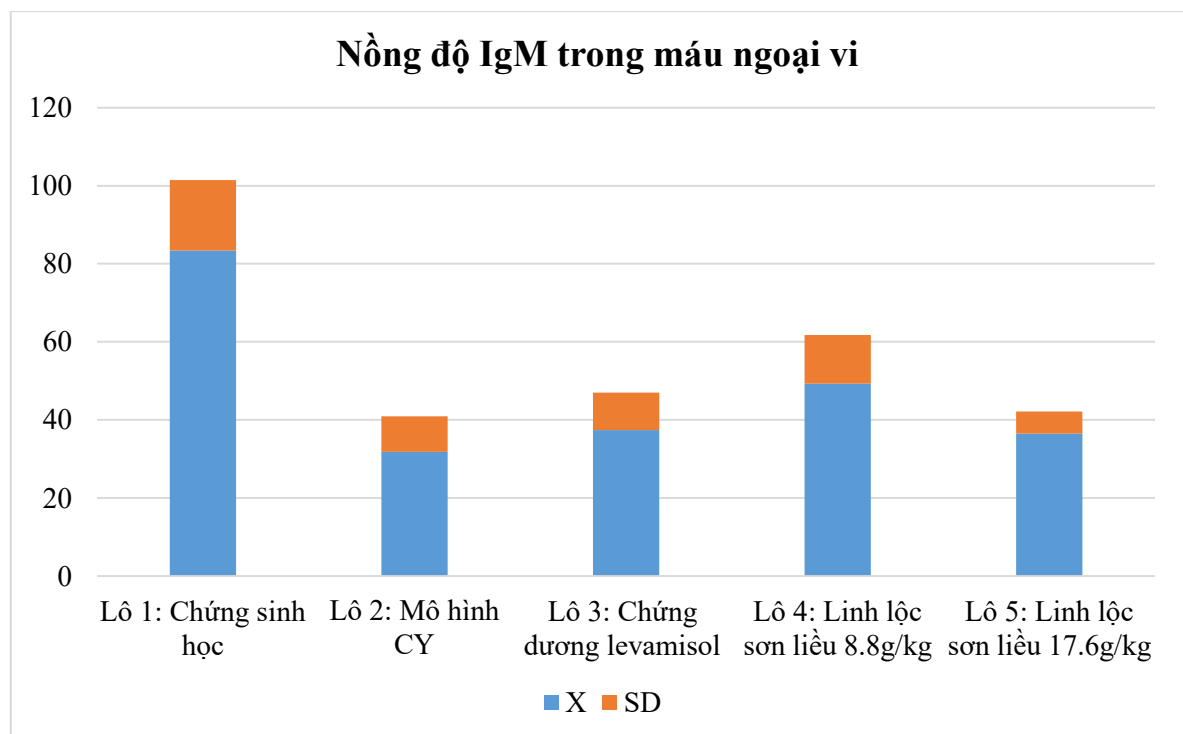
3.2.2. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào B

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên nồng độ IgM trong máu ngoại vi

Lô	n	Nồng độ IgM trong máu ngoại vi
Lô 1: Chứng sinh học	10	83,37 ± 18,04
Lô 2: Mô hình CY	10	31,84 ± 9,09***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	37,37 ± 9,66***
Lô 4: Linh lộc sơn liều 8,8g/kg	10	49,33 ± 12,45*** ^{ΔΔ}
Lô 5: Linh lộc sơn liều 17,6g/kg	10	36,50 ± 5,66***

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$.

^{ΔΔ}: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,01$.



Nhận xét:

- **Lô mô hình (lô 2):** *Nồng độ IgM trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với $p < 0,001$.*
- **Lô uống levamisol (lô 3):** *Nồng độ IgM trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).*
- **Lô uống Linh lộc sơn liều 8,8g/kg:** *Nồng độ IgM trong máu ngoại vi tăng rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,01$).*
- **Các lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg:** *Nồng độ IgM trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).*

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Đánh giá tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch chung.

4.1.1. Mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid

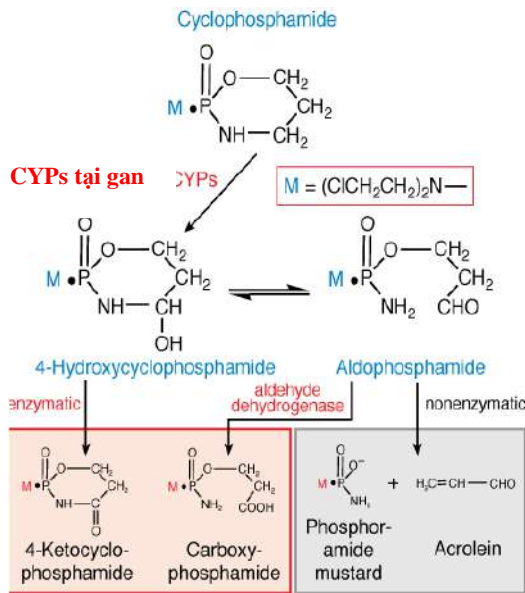
Đa số các chất kích thích miễn dịch thể hiện rõ tác dụng trên hệ thống miễn dịch bị tổn thương hơn là hệ miễn dịch bình thường. Vì vậy, để nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của một chất, người ta thường tiến hành nghiên cứu trên hệ miễn dịch đã bị suy yếu.

Hoạt động của hệ miễn dịch chống lại tác nhân gây bệnh bao gồm vai trò của 2 hàng rào: đáp ứng miễn dịch tự nhiên và miễn dịch đặc hiệu (miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào). Sự suy giảm miễn dịch xảy ra khi 2 hàng rào bảo vệ này bị tổn thương [52],[53].

Cho đến nay, để gây suy giảm miễn dịch trên thực nghiệm, các nhà khoa học đã sử dụng nhiều tác nhân và phương pháp khác nhau tùy vào mục đích nghiên cứu như dùng hóa chất, tác nhân vật lý, vi sinh vật, mô ung thư hay động vật biến đổi gen. Trong đó, mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng hóa chất (cyclophosphamid) là một trong những mô hình được sử dụng phổ biến nhất trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

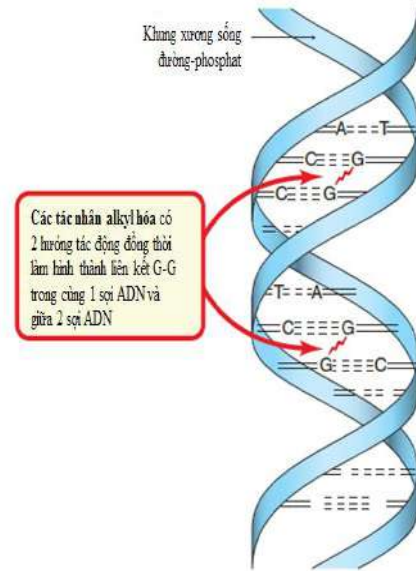
Cyclophosphamid (CY) là một tác nhân alkyl hóa kìm tế bào. Bản thân CY không có hoạt tính, tuy nhiên, trong gan (và trong các mô khác), nhờ enzym CYP2B, CY bị biến đổi sinh học thành các sản phẩm chuyển hóa có hoạt tính alkyl hóa như phospho-amid mustard, acrolein. Các chất này phản ứng và liên kết đồng hóa trị với những gốc guanin (G) trên ADN hình thành liên kết G-G trên cùng sợi ADN và liên kết G-G giữa hai dải ADN, ngăn chặn sự sao chép và phiên mã ADN. CY ức chế sự phân chia của tất cả các tế bào đang tăng sinh (đặc biệt là các tế bào của tủy xương), do đó, trên miễn dịch,

CY gây suy giảm cả đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào (hình 4.1 và 4.2) [54],[55],[56].



Chất chuyển hóa không có hoạt tính **Chất chuyển hóa gây độc**

Hình 4.1. Chuyển hóa của cyclophosphamid [54]



G: guanin, A: adenin, C: cytosin, T: thymin.

Hình 4.2. Ảnh hưởng của các tác nhân alkyl hóa lên ADN [56]

Vì những lý do trên, chúng tôi sử dụng CY làm chất gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng.

Theo Hussain A (2013), LD₅₀ của CY khi tiêm màng bụng chuột nhắt trắng là 360 mg/kg và sau khi tiêm, CY được chuyển hóa và thải trừ nhanh trong vòng 20 – 30 phút [57]. Trên thế giới, nhiều nghiên cứu dùng liều nhỏ CY và lặp lại trong nhiều ngày như tiêm màng bụng CY liều 80 mg/kg liên tục trong 5 ngày hay CY liều 70 mg/kg trong 3 ngày liên tiếp để gây suy giảm miễn dịch [58],[59]. Tại Việt Nam, Phan Thị Phi Phi và cộng sự đã tiến hành tiêm CY cho chuột nhắt trắng với các mức liều khác nhau (từ liều thấp đến liều cao), từ dùng cách quãng đến dùng một lần duy nhất. Kết quả nghiên cứu cho thấy liệu trình tiêm màng bụng CY với liều 200 mg/kg một lần duy nhất

và xét nghiệm sau 5 ngày là phù hợp nhất. Nếu dùng liều thấp cách quãng, các tổn thương không rõ, khó đánh giá mức độ hồi phục, còn dùng liều cao, súc vật sẽ chết sau vài giờ do tổn thương nặng các cơ quan [60]. Ngoài ra, liều CY 200 mg/kg tiêm màng bụng cũng được các tác giả trong và ngoài nước sử dụng để xây dựng mô hình suy giảm miễn dịch [61],[62],[63],[64]. Trên lâm sàng, CY gây ra ức chế tủy xương cấp tính, số lượng các tế bào máu ngoại vi giảm mạnh nhất từ 6 – 10 ngày và hồi phục trong 14 – 21 ngày [54]. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành các nghiên cứu thăm dò về liều CY và xác định thời điểm phù hợp nhất để tiến hành xét nghiệm đánh giá tác dụng của thuốc thử là 4 ngày sau tiêm CY.

Như vậy, mô hình gây tổn thương hệ miễn dịch bằng tiêm màng bụng CY liều 200 mg/kg một mũi duy nhất và tiến hành xét nghiệm sau 4 ngày tiêm CY là phù hợp nhất và đã được áp dụng trong nghiên cứu này.

4.1.2. Lựa chọn chứng dương

Levamisol là thuốc kích thích miễn dịch tác động trên cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào, trong đó đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào là mục tiêu chủ yếu của levamisol [65],[66].

Levamisol làm tăng cường chức năng của các tế bào lympho Th1 trong phản ứng quá mẫn chậm, làm tăng tiết IL-2, IL-12 và IFN- γ [67],[68]. Theo kết quả nghiên cứu của L-Y Chen và cộng sự (2007), levamisol có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch thông qua hoạt hóa tế bào đuôi gai (một trong những tế bào trình diện kháng nguyên hoạt động mạnh nhất), kích thích sự phát triển của tế bào Th1 và tăng sản xuất IL-10 và IL-12 [69]. Ngoài ra, liều levamisol là 100 mg/kg được nhiều tác giả nghiên cứu và chứng minh hiệu quả kích thích miễn dịch rõ rệt [61],[62],[64].

Do vậy, levamisol liều 100 mg/kg được sử dụng làm chứng chuẩn (chứng dương) để so sánh hiệu quả với thuốc thử trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng CY.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, levamisol liều 100 mg/kg có tác dụng cải thiện các chỉ số miễn dịch chung, tăng cường đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào so với lô mô hình thông qua các chỉ số sau: (a) Trên chỉ số miễn dịch chung, levamisol làm tăng số lượng bạch cầu chung, số lượng BC lympho và BC trung tính trong máu ngoại vi; ở cấu trúc vi thể, số lượng lympho bào, kích thước của lách và tuyến ức được cải thiện rõ rệt; (b) Trên đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, levamisol làm tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA, tăng nồng độ IL-2 và làm giảm TNF- α trong máu ngoại vi. Trên đáp ứng miễn dịch dịch thể, levamisol không làm cải thiện nồng độ IgG so với lô mô hình. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả cũng sử dụng levamisol liều 100 mg/kg làm chứng dương trong mô hình gây suy giảm miễn dịch cho chuột nhắt trắng bằng CY (liều 200 mg/kg) [61],[62],[64],[70].

4.1.3. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên các chỉ số chung của hệ miễn dịch

Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối và giải phẫu vi thể lách, tuyến ức Các cơ quan chịu trách nhiệm miễn dịch đều thuộc mô lympho, được chia thành cơ quan trung ương và cơ quan ngoại vi. Các cơ quan lympho trung ương là nơi sinh sản và biệt hóa tế bào lympho đến trưởng thành, đủ tư cách xử lý kháng nguyên. Sau đó, các tế bào lympho chuyển tới cơ quan ngoại vi, trú ngụ lâu dài và biệt hóa dưới tác dụng của kháng nguyên [52],[53].

Lách là một tổ chức lympho ngoại vi lớn, là nơi trú ngụ của các lympho bào (chủ yếu là lympho bào B) và đại thực bào. Đây cũng là nơi tập trung kháng nguyên, nhất là các kháng nguyên vào cơ thể bằng đường máu. Sau khi xâm nhập và được đại thực bào xử lý, kháng nguyên sẽ kích thích các tế bào lympho B tại lách phân chia, biệt hóa thành tương bào và sản xuất kháng thể để loại trừ kháng nguyên đó. Theo dõi trọng lượng lách đánh giá được một phần tổn thương tế bào lympho đã mắc cảm. Từ đó đối chiếu với các chỉ tiêu về cấu trúc

vi thể của lách và chức năng của các lympho bào B để đánh giá đầy đủ hơn về khả năng đáp ứng miễn dịch dịch thể.

Tuyến ức là cơ quan lympho trung ương, đảm nhiệm chức năng huấn luyện, phân chia và biệt hóa các tế bào lympho T. Tế bào lympho trong tuyến ức là từ tủy xương di cư tới. Tuyến ức đã tạo một vi môi trường thuận lợi để các tế bào lympho này biệt hóa thành dòng tế bào lympho T [52],[53]. Do đó, trọng lượng tuyến ức là chỉ số quan trọng cùng với cấu trúc vi thể, chức năng của các lympho bào T để đánh giá đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Khi tính trọng lượng lách và tuyến ức, chỉ số trọng lượng tương đối được sử dụng để loại trừ sự thay đổi trọng lượng lách và tuyến ức là do sự thay đổi của trọng lượng chung của cơ thể.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở lô mô hình, trọng lượng lách tương đối (TLLTĐ) của chuột nhất trắng giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Ở 3 lô dùng levamisol và viên nang Linh lộc sơn các liều, TLLTĐ cũng giảm có ý nghĩa so với lô chứng sinh học. So với lô mô hình, TLLTĐ ở lô viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg có xu hướng tăng (mức tăng là 5% so với lô mô hình) và sự khác biệt là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở lô dùng viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg, TLLTĐ tăng rõ so với lô mô hình (mức tăng là 25%, gấp 5 lần so với lô Viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg); điều đặc biệt là viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg làm tăng rõ TLLTĐ so với lô chứng dương ($p < 0,01$).

Về trọng lượng tuyến ức tương đối (TLTƯĐ), ở lô mô hình, TLTƯĐ giảm có ý nghĩa so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$). Ở 3 lô dùng levamisol và viên nang Linh lộc sơn các liều, TLTƯĐ cũng giảm so với lô chứng sinh học. So với lô mô hình, viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg và viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg làm tăng TLTƯĐ lần lượt là 12,5% và 25%, mức tăng ở lô viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg gấp 2 lần so với lô viên

nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg. Tuy nhiên, ở cả 2 liều thuốc thử, sự khác biệt về TLTƯTĐ so với lô mô hình là không có ý nghĩa thống kê.

CY là một tác nhân alkyl hóa kìm tế bào, tác động vào ADN làm ngăn chặn sự sao chép và phiên mã ADN. Do đó, CY ức chế sự phân chia của tất cả các tế bào đang tăng sinh, trong đó có các tế bào thuộc hệ thống miễn dịch [54],[55],[56]. Kết quả nghiên cứu cho thấy CY làm giảm trọng lượng của tổ chức lympho trung ương (tuyến ức) và ngoại vi (lách) ở tất cả các lô chuột so với lô chứng sinh học.

Viên nang Linh lộc sơn các liều làm tăng trọng lượng lách và tuyến ức so với lô mô hình, mức tăng phụ thuộc vào liều: viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg làm tăng trọng lượng cơ quan lympho nhiều hơn so với lô Viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg, đặc biệt viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg làm tăng TLLTĐ có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$).

Sự tăng trọng lượng tương đối lách và tuyến ức ở lô dùng viên nang Linh lộc sơn các liều so với lô mô hình là do tăng số lượng của các lympho bào và kích thước của 2 cơ quan này, thể hiện rõ trên kết quả giải phẫu vi thể: (1) Trên cấu trúc vi thể lách, số lượng lympho bào và kích thước của nang lympho ở lô mô hình giảm nặng, ở lô viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg chỉ còn giảm nhẹ và ở lô viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg số lượng lympho bào và kích thước của nang lympho tăng so với lô mô hình (gần như bình thường); (2) Trên cấu trúc vi thể tuyến ức, kích thước tuyến ức và số lượng lympho bào ở lô mô hình giảm nặng, ở lô viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg giảm ở mức độ nhẹ đến nặng và ở lô viên nang Linh lộc sơn 17,6 g/kg, kích thước tuyến ức và số lượng lympho bào tăng so với lô mô hình (ở mức bình thường).

Như vậy, viên nang Linh lộc sơn làm tăng trọng lượng các cơ quan lympho (lách và tuyến ức) ở chuột nhất trắng bị gây suy giảm miễn dịch bằng CY do làm tăng số lượng lympho bào và kích thước của các tổ chức này, tác

dụng phụ thuộc vào liều (viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg có tác dụng tốt hơn liều 8,8 g/kg).

» Số lượng bạch cầu chung

Tủy xương là nơi diễn ra sự tăng sinh mạnh mẽ các tế bào và là đích tác dụng quan trọng của thuốc gây độc tế bào (trong đó có CY). Sự phá hủy hoặc mất các tế bào dòng tủy trong tủy xương làm mất khả năng tái tạo các tế bào máu mới dẫn đến tình trạng giảm bạch cầu. CY gây ra ức chế tủy xương cấp tính, làm số lượng các tế bào máu ngoại vi giảm mạnh nhất từ 6 – 10 ngày và hồi phục trong 14 – 21 ngày [54].

Số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi là một chỉ số mang tính định lượng, phản ánh cả đáp ứng miễn dịch tự nhiên và miễn dịch đặc hiệu, là chỉ số huyết học phải được theo dõi chặt chẽ trên lâm sàng khi dùng CY [54],[56]. Sự thay đổi số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi phản ánh tác động của thuốc lên tế bào gốc tạo máu trong tủy xương.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở tất cả các lô tiêm CY, số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Trong đó, lô mô hình (chỉ tiêm CY), số lượng bạch cầu chung giảm mạnh nhất. Ở lô uống levamisol và viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg, số lượng bạch cầu chung trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa so với lô mô hình ($p < 0,05$) và không có sự khác biệt khi so sánh giữa lô levamisol và lô viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg. Ở lô viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg, chỉ số này có xu hướng tăng so với lô mô hình nhưng sự khác biệt là không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Kết quả này chỉ ra tác dụng kích thích miễn dịch của levamisol và viên nang Linh lộc sơn trên tế bào gốc tạo máu trong tủy xương, từ đó làm cải thiện số lượng bạch cầu chung trong máu ngoại vi; đặc biệt viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg có tác dụng cải thiện rõ rệt hơn so với viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg.

» Công thức bạch cầu

Công thức bạch cầu cho biết số lượng các loại bạch cầu trong máu ngoại vi, mỗi loại bạch cầu có chức năng riêng khi tham gia vào đáp ứng của cơ thể chống lại kháng nguyên. Trong đó, lympho bào là một trong những tế bào quan trọng nhất trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu [52],[53],[54].

Tế bào lympho chiếm khoảng 20-30% tổng số bạch cầu trong máu. Dựa vào giai đoạn biệt hóa, khác biệt hình thái, chức năng, đặc biệt là nhờ dấu ấn bề mặt (CD), tế bào lympho được chia thành 2 quần thể chính là quần thể tế bào lympho T và tế bào lympho B có vai trò trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

Bạch cầu hạt trung tính chiếm khoảng 60% tổng số bạch cầu trong máu ngoại vi, có vai trò chủ yếu trong đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Chức năng chính của bạch cầu hạt trung tính là thực bào các phân tử nhỏ, vì vậy còn được gọi là tiểu thực bào. Trên bề mặt các tiểu thực bào có thụ thể với Ig, thành phần C3 của bổ thể, do đó những kháng nguyên đã kết hợp với kháng thể dễ dàng bị chúng tiêu diệt.

Ngoài các tế bào lympho, bạch cầu hạt trung tính, một số bạch cầu khác cũng tham gia vào đáp ứng miễn dịch của cơ thể như: bạch cầu mono có vai trò tiêu diệt các phần tử bé hơn bằng ẩm bào và thực bào; tế bào diệt tự nhiên có khả năng diệt tế bào u và tế bào vật chủ nhiễm virus; bạch cầu ái kiềm có thụ thể với IgE, khi kháng nguyên xâm nhập sẽ kết hợp với IgE làm bạch cầu ái kiềm giải phóng ra các hoạt chất, ... [52],[53].

Do vậy, theo dõi sự thay đổi về số lượng các loại bạch cầu giúp đánh giá một phần tình trạng hệ miễn dịch cơ thể.

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, ở tất cả các lô tiêm CY, số lượng các loại bạch cầu (BC lympho, BCTT và BC mono) giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Ở lô dùng viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg, số lượng cả 3 loại bạch cầu có xu hướng tăng nhưng không khác biệt so với lô mô hình. Viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg có xu hướng làm tăng số

lượng BCTT và BC mono, đặc biệt trên số lượng BC lympho, viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg làm tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt về số lượng cả 3 loại BC giữa lô viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg và lô chứng dương.

Như vậy, viên nang Linh lộc sơn có xu hướng làm tăng số lượng các loại bạch cầu trong máu ngoại vi và viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg đã thể hiện rõ tác dụng trên BC lympho. Kết quả này cho thấy viên nang Linh lộc sơn có tác dụng kích thích miễn dịch, đặc biệt trên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu (gồm có 2 loại là đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào).

4.2. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn lên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu

4.2.1. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào B

Đáp ứng miễn dịch dịch thể là đáp ứng do các lympho bào B đảm nhiệm. Sau khi nhận biết kháng nguyên, tế bào lympho B sẽ tăng sinh và biệt hóa thành tương bào, bắt đầu sản xuất ra kháng thể. Các kháng thể này là kháng thể hòa tan, gọi một cách tổng quát hơn là các globulin miễn dịch (immunoglobulin, viết tắt là Ig), đảm đương chức năng nhận biết, kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên để gây hiện tượng tua, ngưng kết và hoạt hóa hệ miễn dịch không đặc hiệu [52],[54].

Các globulin miễn dịch chính lưu hành trong máu gồm có 5 loại chính IgG, IgM, IgE, IgA và IgD. Các mảnh cấu phần của các Ig đều gồm có 2 mảnh Fab (vị trí kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên) và 1 mảnh Fc (có khả năng gắn lên bề mặt một số tế bào).

Trong số các Ig, IgG và IgM đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng loại trừ kháng nguyên. IgG là một globulin miễn dịch quan trọng, chiếm khoảng 70 – 75% tổng số Ig trong huyết thanh, có khả năng “cắm” phần Fc lên thụ

thể trên màng của nhiều loại bạch cầu: đại thực bào, bạch cầu trung tính, tế bào mast, ... giúp hoạt hóa hệ miễn dịch không đặc hiệu.

IgM chiếm khoảng 10% tổng lượng Ig trong huyết thanh. Do có 5 F(ab)₂ (tức là 10 mảnh Fab) chia ra 5 phía nên IgM dễ dàng kết hợp với kháng nguyên, tạo phức hợp kháng nguyên – kháng thể.

Các globulin miễn dịch khác chiếm thành phần ít hơn trong máu và đảm nhận chức năng khác nhau: IgE (tế bào mast và bạch cầu ái kiềm có thụ thể ái tính rất cao với Fc của IgE khiến IgE bị cố định nhanh chóng, sự kết hợp IgE với KN đặc hiệu chủ yếu thực hiện trên bề mặt tế bào mà nó “cắm” vào); IgA (gồm 2 loại là IgA huyết thanh và IgA tiết ở dịch niêm mạc),...

Khi có kháng nguyên xâm nhập, IgM xuất hiện đầu tiên [52],[53]. Khi tiêm hồng cầu cừu cho chuột nhắt, các tế bào lympho B sản xuất IgM ở lách được phát hiện từ ngày 2 đến ngày 6 sau khi tiêm kháng nguyên, còn các tế bào sản xuất IgG xuất hiện vào ngày thứ 6 hoặc muộn hơn [71]. Theo nghiên cứu của Phạm Thủy Phương và cộng sự (2014), sau 7 ngày tiêm màng bụng hồng cầu cừu cho chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch do CY, lượng IgM giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học [72].

Do đó, trên chuột nhắt bị suy giảm lympho bào B do CY, chúng tôi tiến hành định lượng kháng thể IgM trong máu vào ngày thứ 7 sau khi tiêm hồng cầu cừu để đánh giá chức năng của lympho bào B trong đáp ứng loại trừ kháng nguyên.

Sự sản xuất kháng thể khi có mặt kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức (hồng cầu cừu) cần có sự tham gia của cả lympho bào B và lympho bào T [73]. Tuy nhiên, trên chuột nhắt trắng, tỷ lệ tế bào lympho T có thụ thể tự nhiên với hồng cầu cừu rất ít, chỉ 1 – 2%, trong khi tỷ lệ này là 80 – 90% ở lympho bào B [52],[53]. Tế bào lympho B miễn cảm với kháng nguyên là hồng cầu cừu sẽ biệt hoá trở thành tương bào. Tương bào tiết ra các kháng thể hoà tan trong dịch của cơ thể nên gọi là kháng thể dịch thể. Các kháng thể

dịch thể gồm IgM, IgG, IgA, IgD và IgE. Trong đó IgM và IgG có nhiều trong máu nhất đồng thời cũng đóng vai trò quan trọng nhất trong đáp ứng miễn dịch dịch thể. Đặc biệt IgM xuất hiện sớm và có vai trò quan trọng nhất ở giai đoạn đầu của quá trình đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Do đó, hồng cầu cừu được lựa chọn làm kháng nguyên nhằm kích thích sự biệt hóa của lympho bào B thành tương bào, thông qua định lượng kháng thể IgM trong máu có thể đánh giá chức năng của tế bào lympho B trong đáp ứng miễn dịch dịch thể.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy ở lô mô hình (chỉ tiêm CY), CY làm giảm rõ rệt nồng độ IgM trong máu ngoại vi so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). CY là chất ức chế miễn dịch dịch thể mạnh hơn miễn dịch tế bào, làm giảm số lượng và chức năng của lympho bào B [54],[56]. Do đó, nồng độ IgM do lympho B biệt hóa thành tương bào tiết ra trong máu ngoại vi giảm khi tiêm CY cho chuột nhất trắng.

So với lô mô hình, Levamisol và viên nang Linh lộc sơn cả hai liều đều làm tăng rõ rệt nồng độ IgM trong máu ngoại vi, trong đó lô Linh lộc sơn liều 8,8g/kg có mức tăng là 30% so với chỉ 8% ở lô Viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg.

Như vậy, viên nang Linh lộc sơn ở cả 2 liều có tác dụng kích thích miễn dịch dịch thể thông qua làm tăng nồng độ IgM trong máu ngoại vi.

4.2.2. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào T

Bên cạnh đáp ứng miễn dịch dịch thể, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào là một phương thức đáp ứng đặc hiệu nhằm loại trừ kháng nguyên, do tế bào lympho T phụ trách. Trong quá trình biệt hóa, chọn lọc và trưởng thành, các lympho bào T hoàn toàn phụ thuộc tuyến ức (Thymus) nên được gọi là lympho bào T [52].

Để đánh giá đáp ứng miễn dịch, nhiều phương pháp đã được sử dụng trên thực nghiệm như phản ứng bì với kháng nguyên OA, định lượng cytokin

trong máu, xác định số lượng các dưới nhóm của lympho bào T, chuyển dạng lympho bào, ... [53]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn phản ứng bì với kháng nguyên OA và định lượng cytokin trong máu để đánh giá đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào.

Phản ứng bì với kháng nguyên OA là phương pháp kinh điển, dễ thực hiện và được nhiều tác giả sử dụng để đánh giá chức năng của lympho bào T [70],[72]. Ovalbumin (OA) là một protein kháng nguyên hình cầu phức tạp, phụ thuộc tuyến ức. Sau khi OA được xử lý bởi các tế bào trình diện kháng nguyên, lympho bào T có thể nhận biết, loại trừ trực tiếp OA hoặc hỗ trợ tế bào lympho B trong quá trình biệt hóa thành tương bào, tiết kháng thể [52]. Việc bổ sung nhôm hydroxyd – $\text{Al}(\text{OH})_3$ giúp kháng nguyên OA được hấp thu tốt hơn vào dịch kẽ. Ngoài ra, các tá dược chứa nhôm cũng được sử dụng phổ biến trong điều chế vaccin để làm tăng hấp thụ các kháng nguyên và tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể [74],[75].

Phản ứng bì với kháng nguyên OA là kết quả của phản ứng quá mẫn chậm. Sau khi tiếp xúc với kháng nguyên, các tế bào lympho T được hoạt hóa và tiết ra các cytokin. Các cytokin sau khi được tiết ra có vai trò thu hút các bạch cầu mono, bạch cầu trung tính và hoạt hóa đại thực bào tập trung tại vị trí tiếp xúc với kháng nguyên, gây ra đáp ứng viêm tại chỗ [76]. Do đó, khi tiêm kháng nguyên OA vào gan bàn chân chuột, phản ứng viêm làm tăng bề dày chân chuột so với bình thường.

Kháng nguyên (OA) khi vào cơ thể lần đầu, được đại thực bào đưa theo đường bạch huyết đến hạch gần nhất. Tế bào lympho T ở vùng vỏ hạch đó tăng sinh mạnh làm sưng to hạch. Sau 6 ngày, những tế bào lympho này được miễn cảm, rời hạch tới lách và các hạch khác, rồi vào tuần hoàn để nhận biết kháng nguyên lạ đó và loại trừ chúng. Khi kháng nguyên OA vào lại thì chỉ cần 10 giờ sau tại chỗ tiêm sẽ xuất hiện viêm [52]. Do đó, chúng tôi tiến hành

tiêm OA lần 2 vào gan bàn chân chuột (sau lần 1 là 6 ngày) và sau 24 giờ tiến hành đo bề dày gan bàn chân chuột.

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở lô mô hình, CY làm giảm có ý nghĩa phản ứng bì với kháng nguyên OA so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$). CY là tác nhân gây độc tế bào, làm giảm số lượng và chức năng của lympho bào T, do đó ức chế đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua làm giảm phản ứng bì với kháng nguyên OA.

Levamisol, viên nang Linh lộc sơn liều 8,8 g/kg và Viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg đều làm gia tăng phản ứng bì so với lô mô hình với mức tăng lần lượt 5,7%, 2,9% và 6,5%. Điều này cho thấy Viên nang Linh lộc sơn liều 17,6 g/kg cải thiện phản ứng bì với kháng nguyên OA tốt hơn so với liều 8,8 g/kg.

Ngoài phản ứng bì với kháng nguyên OA, nồng độ cytokin trong máu cũng là chỉ số quan trọng để đánh giá đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Trong nghiên cứu này, cytokin trong máu được lựa chọn là IL-2 và TNF- α .

Cytokin là các hoạt chất do tế bào hoạt hóa tiết ra và gây được tác dụng lên các tế bào khác. Cytokin là tên gọi chung, dưới nó còn có nhiều nhóm nhỏ hơn được phân chia theo nguồn gốc, phạm vi và cách tác dụng...Về chức năng, nếu hoạt chất do một bạch cầu tiết ra và gây tác dụng lên một bạch cầu khác thì hoạt chất đó được gọi là interleukin (viết tắt IL).

IL-2 là một cytokin quan trọng, không thể thiếu trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. IL-2 do Th tiết ra có vai trò kích thích, tạo dòng thác miễn dịch trong cơ thể do:

- **Tác động vào chính bản thân Th do Th cũng có thụ thể với IL-2.**
- **Kích thích sự biệt hóa lympho bào B thành tương bào, sản xuất kháng thể.**
- **Hoạt hóa Tc giúp tiêu diệt tác nhân gây bệnh,...**

TNF- α (còn gọi là yếu tố hoại tử u) cũng là một cytokin tiền viêm chủ yếu do đại thực bào và Tc tiết ra. Thoạt đầu do TNF- α có khả năng gây hoại tử tế bào ung thư, nên được đặt tên như vậy. Trên thực tế, TNF- α còn có nhiều tác dụng sinh học khác trên đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào như diệt tế bào mang kháng nguyên, hoạt hóa quá trình chết theo chu trình của tế bào nội mô, hoạt hóa đại thực bào, tham gia vào quá trình viêm, kích thích sự di chuyển của các tế bào miễn dịch tới vị trí viêm...[52].

Kết quả nghiên cứu cho thấy CY có xu hướng làm giảm nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi so với lô chứng sinh học. Đồng thời, CY làm giảm rõ rệt nồng độ TNF- α , nguyên nhân có thể là do CY tăng cường quá trình chết theo chu trình của tế bào nội mô chuột nhất, mà TNF- α có vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa quá trình này [77]. Viên nang Linh lộc sơn ở cả 2 liều có tác dụng làm tăng nồng độ IL-2 và làm tăng TNF- α so với lô mô hình.

Như vậy, viên nang Linh lộc sơn ở cả 2 liều có tác dụng kích thích đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua làm tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA, tăng IL-2 và làm tăng TNF- α .

4.2.3. Ảnh hưởng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch theo YHCT

Theo quan điểm của YHCT, hệ thống miễn dịch của cơ thể liên quan chặt chẽ với chính khí của cơ thể. Chính khí của cơ thể bao gồm khí, huyết, âm, dương []. Khi chính khí bất túc, Khí huyết âm dương hư suy thì hệ thống miễn dịch của cơ thể sẽ bị ảnh hưởng.

Vì vậy, Linh lộc sơn với công dụng bổ khí dưỡng huyết bổ thận sinh tinh có tác dụng nâng cao chính khí; nên Linh lộc sơn sẽ có tác dụng tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Linh lộc sơn có tác dụng trên các chỉ số miễn dịch ... đặc biệt là chỉ số

Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu về tác dụng tăng cường miễn dịch của một số thuốc thuộc nhóm thuốc bổ khí huyết âm dương của YHCT.

Nhân sâm được biết đến từ lâu với vai trò là một chất điều biến miễn dịch. Rễ, thân và lá của Nhân sâm và chiết xuất của chúng đã được chứng minh có vai trò kích thích cả hệ miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu. Các polysaccharid cô lập từ Nhân sâm giúp tăng tiết TNF- α và cải thiện chức năng của các tế bào NK. Chiết xuất từ Nhân sâm làm tăng tăng tiết kháng thể lưu hành trong máu như IgM, IgG và IgA khi có sự xâm nhập của kháng nguyên gây bệnh [78]. Nhung hươu có tác dụng tăng cường miễn dịch, cải thiện tình trạng ổ loét và vết thương và chống ung thư [79]. Chiết xuất của Sâm cau đã được chứng minh làm tăng cường hoạt động của các đại thực bào, kích thích cả đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và miễn dịch dịch thể [80]. Trong nghiên cứu của Yaxin Zhao và cộng sự (2017), trên chuột nhắt bị gây tình trạng suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid đường tiêm màng bụng, các polysaccharid chiết xuất từ Ba kích đã giúp cải thiện số lượng bạch cầu chung, bạch cầu lympho, mono và trung tính, làm tăng trọng lượng lách, tuyến ức và nồng độ của IL-3 và IL-6 trong máu ngoại vi [81].

Các vị thuốc này đều có trong thành phần Linh lộc sơn. Tuy nhiên, Linh lộc sơn là 1 bài thuốc trong đó có sự phối ngũ của các vị thuốc nên tác dụng tăng cường miễn dịch của nó vượt trội so với dùng đơn vị.

KẾT LUẬN

Qua các kết quả nghiên cứu về tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang Linh lộc sơn có thể đưa ra kết luận: Viên nang Linh lộc sơn cả 2 liều 8,8g/kg và 17,6g/kg đều có tác dụng kích thích miễn dịch trên chuột nhắt trắng bị gây suy giảm miễn dịch cấp tính bằng cyclophosphamid liều 200 mg/kg, thông qua các chỉ số:

1. Tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch chung

- Viên nang Linh lộc sơn liều 8,8g/kg có xu hướng làm tăng trọng lượng lách tương đối, cải thiện rõ tình trạng tổn thương các cơ quan lách, tuyến ức trên hình ảnh vi thể so với lô mô hình.

- Viên nang Linh lộc sơn liều 17,6g/kg làm tăng rõ rệt trọng lượng lách tương đối, có xu hướng tăng số lượng bạch cầu chung và cải thiện rõ tình trạng tổn thương các cơ quan lách, tuyến ức trên hình ảnh vi thể so với lô mô hình.

2. Tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu

- Trên đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T: viên nang Linh lộc sơn cả 2 liều có xu hướng tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA, tăng nồng độ IL-2 và TNF- α trong máu ngoại vi so với lô mô hình.

- Trên đáp ứng miễn dịch dịch thể qua tế bào B: Viên nang Linh lộc sơn cả 2 liều đều làm tăng nồng độ IgM so với lô mô hình.

KIẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu trên động vật thực nghiệm về tác dụng điều biến miễn dịch của viên nang Linh lộc sơn xin đề xuất 2 kiến nghị sau:

- Đánh giá thêm về tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên các mô hình khác trên thực nghiệm.

- Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng của viên nang Linh lộc sơn trên lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bộ môn Miễn dịch – Sinh lý bệnh (2011)**, *Sinh lý bệnh và miễn dịch*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. **De Tommasi et al (2000)**. *Miễn dịch thiết yếu, Bản dịch của Roitt I.M*, Trường Đại học Y Hà Nội
3. **Đào Văn Chinh, Nguyễn Quốc Tuấn, Phạm Văn Thức (2002)**. *Miễn dịch học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học
4. **Các bộ môn nội (2012)**. *Điều trị bệnh nội khoa tập 2*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
5. **Bộ môn Dược lý (2013)**. *Dược lý học*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học
6. **Phạm Thị Vân Anh (2011)**. *Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch và chống oxy hóa của cao quả Nhàu (Morinda citrifolia L. Rubiaceae) trên động vật thực nghiệm*, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
7. **Đỗ Tất Lợi (2004)**. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
8. **Bộ Y tế (2018)**. *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
9. **Kim J.-M., Jeong J.-G., Ho S.-H. Et al (2003)**. Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist. *Gene Therapy*, **10(18)**, 1543–1550.
10. **Phạm Mạnh Hùng, Nguyễn Đình Hương, Đặng Đức Trạch, Lê Thế Trung (2002)**. *Các khía cạnh miễn dịch học trong bệnh học*, Nhà xuất bản Y học.
11. **Sergeeva A., Ono Y., Rios R. Et al (2008)**. High titer autoantibodies to

GM-CSF in patients with AML, CML and MDS are associated with active disease. *Leukemia*, **22(4)**, 783–790

12. **Faderl S., Harris D., Van Q. Et al** (2003). Granulocyte- acrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces antiapoptotic and proapoptotic signals in acute myeloid leukemia. *Blood*, **102(2)**, 630–637.
13. **Fabregat I., Fernando J., Mainez J. Et al.** (2014). TGF-beta signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des*, **20(17)**, 2934–2947.
14. **Bộ môn Dược lý** (2004). *Dược lý học lâm sàng*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, 567-578.
15. **Phạm Thị Vân Anh** (2003). *Nghiên cứu độc tính và tác dụng kích thích miễn dịch của cao trái nhàu trên thực nghiệm*. Trường đại học Y Hà Nội.
16. **Kynina E.S., Dziubak S.T., Vitvitskiĭ V.M. Et al** (1991). Immunomodulating effect of levamisole in antibiotic therapy. *Antibiot Khimioterapiia Antibiot Chemoterapy Sic*, **36(1)**, 26–28
17. **British National Formulatoiy** (2008). Immunological products and vaccines. *BMJ Grong RPS Publ*, **56**, 651–674.
18. **Phạm Huy Quyền** (1996). *Tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ cây nhàu trên súc vật thí nghiệm*. Trường Đại học Y Hà Nội.
19. **Nguyễn Trọng Thông** (1981). *Tác dụng dược lý của cao rượu rễ nhàu trên thực nghiệm*. Trường Đại học Y Hà Nội.
20. **Ronit E, Hope L** (2009). The biology of cancer and its relationship to disparities in cancer occurrence and outcomes. *Cause Evid –Based Solut*, Springer Publishing Company, New York 12-14.
21. **Nguyễn Gia Chấn, Bùi Thị Bằng, Lê Nguyệt Nga cùng cộng sự** (1998). Tác dụng phục hồi miễn dịch của polysaccarid chiết từ rễ củ cây đương quy Nhật Bản: Thông báo số 1. *Tạp Chí Dược Liệu*, **2**, 47–49.

22. **Palumbo E.** (2011). Pegylated Interferon and Ribavirin Treatment for Hepatitis C Virus Infection. *Ther Adv Chronic Dis*, **2(1)**, 39–45
23. **Nguyễn Thị Vinh Hà, Phạm Huy Quyến, Phan Thị Phi Phi** (1994). Về mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm, *Kỹ yếu công trình nghiên cứu khoa học*, Trường Đại học Y Hà Nội, 16-17
24. **Đỗ Quốc Việt** (2000). *Nghiên cứu các hợp chất anthraquinon trong cây nhàu Việt Nam*. Viện hóa học Hà Nội.
25. **Manepalli S., Gandhi J.A., Ekhar V.V. Et al** (2013). Characterization of a cyclophosphamide-induced murine model of immunosuppression to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *J Med Microbiol*, **62(Pt 11)**, 1747–1754.
26. **Vigila A. và Baskaran X.** (2008). Immunomodulatory Effect of Coconut Protein on Cyclophosphamide Induced Immune Suppressed Swiss Albino Mice. *Ethnobot Leaflet* 12 1206-12, **2008(1)**.
27. **Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC** (2011). “Chap 61: Cytotoxic Agents”, *Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics 12e, McGraw-Hill Global Education Holdings*
28. **Kyakulaga A.H., Ogwang P.E., Obua C. Et al** (2013). Immunomodulatory Effects of Aqueous Extracts of *Auricularia* sp and *Pleurotus* sp Mushrooms in Cyclophosphamide- Immunosuppressed Wistar Rats. *Br J Pharm Res*, **3(4)**, 662–670.
29. **Khoa Y học cổ truyền, Trường Đại học Y Hà Nội** (2017). *Bệnh học nội khoa Y học cổ truyền*, Nhà xuất bản Y học, 128-136
30. **Hải Thượng Lãn Ông** (2008). *Phép tắc chữa bệnh*, Nhà xuất bản Y học, tập 1, 357, 372.
31. **Nguyễn Bá Tĩnh** (2007). *Tuệ Tĩnh toàn tập - Nam dược thần hiệu*, Nhà xuất bản Y học, Hà. Nội, 140-142

32. **Khoa Y học cổ truyền, trường Đại Học Y Hà Nội** (2006). *Chuyên đề nội khoa Y học cổ truyền*, NXB Y học, tr 470-473
33. **Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Minh Đức** (2014). Nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của cao xương cá sấu hoa cà, *Tạp chí Viện Dược liệu – Bộ Y tế số 4/2014*
34. **Nguyễn Thị Mỹ Nương và cộng sự** (2017). Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của Bài thuốc Nam Địa Long trên chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphomide, *Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ*, chuyên san khoa học tự nhiên, tập 1, số 6 năm 2017.
35. **Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông** (2020). Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic – viên nén Giải độc gan Tuệ Linh trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Tập 491(1), tr. 261-266.
36. **Du X., Pan H., Zhang C. và cộng sự** (2010). Zingiber officinale extract modulates g-rays-induced immunosuppression in mice. *J Med Plants Res*, **4(16)**, 1647–1655.
37. **Guo L., Zhang X., Zheng B. và cộng sự.** (2008). IgM-mediated signaling is required for the development of a normal B cell memory response. *Mol Immunol*, **45(4)**, 1071–1077.
38. **Phan Anh Tuấn** (2006). *Đánh giá tác dụng phục hồi tổn thương hệ miễn dịch sau chiếu xạ của “Đông trùng hạ thảo nam- sâu chít” (Brihaspa atrostigmella moore 1868) giai đoạn thực nghiệm.* Trường Đại học Y Hà Nội, tr. 48 – 54.
39. **Vũ Triệu An, Lê Đức Cư, Văn Đình Hoa và cs** (1982). *Những kỹ thuật cơ bản dùng trong miễn dịch học*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội
40. **Bộ môn Y học dân tộc, Trường Đại học Y Hà Nội** (2001). *Kim quỹ*

yếu lược, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr 83.

41. **Khoa Y học cổ truyền, Trường Đại học Y Hà Nội** (2006). *Nội kinh*, Nhà xuất bản Y học, tr. 150.
42. **Hoàng Bảo Châu** (1998). *Phương thuốc cổ truyền*, Nhà xuất bản Y học, tr.311
43. **Brydges S. và Kastner D.L** (2006). The systemic autoinflammatory diseases: inborn errors of the innate immune system. *Curr Top Microbiol Immunil*, 305, 127 – 160.
44. **Alcamí J.** (2004). [Advances in the immunopathology of HIV infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* (8), 486 - 496
45. **Alfano M., Rizzi C., Corti D.et al.** (2005). Bacterial toxins: potential weapons against HIV infection. *Curr Phảm Des*, 11(22), 2909-2926.
46. **许继平, 裘维焰,等** (1988)。益气养阴法与化疗对比治疗中晚期支气管肺癌生存率的追踪观察[J], *江苏 中医 杂志*, (12), 37.
Hứa Kế Bình, Cầu Duy Diễm (1988). Nghiên cứu thời gian sống thêm trên bệnh nhân ung thư phổi giai đoạn giữa và cuối của pháp ích khí dưỡng âm so sánh với hóa trị liệu, *Tạp chí Trung y Giang Tô*, 12, 37
47. **潘敏求, 黎月恒, 刘静安** (1990). 肺复方与化疗对照治疗中晚期原发性支气管肺鳞癌 80 例报道[J], *中国中医药学报*, 5 (3), 19.
Phan Mẫn Cầu, Lê Nguyệt Hằng, Lưu Tịnh An (1990). Đánh giá tác dụng điều trị của bài thuốc Phế phụ phương kết hợp với hóa trị liệu trong điều trị 80 bệnh nhân ung thư phế quản tế bào vảy giai đoạn III và IV, *Tạp chí Trung y dược Trung Quốc*, 5 (3), 19.
48. **Nguyễn Xuân Phách, Lê Bảo Toàn, Lê Văn Thảo, Trần Đăng Khoa** (1993). Thăm dò tác dụng của thuốc tảo Spirullina trên bệnh nhân ung thư được điều trị bằng tia phóng xạ. *Tạp chí học Việt Nam*, 7, 144 – 147.
49. **Kuo Y.H and Kuo L.M.** (1997). Antitumour and anti – AIDS

triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, 44(7), 1275 – 1281.

50. **Toh D-F, Patel D, Chan E et.al.** (2011). Anti – proliferative effects of raw and steamed extracts of *Panax notoginseng* and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells. *Chin Med*, 6(1),4.
51. **Mishra J, Rajput R, Singh K, et al** (2019). Antioxidant – Rich Peptide Fractions Derived from High-Altitude Chinese Caterpillar Medicinal Mushroom *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes) Inhibit Bacterial Pathogens. *Int J Med Mushrooms*, 21(2), 155-168.
52. Văn Đình Hoa và Nguyễn Ngọc Lanh (2011), Sinh lý bệnh và miễn dịch, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
53. Vũ Triệu An (2001), Miễn dịch học, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
54. Goodman and Gilman (2010), The pharmacological basis of therapeutics, twelfth edition, McGraw-Hill Companies, Inc
55. Bộ Y tế (2015), Dược thư quốc gia, Hội đồng Dược điển Việt Nam, Nhà Xuất bản Y học, Hà Nội.
56. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, et al (2015), Rang and Dale’s pharmacology, eighth edition, Elsevier, UK.
57. Hussain A, Shadma W, Maksood A, et al (2013). Protective effects of *Picrorhiza kurroa* on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Pharmacognosy Res*, 5(1), 30-35.
58. Zhao X, Zhang Y, Song X, et al (2015). Effect of *Chuanminshen violaceum* polysaccharides and its sulfated derivatives on immunosuppression induced by cyclophosphamide in mice. *Int J Clin Exp Med*, 8(1), 558-568.
59. Gong Y, Wu J and Shi-Tong Li (2015). Immuno-enhancement effects of *Lycium ruthenicum* Murr. polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Int J Clin Exp Med*, 8(11), 20631–20637.

60. Nguyễn Thị Vinh Hà, Phạm Huy Quyển, Phan Thị Phi Phi (1994). Về mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm. Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học, 5, 16-17.
61. Nguyễn Văn Rur và Quách Thị Hà Vân (2015). Thử nghiệm tác dụng kích thích miễn dịch của pidotimod tổng hợp trên động vật thí nghiệm. Tạp chí Dược học, 55(469), 26-31.
62. Phạm Thị Vân Anh (2011), Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch và chống oxy hóa của cao quả Nhàu (*Morinda citrifolia* L. Rubiaceae) trên động vật thực nghiệm, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
63. Qi L, Song Y, Wang W, et al (2010). Comparison of immunosuppression induced by different doses of cyclophosphamide in normal mice. *Wei Sheng Yan Jiu*, 39(3), 313-5.
64. Phạm Thủy Phương, Trương Việt Bình, Phạm Thị Vân Anh và cộng sự (2014). Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của Hồi xuân hoàn trên chuột nhắt trắng bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. Tạp chí dược học, 54 (461), 25-30.
65. Đào Văn Phan (2012), Dược lý học lâm sàng, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
66. Mahabady M and Varzi H and Shi-Tong Li (2011). Prophylactic effects of levamisole and vitamin E on phenobarbital-induced cleft palate and spina bifida in rat embryos. *Iran J Pharm Res*, 10(1), 135–140.
67. Gupta M (2016). Levamisole: A multi-faceted drug in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 82(2), 230-236.
68. Patnaik S, Balderia P, Vanchhawng L, et al (2015). Levamisole: Is levamisole-induced vasculitis a relegated diagnostic possibility? A case report and review of literature. *Am J Case Rep*, 16, 658-662.
69. Chen LY, Lin YL and Chiang BL (2008). Levamisole enhances immune

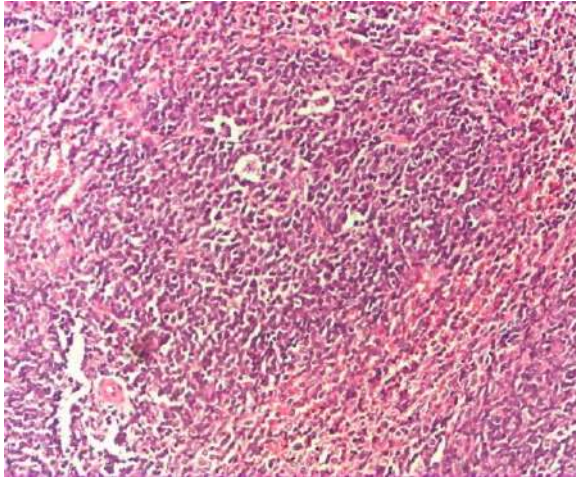
response by affecting the activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 151(1), 171-181.

70. Phạm Thủy Phương, Trương Việt Bình, Phạm Thị Vân Anh và cộng sự (2014). Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của Hồi xuân hoàn trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. *Tạp chí Dược học*, 54(461), 25-30.
71. Tamura T and Fujiwara K (1979). IgM and IgG response to sheep red blood cells in mouse hepatitis virus-infected nude mice. *Microbiol Immunol*, 23(3), 177-183.
72. Phạm Thủy Phương, Trương Việt Bình, Phạm Thị Vân Anh và cộng sự (2014). Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của Hồi xuân hoàn trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. *Tạp chí Dược học*, 54(461), 25-30.
73. Haquea MR, Ansaria SH and Rashikhbv A (2013). Coffea arabica seed extract stimulate the cellular immune function and cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 101-108.
74. Iyer S, HogenEsch H and Hem SL (2003). Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine* 21, 1219–1223
75. Morefield GL, Jianga D, Romero-Mendez IZ, et al (2005). Effect of phosphorylation of ovalbumin on adsorption by aluminum-containing adjuvants and elution upon exposure to interstitial fluid. *Vaccine* 23, 1502–1506.
76. Katzung GB (2011), *Basic and Clinical Pharmacology*, twelfth edition, McGraw-Hill Companies, Inc.
77. Ohtani T, Nakamura T, Toda K, et al (2006). Cyclophosphamide

enhances TNF- α -induced apoptotic cell death in murine vascular endothelial cell. *FEBS Lett*, 580(6), 1597-600.

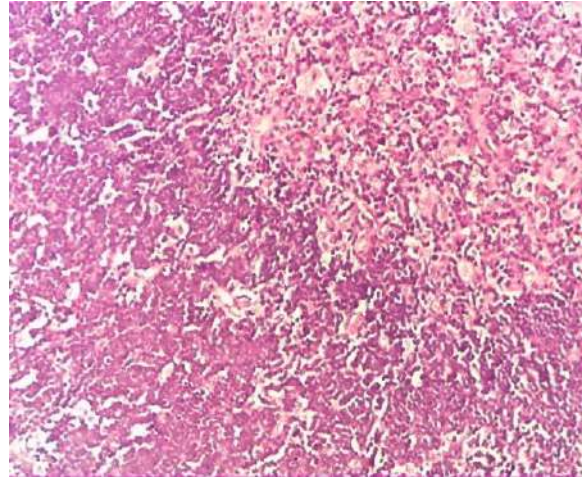
- 78.** Kang S. and Min, H. (2012). Ginseng, the 'Immunity Boost': The Effects of *Panax ginseng* on Immune System. *Journal of ginseng research*, 36(4), 354–368.
- 79.** Kyu-Jin Yang, Ki-Beom Lee, No-Hyeon Kim et al (2017). Establishment and Selection of Indicator Materials for *Cervi Parvum Cornu* Pharmacopuncture. *Journal of Acupuncture Research*. 34(4), 180-184.
- 80.** Vijai Lakshmi, K Pandey, Anju Puri et al (2004). Immunostimulant principles from *Curculigo orchioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2-3),181-4.
- 81.** Jian Liang, Jiwang Liang, Hairong Hao et al (2017). The Extracts of *Morinda officinalis* and Its Hairy Roots Attenuate Dextran Sodium Sulfate-Induced Chronic Ulcerative Colitis in Mice by Regulating Inflammation and Lymphocyte Apoptosis. *Frontiers in Immunology*, 8, 905.

PHỤ LỤC 1:
KẾT QUẢ GIẢI PHẪU BỆNH LÁCH VÀ TUYẾN ỨC CỦA CHUỘT



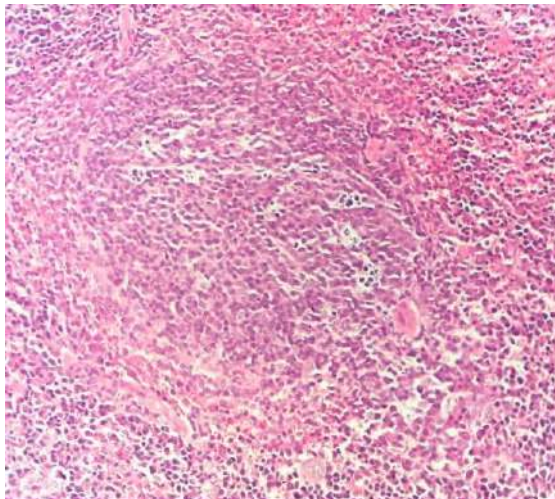
Ảnh 1: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô chứng sinh học (chuột số 1)
(HE × 20)

Lách bình thường



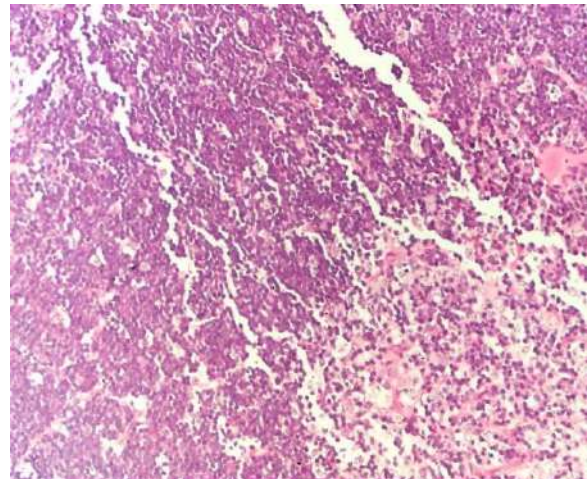
Ảnh 2: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô chứng sinh học (chuột số 1)
(HE × 20)

Tuyến ức bình thường



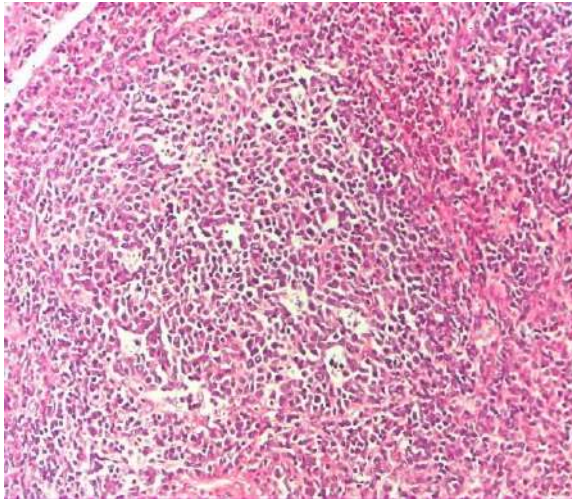
Ảnh 3: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô chứng sinh học (chuột số 6)
(HE × 20)

Lách bình thường



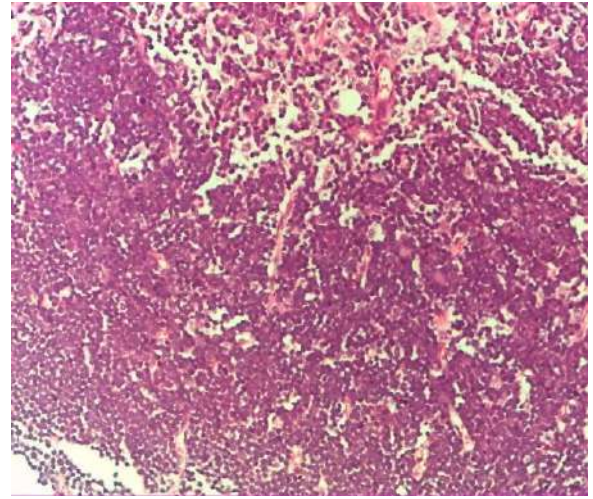
Ảnh 4: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột
lô chứng sinh học (chuột số 6)
(HE × 20)

Tuyến ức bình thường



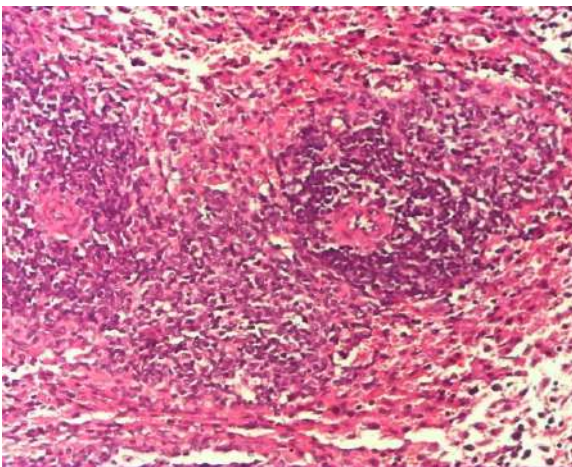
Ảnh 5: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô chứng sinh học (chuột số 9)
(HE × 20)

Lách bình thường



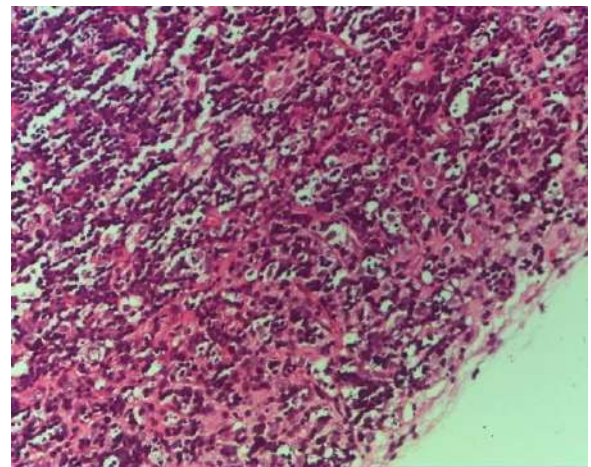
Ảnh 6: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô chứng sinh học (chuột số 9)
(HE × 20)

Tuyến ức bình thường



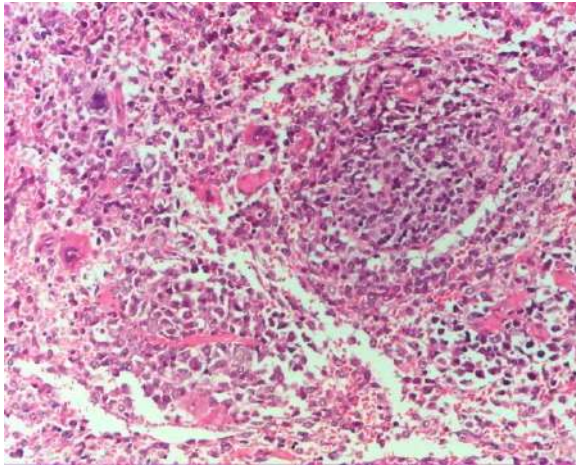
Ảnh 7: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô mô hình (chuột số 16)
(HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tủy trắng
giảm nhẹ*



Ảnh 8: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô mô hình (chuột số 16)
(HE × 20)

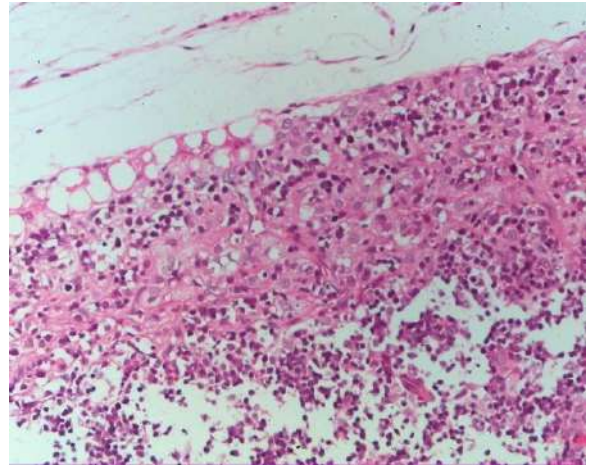
*Số lượng lympho bào của tuyến ức
giảm nặng*



Ảnh 9: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô mô hình (chuột số 18)

(HE × 20)

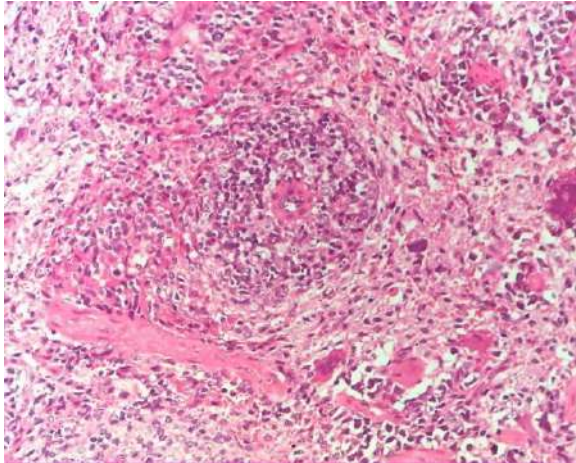
*Số lượng lympho bào của tủy trắng
giảm nặng*



Ảnh 10: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô mô hình (chuột số 18)

(HE × 20)

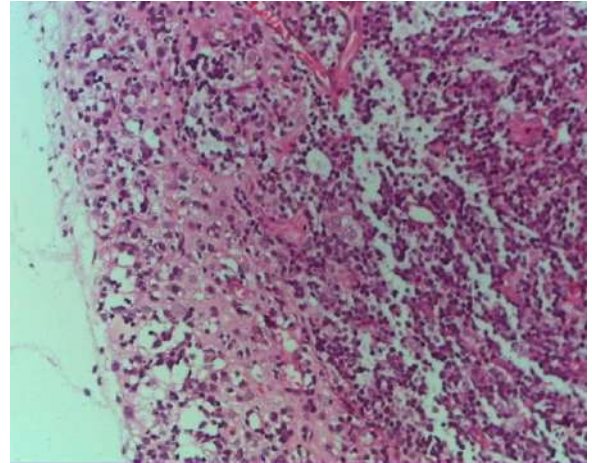
*Số lượng lympho bào của tuyến ức
giảm nặng*



Ảnh 11: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô mô hình (chuột số 19)

(HE × 20)

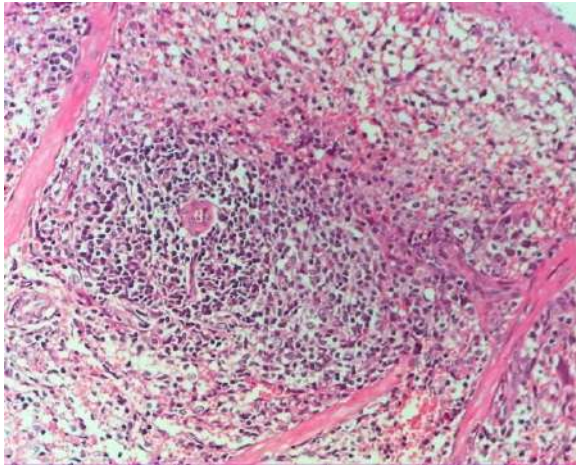
*Số lượng lympho bào của tủy trắng
giảm nặng*



Ảnh 12: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô mô hình (chuột số 19)

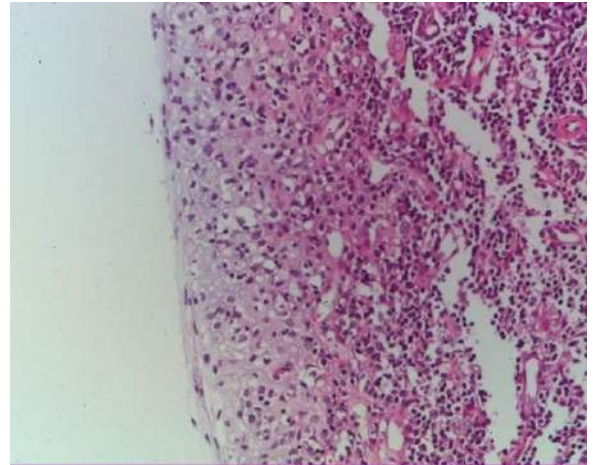
(HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tuyến ức
giảm nặng*



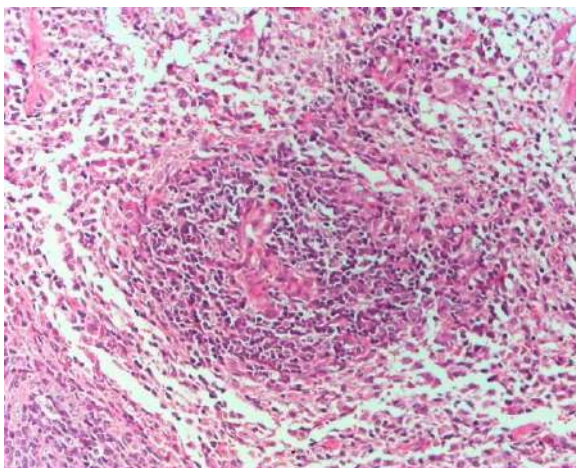
Ảnh 13: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống levamisol (chuột số 22)
(HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tủy trắng
tăng nhẹ so với mô hình*



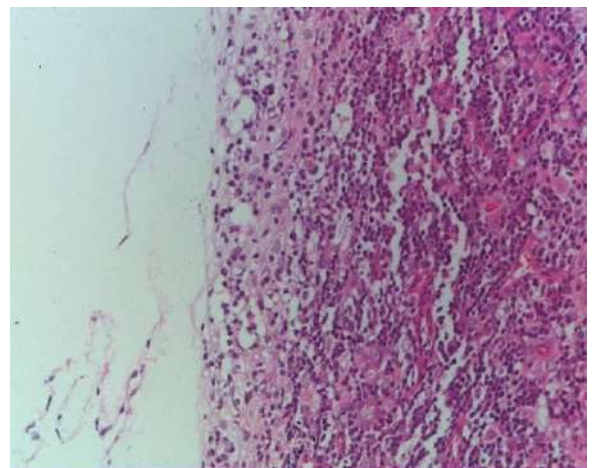
Ảnh 14: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống levamisol
(chuột số 22) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tuyến ức
không tăng, như mô hình*



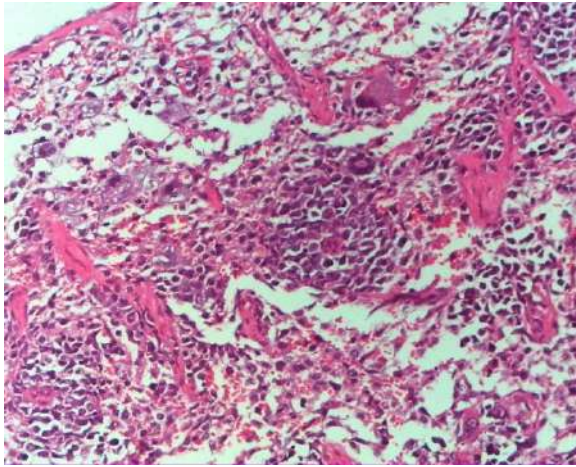
Ảnh 15: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống levamisol (chuột số 29)
(HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tủy trắng
tăng nhẹ*



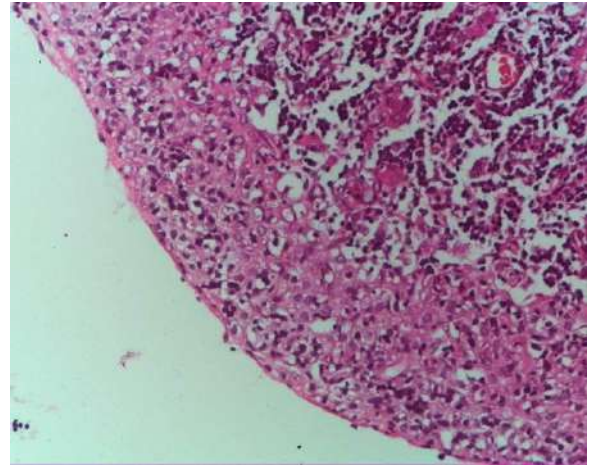
Ảnh 16: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống levamisol
(chuột số 29) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tuyến ức
tăng nhẹ*



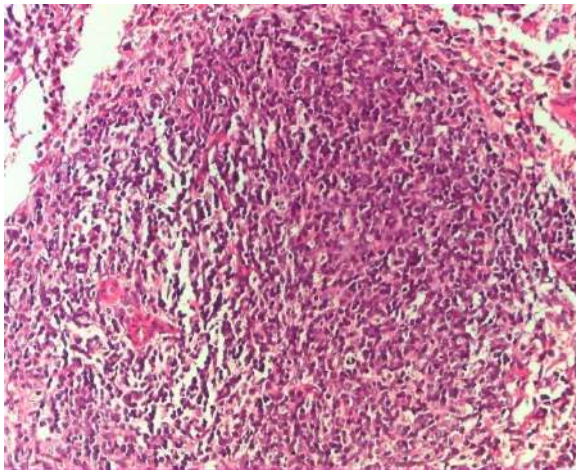
Ảnh 17: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống levamisol (chuột số 30)
(HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tủy trắng
tăng nhẹ*



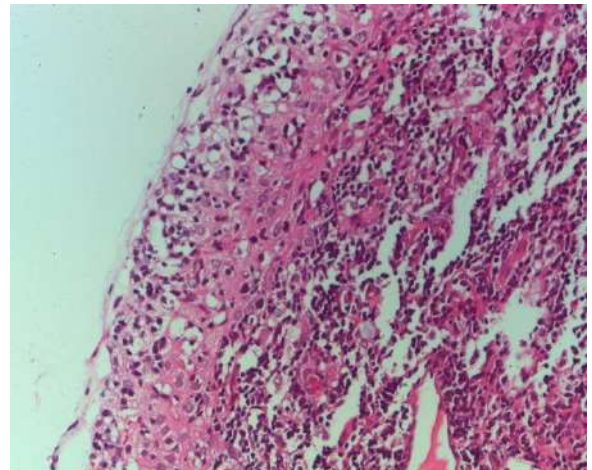
Ảnh 18: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống levamisol (chuột số
30) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào không tăng,
như mô hình*



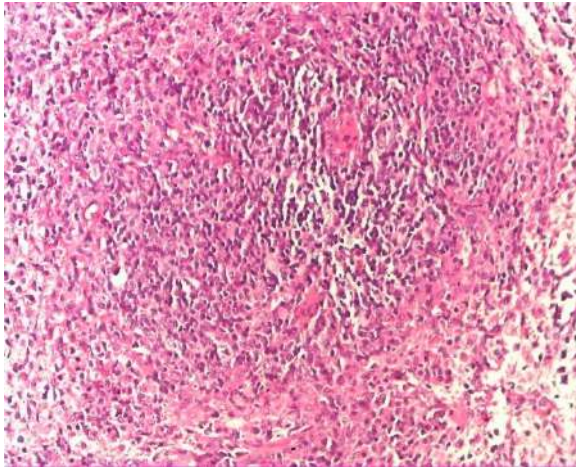
Ảnh 19: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống Linh lộc sơn liều
8,8g/kg
(chuột số 36) (HE × 20)

*Số lượng lympho bào của tủy trắng
tăng nhiều*

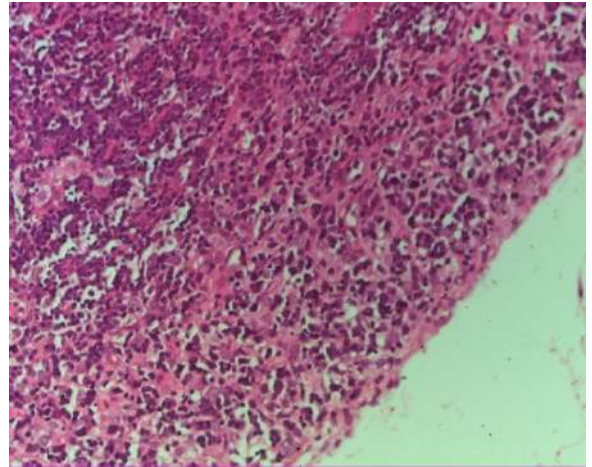


Ảnh 20: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống Linh lộc sơn liều
8,8g/kg (chuột số 36) (HE × 20)

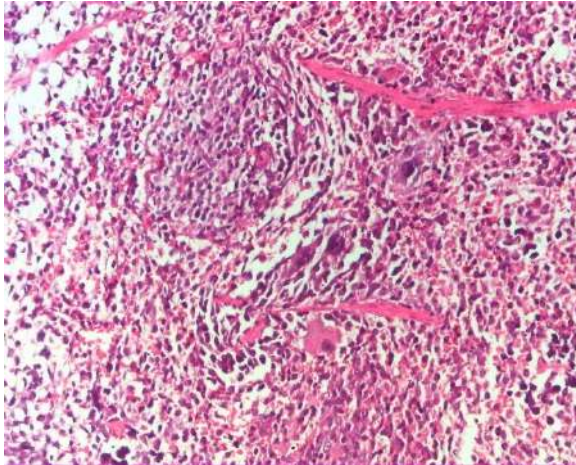
*Số lượng lympho bào tăng nhẹ vùng
vỏ*



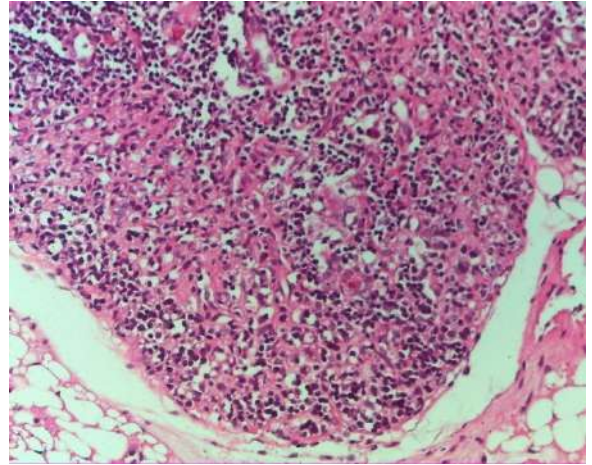
Ảnh 21: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống Linh lộc sơn liệu
1,44 viên/kg (chuột số 38) (HE × 20)
*Số lượng lympho bào của tủy trắng
tăng nhẹ*



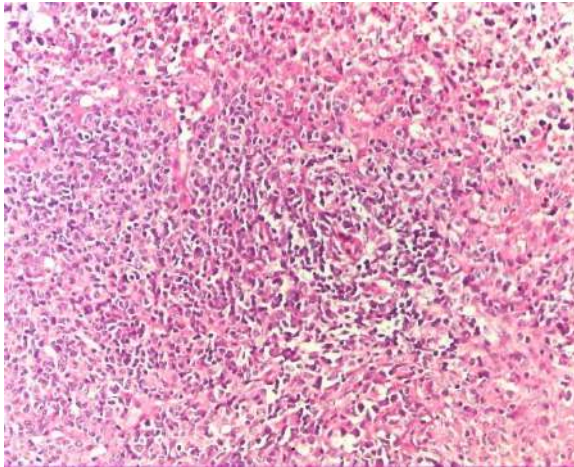
Ảnh 22: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống Linh lộc sơn liệu
1,44 viên/kg (chuột số 38) (HE × 20)
*Số lượng lympho bào tăng nhẹ
vùng vỏ*



Ảnh 23: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống Linh lộc sơn liệu
8,8g/kg (chuột số 40) (HE × 20)
*Số lượng lympho bào của tủy trắng
tăng nhẹ*



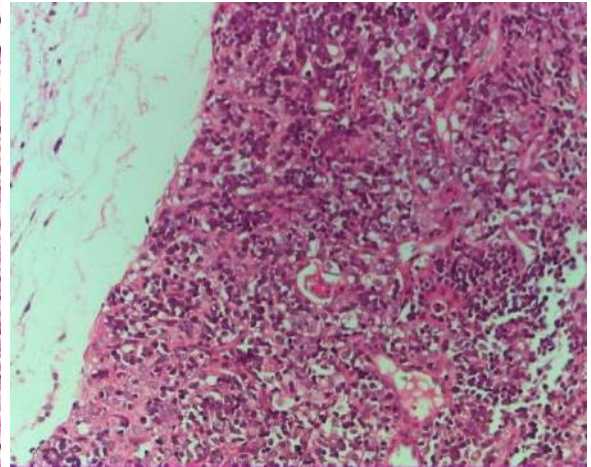
Ảnh 24: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống Linh lộc sơn liệu
8,8g/kg (chuột số 40) (HE × 20)
Số lượng lympho bào tăng nhẹ



Ảnh 25: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg

(chuột số 42) (HE × 20)

Số lượng lympho bào của tủy trắng tăng nhiều so với mô hình

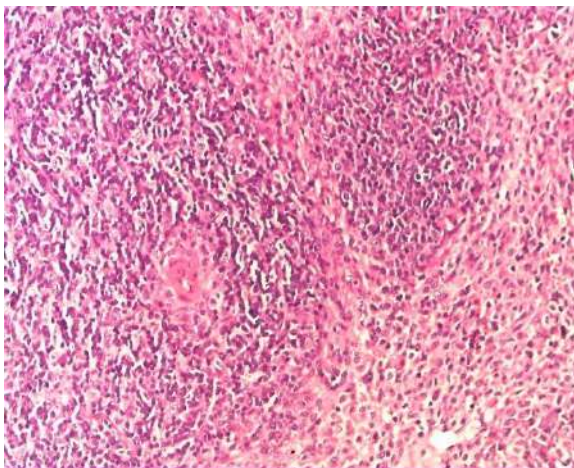


Ảnh 26: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg

(chuột số 42) (HE × 20)

(chuột số 42) (HE × 20)

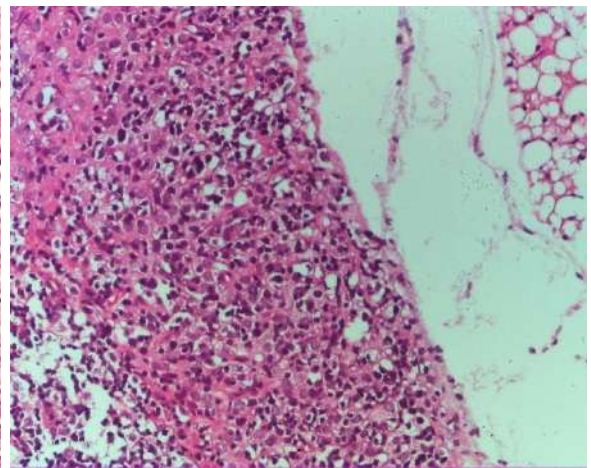
Số lượng lympho bào tăng nhẹ vùng vỏ



Ảnh 27: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg

(chuột số 43) (HE × 20)

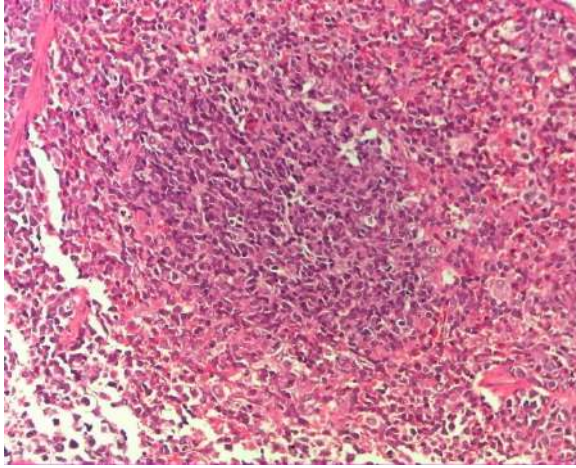
Số lượng lympho bào của tủy trắng tăng vừa so với mô hình



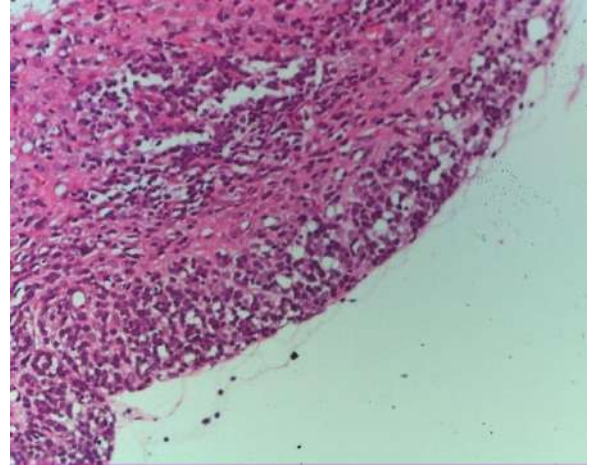
Ảnh 28: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Linh lộc sơn liều 17,6g/kg

(chuột số 43) (HE × 20)

Số lượng lympho bào tăng vừa vùng vỏ



Ảnh 29: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống Linh lộc sơn liều
17,6g/kg (chuột số 45)(HE × 20)
*Số lượng lympho bào của tủy trắng
tăng nhiều so với mô hình*



Ảnh 30: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống Linh lộc sơn liều
17,6g/kg (chuột số 45)(HE × 20)
*Số lượng lympho bào tăng nhẹ so với
mô hình*

PHỤ LỤC 2
QUY TRÌNH SẢN XUẤT VIÊN NANG CỨNG LINH LỘC SƠN

I. THÀNH PHẦN VÀ ĐẶC ĐIỂM NGUYÊN LIỆU :

TT	Tên nguyên liệu	Tên khoa học	Tiêu chuẩn
1	Nhân sâm	Rhizoma et Radix Ginseng	DĐVN V
2	Nhung hươu	Cornu cervi pantotrichum	DĐVN V
3	Hoài sơn	Tuber Dioscoreae persimilis	DĐVN V
4	Sâm cau (Thân rễ)	Rhizoma Curculiginis	DĐVN V
5	Ba kích (rễ)	Radix Morindae officinalis	DĐVN V
6	Hà thủ ô đỏ (rễ)	Radix fallopiae multiflorae	DĐVN V
7	Tá dược	Vừa đủ cho 1 viên	DĐVN V

Tất cả các nguyên liệu được kiểm tra tại phòng kiểm nghiệm của công ty theo tiêu chuẩn của dược điển Việt Nam V. Yêu cầu phải đạt trước khi đưa vào sản xuất.

II. CÔNG THỨC SẢN XUẤT :

Công thức tính 1 viên LINH LỘC SƠN hàm lượng tương đương kl 500mg±5%

TT	Tên nguyên liệu	Hàm lượng viên dạng dược liệu (mg)	Cao khô hỗn hợp tương ứng (mg)
1	Nhân sâm	333.3	480mg
2	Nhung hươu	166.6	
3	Hoài sơn	1666.6	
4	Sâm cau	833.3	
5	Ba kích	1666.6	
6	Hà thủ ô đỏ	1666.6	
7	Tá dược Magnesium stearate, tal vừa đủ một viên		

III. XỬ LÝ NGUYÊN LIỆU :

1. Bào chế, chế biến :

Các nguyên liệu dược liệu được xử lý, chế biến theo dược điển Việt Nam IV.

2. Chiết xuất cao đặc :

2.1. Phương pháp chiết xuất: phương pháp chiết nước.

2.2. Điều kiện chiết xuất

- Số lần chiết : 2
- Tỷ lệ dung môi : dược liệu = 7:1
- Nhiệt độ chiết : 100°C
- Thời gian chiết : 3h cho lần 1 và 2h cho lần 2
- Để lắng và lọc trước khi cô cao

2.3. Cô cao

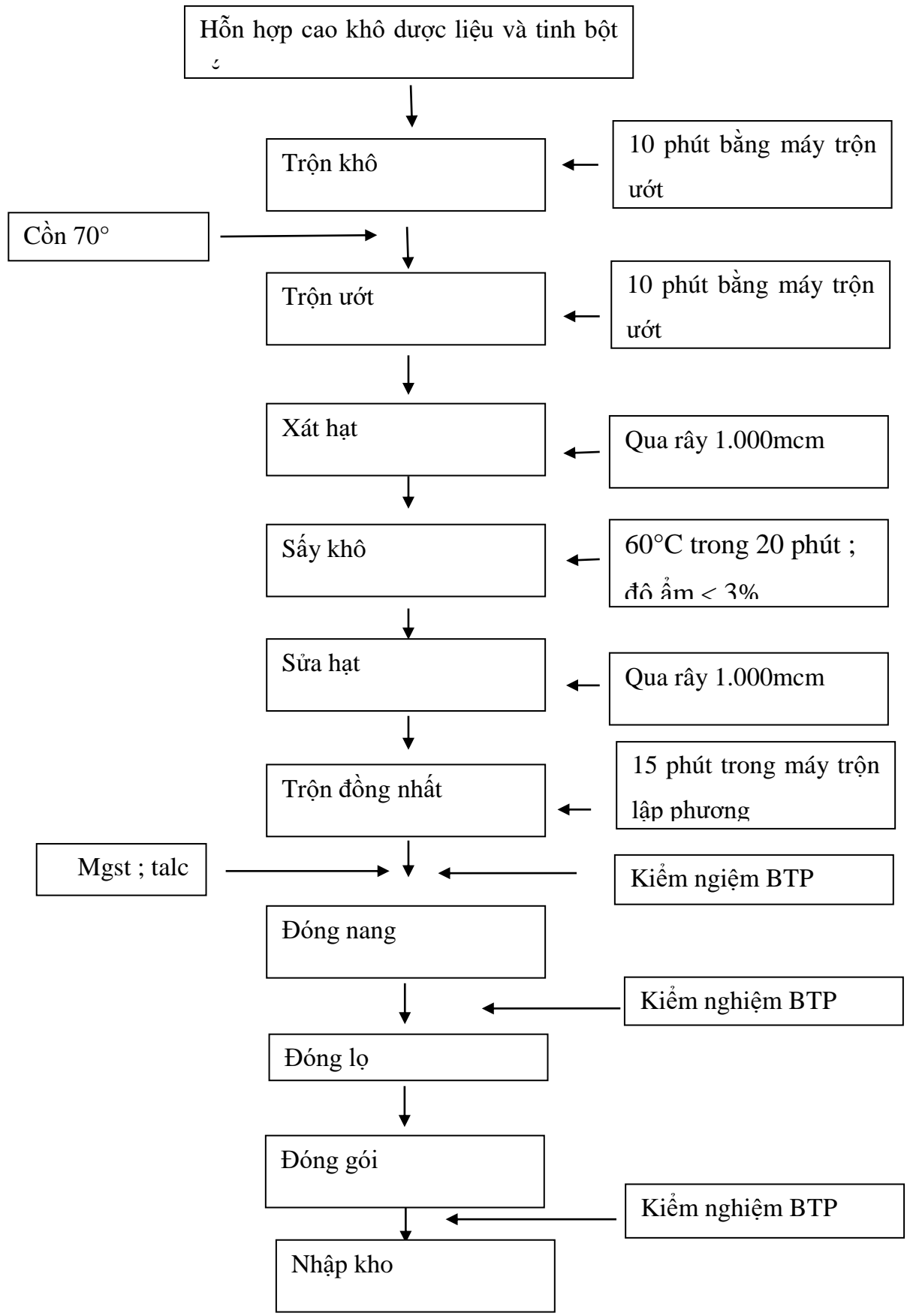
- Phương pháp cô : cô hở, áp suất thường
- Nhiệt độ cô : 100°C
- Độ ẩm cao : cô về cao có độ ẩm 15 – 20%

3. Làm cao khô :

- Cao đặc còn nóng được đổ mỏng ra khay lót nilon chống dính.
- Sấy ở 80°C đến khô (khoảng 50-60h) ; cao khô độ ẩm $\leq 2\%$.
- Bánh cao khô được bẻ vỡ rồi nghiền thành bột mịn.
- Tỷ lệ cao khô thu được đạt 8,5% so với dược liệu

IV. QUY TRÌNH SẢN XUẤT :

1. Sơ đồ sản xuất :



2. Mô tả quy trình sản xuất :

2.1. chuẩn bị :

- Kiểm tra dọn quang dây chuyền theo SOP.
 - Công nhân phải được trang bị đầy đủ dụng cụ bảo hộ lao động, vệ sinh sạch sẽ, đeo găng tay khi thao tác công việc theo đúng quy trình thao tác chuẩn.
- Tổ trưởng, IPC phải kiểm tra việc thực hiện tốt công việc này theo SOP đã phê duyệt.*

2.2. tiến hành sản xuất :

a. Nhào trộn

Pha chế tá dược dính :

- Ethanol 70°

Thiết bị: Máy trộn ướt tạo hạt JP300

- Cài đặt thông số máy:

	Thông số cài đặt	Ghi chú
Thời gian trộn khô	10 phút	
Thời gian trộn ướt tạo hạt	10 phút	
Tốc độ cánh trộn	30 vòng/phút	

- Tiến hành: cho hỗn hợp cao dược liệu và tinh bột sẵn vào máy trộn, trộn khô 10 phút cho đều rồi đổ đều lên 70° lên khối bột. Bật máy, thời gian trộn là 10 phút.

- Sau khi hết thời gian trộn. xả khối bột ẩm vào các xô có lồng túi PE.

b. Xát hạt

- Nguyên liệu: Hỗn hợp bột ẩm ở trên.
- Thiết bị: rây xát hạt, cỡ lưới 1.000 mcm,
- Cóm sau khi xát, cho vào thuyền sấy của máy sấy tầng sôi để sấy khô.

c. Sấy khô

- Nguyên liệu: Hạt cốm còn ẩm từ giai đoạn trên.
- Thiết bị: Máy sấy tầng sôi tự động FG-120 Cài đặt thông số:

	Thông số vận hành
Tốc độ quạt hút	1800-2000
Vị trí cửa gió vào	4
Thời gian làm việc (phút)	25 - 35
Nhiệt nguồn	70
Nhiệt làm việc	60
Số lần đóng mở cửa	4
Số lần giữ túi	2

- Kết thúc quá trình sấy, khi hàm ẩm hạt <4%

d. Sấy hạt

- Nguyên liệu: hạt cốm đã sấy khô ở giai đoạn trên.
- Thiết bị: rây 1.000mcm
- Tiến hành:
- Rây cốm đã sấy khô qua rây 1.000mcm.
- + Cân tổng khối lượng cốm thu được.
- + Ghi nhãn.

e. Trộn đồng nhất

- Nguyên liệu: cốm đã sấy khô và 2% magnesium stearat và 2% talc
- Thiết bị: máy trộn lập phương
- Cài đặt thông số:
- + Vận tốc trộn: 20 vòng/phút
- + Thời gian trộn: 15 phút

-Tiến hành: Hỗn hợp Talc, Magnesium stearat, cốm khô cho vào máy, sau khi trộn xong thu lại cốm qua rây 1.400 mm.

- Sau khi trộn xong, đựng cốm trong 2 lần túi PE buộc kín, cân khối lượng cốm thu được, dán nhãn và ghi vào hồ sơ lô.

+ Nhập kho bán thành phẩm cốm.

+ Lấy mẫu kiểm tra bán thành phẩm cốm:

f. đóng nang :

- Sau khi kết quả kiểm tra bán thành phẩm cốm đạt kết quả tiến hành chuyển cốm sang đóng nang.

- Nguyên liệu : bán thành phẩm cốm trên

- Thiết bị : sử dụng máy đóng nang tự động JP200 để đóng nang.

- Yêu cầu : khối lượng viên : 600mg +- 5% cả vỏ

- Sau khi đóng xong chứa vào 2 lần túi PE, nhập kho bán thành phẩm

- Lấy mẫu viên kiểm tra bán thành phẩm viên

Nhân viên đóng nang phải kiểm tra 15 phút/lần trong quá trình đóng nang.

g. đóng lọ :

- sau khi kết quả kiểm tra bán thành phẩm viên đạt kết quả tiến hành chuyển viên qua đóng lọ.

- đóng lọ : 60 viên/lọ.

h. đóng gói :

- quy cách đóng gói theo lệnh sản xuất.

i. kiểm tra thành phẩm, đạt nhập kho

V. KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT

Giai đoạn kiểm tra	Nội dung kiểm tra	Phương pháp kiểm tra	Tiêu chuẩn áp dụng	Kết quả	Người tiến hành	Người kiểm tra
Trộn đồng nhất	Định tính dược liệu	Sắc ký lớp mỏng	tccs	Dương tính	Nhân viên QC	Trưởng phòng QC
Đóng nang	Độ đồng đều khối lượng	cân	tccs	Đạt	Nhân viên vận hành máy	Nhân viên IPC
	Độ rã	Đo độ rã bằng máy đo	tccs	Đạt	Nhân viên IPC	Nhân viên QC
	Định tính dược liệu	Sắc ký lớp mỏng	tccs	Dương tính	Nhân viên QC	Trưởng phòng QC
Đóng gói	Độ đồng đều khối lượng	cân	tccs	Đạt	Nhân viên vận hành máy	Nhân viên IPC
	Độ rã	Đo độ rã bằng máy đo	tccs	Đạt	Nhân viên IPC	Nhân viên QC
	Định tính dược liệu	Sắc ký lớp mỏng	tccs	Dương tính	Nhân viên QC	Trưởng phòng QC

Giám đốc công ty

PHỤ LỤC 3

CÁC VỊ THUỐC TRONG VIÊN NANG “LINH LỘC SƠN”

1. Nhân sâm:

Tên khoa học: *Rhizoma et Radix Ginseng*

Bộ phận dùng:

Thân rễ và Rễ đã phơi hay sấy khô của cây Nhân sâm (*Panax ginseng* C.A.Mey), họ Nhân sâm (*Araliaceae*)

Tính vị, quy kinh: Cam, khổ, bình. Vào kinh tỳ, phế, tâm.

Tác dụng: Đại bổ nguyên khí, ích huyết, kiện tỳ ích phế, sinh tân, an thần ích trí. Chủ trị: Khí hư muốn thoát, chân tay lạnh, mạch vi, tỳ hư, kém ăn, phế hư ho suyễn; tân dịch thương tổn, miệng khát nước, nội nhiệt tiêu khát, đái tháo, bệnh lâu ngày gây yếu, tâm hồi hộp, suy tim kiệt sức, hay choáng ngất.

Liều lượng: Ngày dùng từ 4 g đến 10 g. Dạng thuốc hãm hoặc lấy dịch chiết bằng cách: Thái lát mỏng cho vào chén sứ, thêm ít nước, đậy nắp, đun cách thủy đến khi chiết hết mùi vị.

Kiêng kỵ: Không được dùng phối hợp với Lê lô, Ngũ linh chi.

2. Nhung hươu

Tên khoa học: *Cornu Cervi Pantotrichum*

Bộ phận dùng: Sừng non có lông nhung và chưa bị xương hóa của Hươu



sao đực (*Cervus nippon* Temminck), họ Hươu (*Cervidae*)

Tính vị, quy kinh: cam, hàn, ôn. Vào các kinh thận, can..

Tác dụng: Bổ thận dương. Ích tinh huyết, mạnh gân cốt, trừ nhọt độc. Chủ trị: Liệt dương, hoạt tính, tử cung lạnh, khó thụ thai, tinh thần mệt mỏi, sợ lạnh, chóng mặt, tai ù, tai điếc (cơ năng), trẻ chậm liền thóp, lưng gối đau lạnh, gân xương mềm yếu, rong huyết, nhọt lâu ngày không liền miệng.

Liều lượng: Ngày dùng từ 1g đến 2g, tán bột hòa vào nước thuốc uống. Đầu tiên uống liều nhỏ rồi sau đó tăng dần, không nên uống ngay liều lớn.

Kiêng kỵ : Không được dùng phối hợp với Lê lô, Ngũ linh chi.

3. Hoài sơn

Tên khoa học: Tuber *Dioscoreae persimilis*

Bộ phận dùng: Rễ củ đã chế biến, phơi hay sấy khô của cây Củ mài, còn gọi là Hoài sơn (*Dioscorea persimilis* Prain et Burkill), họ Củ nâu (*Dioscoreaceae*).



Tính vị, quy kinh: Cam, bình. Vào các kinh tỳ vị, phế, thận...

Tác dụng: Bổ tỳ, dưỡng vị, chỉ tả, sinh tân, ích phế, bổ thận, sáp tinh. Chủ trị: Kém ăn, tiêu chảy lâu ngày, phế hư, ho suyễn, di tinh, đới hạ, tiêu khát.

Liều lượng: Ngày dùng 12g đến 30g, dạng thuốc sắc hay thuốc bột.

Kiêng kỵ : Có thực tà thấp nhiệt thì không dùng.

4. Hà thủ ô đỏ

Tên khoa học: Radix *Fallopiae multiflorae*

Bộ phận dùng: Rễ củ phơi hay sấy khô của cây Hà thủ ô đỏ [*Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson Syn. *Polygonum multiflorum*



(Thunb.)j, họ Rau răm (Polygonaceae).

Tính vị, quy kinh: Khổ, cam, sáp, ôn. Vào các kinh can, thận.

Tác dụng: Dưỡng huyết, bổ can thận, nhuận tràng thông tiện, làm xanh tóc.

Chủ trị: Huyết hư thiếu máu, da xanh, gầy, đau lưng, di tinh, tóc bạc sớm, táo bón.

Liều lượng: Ngày dùng từ 6 g đến 12 g Hà thủ ô đỏ đã chế, dạng thuốc sắc hoặc rượu thuốc.

5. Ba kích

Tên khoa học: Radix Morindae officinalis

Bộ phận dùng: Rễ đã phơi hay sấy khô của cây Ba kích (*Morinda officinalis* How), họ Cà phê (Rubiaceae).

Tính vị, quy kinh: Cam, tân, vi ôn. Vào kinh thận.

Tác dụng: bổ thận dương, mạnh gân xương. Chủ trị: Liệt dương, di tinh, tử cung lạnh, phụ nữ khó mang thai, kinh không đều, bụng dưới đau lạnh, phong thấp tê đau, gân xương mềm yếu.

Liều lượng: Ngày dùng từ 3g đến 9g. Dạng sắc uống. Thường phối hợp với một số vị thuốc khác.

Kiêng kỵ : Âm hư hoả vượng, táo bón

6. Sâm cau đen

Tên khoa học: Rhizoma Curculiginis

Bộ phận dùng: Thân rễ đã phơi hay sấy khô của cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.), họ Thủy tiên (Amaryllidaceae).

Tính vị, quy kinh: Tân, ôn, hơi độc. Quy kinh can thận.



Tác dụng: Bổ thận tráng dương, cường gân cốt, khử hàn trừ thấp. Chủ trị: Liệt dương, di tinh đau nhức cơ khớp do hàn, chân tay yếu mềm, ỉa chảy sợ lạnh.

Liều lượng: Ngày dùng từ 3 g đến 9 g. Thường phối hợp với các thuốc khác.