BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM

NGUYỄN NGỌC DIỆU

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ĐIỀU BIẾN MIỄN DỊCH CỦA BỘT EFCOVIDA TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM

NGUYỄN NGỌC DIỆU

ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ĐIỀU BIẾN MIỄN DỊCH CỦA BỘT EFCOVIDA TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

Chuyên ngành : Y học cổ truyền
Mã số : 8720115
Người hướng dẫn khoa học: TS. Đỗ Linh Quyên

HÀ NỘI, NĂM 2022

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn Chi bộ, cơ quan Hội Đông y thị xã Trảng Bàng tỉnh Tây Ninh đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành khóa học.

Để hoàn thành luận văn này, với tất cả lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn tới 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, cùng toàn thể thầy cô giảng viên Học viện Y – Dược học cổ truyền Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới TS. Đỗ Linh Quyên là 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 PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh cùng 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.

Tôi xin chân thành cảm ơn quý thầy cô trong Hội đồng chấm đề cương, Hội đồng chấm luận văn và các nhà khoa học, đồng nghiệp đã đóng góp những ý kiến, kinh nghiệm quý báu để luận văn này hoàn thiện hơn.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới gia đình và những người thân yêu đã dành cho tôi những điều kiện tốt nhất, giúp tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả luận văn

Nguyễn Ngọc Diệu

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Ngọc Diệu, học viên cao học khóa 13 tại 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. Đỗ Linh Quyên.

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 2022

Tác giả

Nguyễn Ngọc Diệu

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 3
1.1.3. Các cơ quan tham gia đáp ứng miễn dịch 6
1.1.4. Suy giảm miễn dịch 8
1.1.5. Ứng dụng gây miễn dịch để phòng ngừa nhiễm trùng 9
1.2. Tổng quan suy giảm miễn dịch theo Y học cổ truyền 9
1.2.1. Khái niệm 9
1.2.2. Cơ chế bệnh sinh 10
1.2.3. Biện chứng luận trị 11
1.2.4. Các thể lâm sàng và điều trị 12
1.3. Những nghiên cứu trong nước và trên thế giới về tăng cường miễn dịch và suy giảm miễn dịch 15
1.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới 15
1.3.2. Tình hình các nghiên cứu trong nước 16
1.4. Một số mô hình gây suy giảm miễn dịch trên thực nghiệm đã sử dụng 18
1.4.1. Gây suy giảm miễn dịch bằng thuốc ức chế miễn dịch 18
1.4.2. Gây suy giảm miễn dịch bằng chiếu tia xạ toàn thân 18
1.5. Tổng quan về thuốc nghiên cứu "bột EFCOVIDA" 19
1.5.1. Bột EFCOVIDA 19
1.5.2. Phân tích thành phần bột EFCOVIDA 20
CHƯƠNG 2. CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 34
2.1. Chất liệu nghiên cứu 34
2.1.1.Chế phẩm nghiên cứu 34
2.1.2. Hóa chất nghiên cứu 34

2.1.3. Máy móc nghiên cứu 35
2.2. Đối tượng nghiên cứu 35
2.3. Phương pháp nghiên cứu 35
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu 36
2.3.2. Đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA trên các đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu 37
2.3.3. Đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA trên các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu 37
2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu 39
2.5. Sơ đồ nghiên cứu 40
2.6. Xử lý và phân tích số liệu 40
2.7. Sai số và khống chế sai số 40
2.8. Vấn đề đạo đức của nghiên cứu 40
CHƯƠNG 3. DỰ KIẾN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 41
3.1. Kết quả về tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch không đặc hiệu 41
3.1.1. Kết quả đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA lên sự thay đổi trọng lượng lách, tuyến ức. 41
3.1.2. Kết quả đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA lên sự thay đổi số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi 45
3.1.3. Kết quả đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA lên sự thay đổi công thức bạch cầu trong máu ngoại vi 46
3.2. Kết quả về tác dụng của bột EFCOVIDA trên các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu 48
3.2.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA lên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu qua tế bào T 48
3.2.2. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA lên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu qua tế bào B 54
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN 55

4.1. Bàn luận về đối tượng nghiên cứu và mô hình gây tổn thương hệ miễn dịch.....53
4.1.1. Bàn luận về đối tượng nghiên cứu…….....53
4.1.2. Mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid.....53
4.1.3. Lựa chọn chứng dương 55
4.2. Bàn luận về tác dụng của bột EFCOVIDA trên các đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu 56
4.2.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên trọng lượng lách tương đối và tuyến ức tương đối.....56
4.2.2. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên số lượng bạch cầu chung và số lượng các loại bạch cầu trong máu ngoại vi.....58
4.3. Bàn luận về tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu 60
4.2.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào T 60
4.2.2. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào B 63
4.4. Lý giải tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch theo y học cổ truyền 65
KẾT LUẬN..... 72
KIẾN NGHỊ 74
TÀI LIỆU THAM KHẢO
PHỤ LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng việt	Tiếng Anh
BC	Bạch cầu	
CCR-5		C-C Chemokin receptor 5
CXC-4		C-X-C receptor 4
CY		Cyclophosphamid
ĐVTN	Động vật thực nghiệm	
ĐTB	Đại thực bào	
CSF	Yếu tố kích thích tạo cụm	Colony stimulating factor
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	
MDĐH	Miễn dịch đặc hiệu	
MDKĐH	Miễn dịch không đặc hiệu	
NK	Tế bào diệt tự nhiên	Natural kill cell
OA	Ovalbumin, albumin lòng trắng trứng gà với $Al(OH)_3$	
TGF-β	Yếu tố tăng trưởng gây biến chuyển β	Transforming growth factor ß
Tc	Tế bào T độc	Cytotoxic T cell
Th	Tế bào T hỗ trợ	Helper T cell
TLLTĐ	Trọng lượng lách tương đối	
TLTƯTĐ	Trọng lượng tuyến ức tương đối	
TNF	Yếu tố hoại tử khối u	Tumor necrosis factor

YHCT	Y học cổ truyền	
YHHĐ	Y học hiện đại	
WHO	Tổ chức Y tế thế giới	World Health Organization

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần bột EFCOVIDA 34
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên trọng lượng lách tương đối 42
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên trọng lượng tuyến ức tương đối 43
Bảng 3.3. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức 44
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên công thức bạch cầu trong máu ngoại vi 46
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA đến phản ứng bì với kháng nguyên OA 47
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA lên IL-6 trong máu ngoại vi 49
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA lên nồng độ TNF-α trong máu ngoại vi 50
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA lên nồng độ INF-γ trong máu ngoại vi 51
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA lên nồng độ IgG trong máu ngoại vi 52

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên tsố lượng bạch cầu trong máu ngoại vi 45
Biểu đồ 3.2.Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA lên IL-4 trong máu ngoại vi 48

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Endo Fullerene 20
Hình 1.2. Nano Curcumine 22
Hình 1.3. Cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*) 25
Hình 1.4. Quế (*Ramulus Cinnanomi*) 27
Hình 1.5. Nấm đông trùng (*Cordyceps militaris*) 29
Hình 1.6. Gừng (*Zingiber officinale*) 32
Sơ đồ 2.1. Nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng Cyclophosphamid 39

ĐẶT VẤN ĐỀ

Miễn dịch là lĩnh vực được ứng dụng nhiều trong y học và ngày càng phát triển, đặc biệt 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. Suy giảm miễn dịch xảy ra khi phản ứng miễn dịch của cơ thể giảm hoặc mất. Suy giảm miễn dịch gặp trong nhiều bệnh cảnh với nhiều nguyên nhân khác nhau như nhiễm virus (HIV/AIDS, HBV,...), bệnh ung thư, bệnh mạn tính, chấn thương, hay trong các bệnh nhiễm khuẩn nặng. Bảo vệ và nâng cao hệ miễn dịch của cơ thể rất quan trọng trong điều trị các bệnh lý trên. Các chất kích thích miễn dịch (KTMD) có nguồn gốc rất đa dạng [2]. Chất kích thích miễn dịch có nguồn gốc sinh học 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, còn ảnh hưởng tới chức phận tạo máu, một số trường hợp còn gặp tai biến trên lâm sàng [4],[5].

Ngày nay, việc áp dụng Y học cổ truyền (YHCT) là một xu hướng mới đầy triển vọng trong hỗ trợ điều trị suy giảm miễn dịch. Đã có nhiều công trình nghiên cứu về các loại thảo dược có tác dụng điều trị suy giảm miễn dịch như rễ cây Nhàu, vỏ Đậu xanh, Nghệ, Sâu chít, bài thuốc "Đại thiên nương", viên nang "Hồi xuân hoàn", viên nang "Linh lộc sơn", [6],[7]... Chế phẩm bột EFCOVIDA được sản xuất tại công ty trách nhiệm hữu hạn công nghệ cao Trịnh Năng với một số thành phần có tác dụng tăng cường hệ miễn dịch. Để

làm sáng tỏ tác dụng trong cải thiện chức năng miễn dịch của bột EFCOVIDA cần phải tiến hành thêm nhiều nghiên cứu. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: **"Đánh giá tác dụng điều biến miễn dịch của bột EFCOVIDA trên động vật thực nghiệm"**. Mục tiêu của đề tài:

1. *Đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch không đặc hiệu.*
2. *Đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA 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].

1.1.2. Phân loại

Hệ thống miễn dịch có thể chia làm hệ thống miễn dịch không đặc hiệu (MDKĐH) và hệ thống miễn dịch đặc hiệu (MDĐH). Thuật ngữ miễn dịch không đặc hiệu còn có các tên gọi khác như miễn dịch tự nhiên, miễn dịch bẩm sinh. Thuật ngữ miễn dịch đặc hiệu cũng có các tên gọi khác như miễn dịch thu được, miễn dịch thích nghi [1].

1.1.2.1. Hệ thống miễn dịch không đặc hiệu

Hệ thống miễn dịch không đặc hiệu là hàng rào bảo vệ đầu tiên của cơ thể chống lại sự xâm nhập của vi sinh vật và các yếu tố lạ khác. Chúng bao gồm các thành phần không chuyên biệt (còn một số chức năng khác) và chuyên biệt thực hiện chức năng miễn dịch [1],[8].

- Các cơ chế không chuyên biệt tham gia vào đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu

+ Cơ chế cơ học

Sự nguyên vẹn của da niêm mạc là hàng rào bảo vệ, ngăn chặn sự xâm nhập của vi sinh vật. Mọi sự tổn thương như trong bỏng, rách ra hoặc các thủ thuật tiêm truyền đều làm tăng nguy cơ nhiễm trùng. Ngoài ra còn có các hoạt động cơ học của lớp tiêm mao nhầy của hệ hệ thống đường hô hấp trên nhằm loại bỏ và tống khứ các vi khuẩn, chất thải ra ngoài. Các phản xạ ho, hắt hơi cũng cho kết quả như vậy. Sự lưu thông và nhu động của đường tiêu hóa, đường tiết niệu, đường mật ngăn cản sự phát triển của vi khuẩn [1],[8].

+ Cơ chế hóa học

Trong các dịch tiết tự nhiên có chứa các hóa chất chất có tác dụng diệt khuẩn không chuyên biệt. Ví dụ như axit béo trong tuyến bã, độ pH thấp của dịch âm đạo hạn chế sự tăng trưởng của vi khuẩn. Độ toan cao trong Dịch vị thì có khả năng loại bỏ hầu hết các vi khuẩn [1],[8].

+ Cơ chế sinh học

Trên bề mặt da, đường tiêu hóa thường xuyên có mặt các vi khuẩn cộng sinh sinh không gây bệnh. Các vi khuẩn này ngăn cản sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh bằng cách cạnh tranh chất dinh dưỡng, tiết ra các chất kìm khuẩn như colixin đối với vi khuẩn đường ruột [1],[8].

- Các cơ chế chuyên biệt tham gia vào đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu

+ Các thành phần dịch thể: Lysozym, các protein viêm, Interferon (IFN), bổ thể

+ Các thành phần tế bào: Các bạch cầu hạt, các bạch cầu đơn, tế bào NK [1],[8].

1.1.2.2. Hệ thống 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 [1],[4],[8].

* 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 monormer 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 monormer 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 [1],[4],[8].

+ 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: TCDH, Tc, Ts, Th và các cytokin do chúng tiết ra.

+ Chức năng chính của Tế bào Th:

Tế bào lympho TCD4 gây viêm (Th1) có khả năng nhận diện phức hợp KN – MHC 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 (Th2) có khả năng nhận diện phức hợp KN – MHC 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 (Tc). Từ đó tế bào Tc mới có khả năng ly giải tế bào đích.

+ Chức năng chính của tế bào Tc:

Bằng cách ly giải tế bào đích, tế bào Tc có khả năng giết chế 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 kìm 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, IFNγ, TNFα…

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, Bổ 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 [1],[4],[8].

1.1.3. Các cơ quan tham gia đáp ứng miễn dịch

1.1.3.1. 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],[4],[9].

- Tuỷ 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],[4],[9].

1.1.3.2. 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],[4],[9].

- 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 ngầm 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 lách cơ thể rất dễ bị nhiễm trùng với các vi khẩn 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 lách chức năng này không thực hiện được [1],[4],[9].

- 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 trong ngăn cản sự xâm nhập của các vi sinh vật [1],[4],[9].

1.1.4. 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],[4],[9].

1.1.4.1. Suy giảm miễn dịch nguyên phát

- Giảm gammaglobulin liên kết giới tính X (X-linked agamma globulinemia)

- SGMD thông thường (common variable immunodeficiency)

- SGMD nặng phức tạp (severe combined immunodeficicency) 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)

1.1.4.2. 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],[4],[9].

1.1.5. Ứng dụng gây miễn dịch để phòng ngừa nhiễm trùng

1.1.5.1. Miễn dịch chủ động

Miễn dịch chủ động đặt căn bản trên cơ chế miễn dịch tương ứng với sự đề kháng với tác nhân vi sinh vật, có thể thực hiện được mà không có nguy cơ nhiễm trùng cho vật chủ. Mức độ đáp ứng có được phụ thuộc vào miễn dịch tự nhiên đối với bệnh [1],[8],[10].

1.1.5.2. Miễn dịch thụ động

Miễn dịch thụ động là do sử dụng kháng thể đặc hiệu. Thực tế thường dùng để điều trị các bệnh gây ra bởi độc tố như uốn ván, kháng thể chống nọc độc của rắn. Miễn dịch thụ động thường ngắn do kháng thể bị giáng hóa trong khi đáp ứng miễn dịch chủ động không được tạo ra, không có trí nhớ miễn dịch, nên vật chủ không được bảo vệ trong lần nhiễm sau. Miễn dịch thụ động xảy ra ở thời kỳ sơ sinh do kháng thể thuộc lớp IgG của mẹ truyền qua nhau thai đủ cung cấp tạm thời khả năng bảo vệ đối với nhiễm trùng trong thời kỳ đầu sau sinh. Một khi kháng thể của mẹ giáng hóa thì đứa trẻ sẽ nhạy cảm nhiễm trùng trừ khi nó phát triển được đáp ứng miễn dịch chủ động [1],[8],[10].

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

1.2.1. Khái niệm

Y học cổ truyền không có khái niệm và bệnh danh cụ thể về miễn dịch và suy giảm miễn dịch. Nhưng những biểu hiện bệnh thì tương đồng với chứng "hư lao" trong Y học cổ truyền. Người bị hư lao vì yếu sức, dễ bị cảm ngoại tà, dẫn đến tổn thương nguyên khí, điều trị vừa phù chính, vừa trừ tà [11],[12],[13].

Hư lao cũng gọi là hư tổn, do nhiều nguyên nhân gây ra, biểu hiện với những chứng suy nhược mà bệnh cơ chủ yếu là tạng phủ suy tổn, khí huyết âm dương không đủ. Tinh, khí, huyết, tân dịch hao tổn mà làm giảm sức chống đỡ với bệnh tật hay suy giảm sức đề kháng của cơ thể, cơ thể dễ bị tà khí xâm nhập mà phát sinh bệnh [11].

Chính khí của cơ thể suy nhược khả năng phòng ngự của cơ thể kém, ngoại tà thừa hư xâm nhập vào cơ thể mà gây bệnh. Do chính khí hư hao khả năng kháng bệnh và khả năng phục hồi sức khỏe đều giảm, nếu không kịp thời bổ sung chỗ hư, ngăn ngừa tác dụng gây bệnh của tà khí, không đủ sức trục đuổi tà khí ra ngoài thì tổn thương bệnh lý mà cơ thể mắc phải ngày càng nặng, bệnh tình ngày càng biến đổi nghiêm trọng chuyển thành bệnh mạn tính kéo dài không khỏi hoặc để lại di chứng ở nhiều mức độ khác nhau, nặng nữa có thể dẫn đến tử vong [14].

Sách "Kim quỹ yếu lược" đã nêu ra "Bệnh hư lao và cách điều trị chú trọng vào ôn bổ, nhưng còn áp dụng cách điều trị là phù chính trừ tà, khứ ứ sinh tân".

Hải Thượng Lãn Ông Lê Hữu Trác cũng bàn về chứng "hư lao" trong bộ "Hải Thượng y tông tâm lĩnh": lao là do sự mệt nhọc mà sinh bệnh, bệnh lao gốc ở tinh hao huyết kém mà cả đến hình thể và hình khí cũng bị thương tổn, âm đã hư thì hỏa động, thủy kém thì hỏa bùng lên. Tuy chứng trạng thể hiện bên ngoài rất nhiều nhưng tóm lại cũng không ngoài hai chữ "tinh" và "huyết". Thận là bể chứa tinh huyết, người ta sống phải lấy thận làm căn bản, nay căn bản đã bị bệnh thời phép chữa không phải dùng hàng loạt thuốc chữa khí huyết như tứ quân, tứ vật, bát trân, thập toàn...mà cần tìm đến căn bản của khí huyết là chân dương, chân hỏa (khí), chân âm, chân thủy (huyết) [15].

1.2.2. Cơ chế bệnh sinh

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 [14],[15].

- 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 [14],[15].

1.2.3. Biện chứng luận trị

Những nguyên nhân trên hoặc vì hư thành bệnh, vì bệnh thành lao, hoặc vì bệnh thành hư, hư lâu không hồi phục thành lao. Triệu chứng bệnh lý chủ yếu là sự hư lao của khí huyết âm dương, bộ vị bị suy tổn chủ yếu nằm ở tạng, quá trình bệnh biến thường trước tiên gây ra sự suy tổn của khí huyết âm dương ở tạng nào đó, nhưng vì năm tạng đều liên quan về chức năng, khí huyết cùng nguồn, âm dương chung gốc, nên các nguyên nhân gây ra hư tổn thường ảnh hưởng lẫn nhau, một tạng bị bệnh thường liên quan đến tạng khác, khí hư không

sinh được huyết, huyết hư không lấy gì để sinh huyết, khí hư dương suy dần, huyết hư âm cũng không đủ. Dương tổn lâu ngày liên quan đến âm, âm hư lâu ngày lụy cập đến dương, làm thế bệnh ngày càng phát triển, bệnh tình trở nên phức tạp.

Nguyên tắc cơ bản trong điều trị hư lao là bổ ích, sách Nội Kinh nói: "Hư thì bổ, hình không đủ thì lấy khí mà ôn, tinh không đủ thì lấy vị mà bổ". Khi dùng thuốc bổ ích căn cứ vào thuộc tính khác nhau mà dùng các phương thuốc ích khí, dưỡng huyết, tư âm, ôn dưỡng để điều trị [16].

Cần kết hợp chặt chẽ bệnh ở ngũ tạng khác nhau mà lựa chọn phương thuốc điều trị đúng bệnh. Vì tỳ là nguồn gốc của hậu thiên, nguồn sinh hóa của đồ ăn thức uống, khí huyết; thận là gốc của tiên thiên tàng giữ khí nguyên âm, nguyên dương, là gốc của tính mệnh, vì vậy bổ tỳ thận có ý nghĩa quan trọng trong điều trị bệnh [16].

1.2.4. Các thể lâm sàng và điều trị

1.2.4.1. 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 hư 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 nhạt, lưỡi nhạt, mạch nhược: dấu hiệu hư nhược

- Pháp điều trị : Ích khí cố biểu.

- Phương thuốc: Bổ phế thang (Hòa tễ cục phương). [14],[15].

b. Tỳ khí hư:

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

- Pháp điều trị: Ích khí kiện tỳ.

- Phương thuốc: Sâm linh bạch truật tán (Hòa tễ cục phương[14],[15]

1.2.4.2. 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

- Pháp điều trị: Dưỡng tâm, an thần.

- Phương thuốc: Quy tỳ thang (Tế sinh phương) [14],[15]

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) [14],[15]

1.2.4.3. 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

- Pháp điều trị : Ôn trung, kiện tỳ.

- Phương thuốc: Phụ tử lý trung thang (Hòa tễ cục phương) [14],[15]

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 gấp khó cầm, sắc mặt tái nhợt, giọng nói yếu, có thể hơi ngắn, hụt hơi, thân lưỡi bệu, sắc nhợt, rêu trắng, mạch trầm trì.

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

- Phương thuốc: Hữu quy hoàn (Cảnh Nhạc toàn thư) [14],[15]

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 biện chứng độc lập. [14]

1.2.4.4. 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 má hồng, lưỡi đỏ, khô, ít rêu, mạch tế sác

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

- Phương thuốc: Sa sâm mạch đông thang (Ôn bệnh điều biện). [14],[15]

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 rêu, mạch tế sác.

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

-Phương thuốc: Thiên vương bổ tâm đan (Thế Đắc hiệu phương) [14],[15]

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

- Pháp điều trị : Tư dưỡng tỳ vị.

- Phương thuốc: Ích vị thang (Ôn bệnh điều biện) [14],[15]

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 đỏ tía, mạch huyền tế sác.

- Pháp điều trị : Tư âm, tiềm dương.

- Phương thuốc: Bổ can thang (Thẩm Thị Dao Hàm - Phó Nhân Vu) [14],[15]

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 bổ âm hoàn (Đan Khê tâm pháp) [14],[15]

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

1.3.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Hứa Kế Bình (1988) 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 ung thư phổi, theo dõi trong 5 năm thấy thuốc có tác dụng cải thiện miễn dịch, giảm nhẹ triệu chứng và kéo dài thời gian sống [17].

Phan Mẫn Cầu (1990) 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, tằm sa, bạch hoa xà thiệt thảo) điều trị 40 bệnh nhân ung thư phổi 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 [18].

Rao X.Q (1991) 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, số lượng các tế bào Th, 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 [19].

Tảo Spirullina (1993) theo Tổ chức y tế thế giới (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 tiết niệu ở người bị nhiễm xạ rất cao [20].

Yao – Haur Kouli – Ming Yang Kuo (1997) 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, chống sao chép HIV trong tế bào lympho [21].

Toh, Ding – Fung (2011) 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 [22].

Matsushita và cộng sự (2019) 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: II-2, II-4, IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1, TNF-α, IFN-α và TGF-β. 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 tế bào trợ giúp 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 [23].

1.3.2. Tình hình các nghiên cứu trong nước

Nghiên cứu trên cây nhàu, Phạm Huy Quyến (1996) đã chứng minh tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ nhàu toàn phần trên chuột nhắt trắng và trên invitro [24].

Nguyễn Gia Chấn (1998) và cộng sự đã 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 [25].

Đỗ Quốc Việt (2000) 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 [26].

Phan Anh Tuấn (2006), " Đánh giá tác dụng phục hồi thương tổn hệ miễn dịch sau chiếu xạ của "đông trùng hạ thảo - sâu chít (brihaspa atrostigmella moore 1868)" giai đoạn thực nghiệm", [27]

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 cá sấu hoa cà liều 3,77g/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 1,89g/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 cá sấu hoa cà thể hiện tác dụng tăng cường miễn dịch trong suy giảm miễn dịch do cyclophosphamid gây ra. Tuy nhiên, cao xương cá sấu hoa cà chưa cho thấy hiệu quả điển hình trong thử nghiệm gây suy giảm miễn dịch trung gian tế bào (đáp ứng quá mẫn muộn) [28].

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 cyclophosphomide (CY), Nam địa long liều uống 1,2g/kg và 2,4g/kg giúp hạn chế tình trạng giảm khối lượng cơ thể chuột, tăng khối lượng tương đối của lách, tuyến 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 có thể hiện tác dụng kích thích miễn dịch, có tiềm năng phát triển thành sản phẩm hỗ trợ trong hóa trị ung thư [29].

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 [30].

1.4. Một số mô hình gây suy giảm miễn dịch trên thực nghiệm đã sử dụng

1.4.1. Gây suy giảm miễn dịch bằng thuốc ức chế miễn dịch

Có thể dùng các thuốc ức chế miễn dịch mạnh như Cyclophosphamide, Cyclosporin-A, Tacrolimus, Corticoid, Azathioprine.., tuy nhiên Cyclophosphamide hay được dùng hơn cả.

Người ta thường tiêm phúc mạc chuột nhắt trắng bằng Cyclophosphamide đơn liều 150-200 mg/kg thể trọng hoặc tiêm liên tục trong 7 ngày liều 50mg/kg thể trọng, hoặc tiêm liên tục 14 ngày liều 25mg/kg thể trọng. Với cách dùng Cyclophosphamide như trên, chuột bị tổn thương rõ rệt với các biểu hiện ức chế sinh tủy, giảm mật độ tế bào tủy và giảm số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi. Với liều dùng này, Cyclophosphamide cùng gây stress oxy hóa, giảm mức glutathione tế bào và giảm các enzym chống oxy hóa như glutathione reductase (GPx). Mô hình này đơn giản, chi phí thấp, dễ triển khai, gây suy giảm miễn dịch dịch thể nhiều hơn dịch tế bào, đặc biệt thuốc làm ức chế khả năng tiết kháng thể đặc hiệu của các tế bào lympho B mẫn cảm [31],[32].

1.4.2. Gây suy giảm miễn dịch bằng chiếu tia xạ toàn thân

Phóng xạ trong y học để gây suy giảm miễn dịch gồm nhiều loại tia như α, β, γ và tia X. Trong các tia xạ trên tia X và tia γ hay được dùng để gây suy giảm miễn dịch[33],[34].

Chiếu xạ gây tổn thương nặng nề các tế bào non đang phân chia, đặc biệt là các tế bào miễn dịch, vì vậy gây ra tình trạng suy giảm miễn dịch. Trong các nghiên cứu đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của thuốc người ta hay dùng mô hình chiếu xạ toàn thân với chuột nhắt (đơn liều hoặc nhắc lại với tổng liều

6 -7 Gray – Gy). Với liều chiếu xạ này, hiệu quả gây suy giảm miễn dịch rất rõ rệt với các biểu hiện chuột gầy sút, xơ lông và chết dần (khoảng 70% chuột chết sau 30 ngày). Hệ thống tạo huyết của chuột chiếu xạ bị tổn thương nghiêm trọng với các biểu hiện thiếu máu, giảm bạch cầu, giảm số lượng tế bào tủy xương, các cơ quan lympho như lách, hạch, tuyến ức cũng teo nhỏ. Do các tế bào đang phân chia rất nhạy cảm với tia xạ nên các tế bào lympho (cả T và B) dễ bị tổn thương bởi chiếu xạ. Vì vậy mô hình này có thể gây suy yếu cả miễn dịch tế bào và miễn dịch thể dịch (gây suy giảm miễn dịch không chọn lọc) [16], [32].

1.5. Tổng quan về chế phẩm nghiên cứu "bột EFCOVIDA"

1.5.1. Bột EFCOVIDA

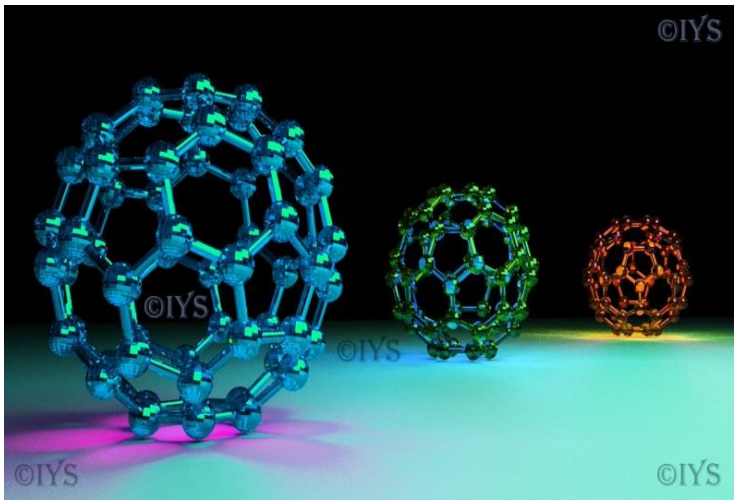
Bột EFCOVIDA, được sản xuất bởi công ty trách nhiệm hữu hạn công nghệ cao Trịnh Năng. Thuốc thử đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Thành phần của bột EFCOVIDA: 15 mg Endo Fullerene, 15 mg Nano Curcumine, 15 mg tinh chất Cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*), 15 mg tinh chất Quế (*Ramulus Cinnanomi*), 15 mg tinh chất Nấm đông trùng (*Cordyceps militaris*), 10 mg tinh chất Gừng (*Zingiber officinale*), tá dược vừa đủ.

Liều dùng dự kiến trên lâm sàng dùng trên người trưởng thành là 250 mg/24h

1.5.2. Phân tích thành phần EFCOVIDA

1.5.2.1. Endo Fullerene



Hình 1.1. ***Endo Fullerene***

* Nguồn gốc:

Năm 1985 Harold Kroto thuộc Đại học Sussex, làm việc với James R. Heath, Sean O'Brien, Robert Curl và Richard Smalley từ Đại học Rice, đã phát hiện ra fullerenes trong tàn dư than chì (Graphite) được tạo ra bằng cách bốc hơi carbon trong bầu khí quyển helium. Kroto và nhóm Rice đã phát hiện ra các fullerene khác ngoài C60, và danh sách này đã được mở rộng hơn nhiều trong những năm tiếp theo. Các ống nano carbon lần đầu tiên được phát hiện và tổng hợp vào năm 1991. Họ fullerene, và đặc biệt là C60, có các đặc tính quang, điện hóa và vật lý rất hấp dẫn, có thể được khai thác trong nhiều lĩnh vực sinh học khác nhau [36].

Vào tháng 4 năm 2003, fullerene đã được nghiên cứu để sử dụng thuốc tiềm năng: liên kết kháng sinh đặc hiệu với cấu trúc để nhắm mục tiêu vi khuẩn kháng thuốc và thậm chí nhắm mục tiêu một số tế bào ung thư như khối u ác tính [36].

Fullerene có thể nằm gọn trong khoang kỵ nước của các protease HIV, ức chế sự tiếp cận của các chất nền đến vị trí xúc tác của enzyme. Nó có thể được sử dụng như một công cụ nhặt rác triệt để; Đồng thời, nếu tiếp xúc với ánh

sáng, fullerene có thể tạo ra oxy đơn với sản lượng lượng tử cao. Hành động này, cùng với sự chuyển điện tử trực tiếp từ trạng thái kích thích của fullerene và các cơ sở DNA, có thể được sử dụng để phân cắt DNA. Trong bài đánh giá này, chúng tôi báo cáo các khía cạnh gần đây nhất của các ứng dụng sinh học fullerene [35].

* Thành phần hóa học và tác dụng dược lý

- Chất chống oxy hóa

Fullerenes là nhà sản xuất tuyệt vời của chất chống oxy hóa, loại đặc tính này là những gì có thể được quy cho một số liên kết đôi liên hợp mà chúng có và cũng cho một loại ái lực điện tử rất cao của các phân tử nói trên, điều này là do năng lượng của quỹ đạo phân tử mà thấp và không có người sử dụng. Fullerenes có thể phản ứng với các gốc chuỗi rất lâu trước khi chúng được tiêu thụ [36].

- Tác nhân chống vi rút

Fullerenes luôn thu hút sự chú ý vì sức mạnh của chúng là chất kháng vi rút tuyệt vời. Về mặt này, có lẽ sự xuất hiện của nó thú vị hơn nhiều, có thể là do khả năng loại bỏ sự sao chép của Vi rút suy giảm miễn dịch ở người, thường được gọi là "HIV", và vì vậy, nó giúp trì hoãn sự hiện diện của Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải bởi từ viết tắt của nó "AIDS" [36].

Người ta đã quan sát thấy rằng dendrofellerene 1 và dẫn xuất 2 của nó, là đồng phân trans, là những chất ức chế lớp protease của vi rút HIV và do đó, ngăn chặn sự nhân lên của chính HIV 1 [36].

- Phân phối thuốc và phân phối gen

Việc quản lý các loại thuốc trở thành quá trình vận chuyển một loại hợp chất dược phẩm đến vị trí tác dụng, trong khi việc quản lý các gen bao gồm việc đưa DNA ngoại lai vào bên trong tế bào để có thể tạo ra loại dược chất có tác dụng mong muốn [36].

Do đó, điều quan trọng là cung cấp các phân tử này với độ an toàn và hiệu quả cao nhất. Fullerenes là một lớp chất mang vô cơ, những lớp phân tử này thường được ưa chuộng vì chúng đã cho thấy khả năng tương thích tuyệt vời, bao gồm tính chọn lọc cao hơn, chúng giữ lại những gì là hoạt tính sinh học, và chúng càng nhỏ càng tốt để kéo dài [36].

- Chất làm nhạy cảm quang trong liệu pháp quang động

Liệu pháp quang động được biết đến với tên viết tắt "PDT" bao gồm hình thức trị liệu sử dụng một loại hợp chất nhạy cảm với ánh sáng và không độc hại, khi đặt dưới ánh sáng, nó sẽ trở nên độc hại. Nó được sử dụng để điều trị các tế bào ác tính hoặc bị thay đổi. Fullerene thường được sử dụng cho các lớp hợp chất này [36].

1.5.2.2. Nano Curcumine

Hình 1.2. *Nano Curcumine*

* Nguồn gốc *Curcumine*: dạng bào chế của tinh chất Curcuminoid từ Nghệ theo công nghệ Nano hiện đại. Trong đó, các phân tử Curcumin được cố định trong polymer, tạo thành các hạt Nano Curcumin siêu nhỏ với kích thước chỉ khoảng 30 – 100nm giúp phân phối, hoà tan, hấp thụ trong cơ thể tốt hơn và làm tăng khả năng sinh khả dụng của hoạt chất Curcuminoid của Nghệ [37].

* Một số đặc tính hóa lý của *Nano Curcumine*

Kích thước: từ 10 – 200 nm giúp *nanocurcumin* xâm nhập tốt, tập trung nhiều quanh nhân và ức chế sự phát triển của cả 3 dòng tế bào dòng tế bào ung

thư vú (MCF7), phổi (H1299) và đại trực tràng (HCT116) ngay tại nồng độ thấp [38],[39].

Diện tích bề mặt: tương đối lớn, làm tăng tốc độ hấp thu và khả năng hòa tan trong nước, tăng sinh khả dụng của *curcumin*. Vì vậy, ứng dụng trong y học và lâm sàng với tác dụng chống viêm, ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn,..

Điện tích bề mặt: Điện tích dương có thể đi sâu vào màng tế bào và tỷ lệ hấp thụ cao so với các hạt mang điện tích âm, đồng thời kháng vi khuẩn Listeria monocytogenes tốt hơn. Các hạt mang điện tích âm làm giảm tốc độ hấp phụ của protein huyết thanh, dẫn đến thời gian bán thải dài hơn so với các hạt mang điện tích dương [40].

* Tác dụng dược lý của *Nano Curcumine*

- Tác dụng chống viêm: Tác dụng chống viêm do nhóm 4-hydroxyphenyl do sự tích hợp của các nhóm acyl hóa và alkyl hóa hoặc methoxy trên vòng phenyl của Curcumin.

Cơ chế chống viêm như sau:

+ Ức chế chuyển hóa acid arachidonic, cyclooxygenase, lipoxygenase, cytokine (Interleukin và yếu tố hoại tử khối u TNF α), yếu tố hạt nhân NF- kappa B và giải phóng hormone steroid [39]. Hiệu quả với viêm khớp dạng thấp, vẩy nến,... [41].

+ Ổn định màng lysosome và liên kết quá trình phosphoryl hóa; oxy hóa, chống oxy mạnh [39].

+ Ức chế NF-Kb và hàng loạt protein khác (protein kháng apoptosis - quá trình tự chết theo chương trình của các tế bào) dẫn đến tiêu hủy tế bào nhiều hơn, có lợi trong điều trị ung thư [42].

+ Ngăn chặn yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu [43].

+ Theo nghiên cứu của Matthew C. và cộng sự, cơ chế chống viêm như sau: Điều chỉnh giảm hoạt động của COX-2, lipoxygenase; Ức chế sản xuất TNF α, IL-1, -2, -6, -8 và -12, MCP-1, CGRP [44].

- Tác dụng chống oxy hóa

Tác dụng chống oxy hóa do: Cấu trúc *Curcumin* chứa một nhóm cacbonyl, methoxy và hydroxyl giúp loại bỏ các gốc tự do trong cơ thể, đặc biệt là peroxyl gốc (ROO-). Ngoài ra, nhóm 2 và 4 - hydroxyphenyl và orthoalkoxy giúp tăng hoạt tính chống oxy hóa [40]. Thu dọn các gốc superoxide, hydrogen peroxide và nitricoxide in vitro và in vivo, giảm phức hợp sắt và ức chế quá trình peroxy hóa lipid [43]

- Tác dụng chống ung thư: Curcumioid nano ngăn ngừa ung thư do hóa trị hoặc xạ trị thông qua sự đột biến gen sinh ung, điều hòa chu kỳ tế bào, quá trình apoptosis, ức chế hình thành khối u và di căn. Một số cơ chế thể hiện như sau:

+ Cảm ứng quá trình apoptosis trong bệnh bạch cầu, ức chế thụ thể của COX-2 trong ung thư ruột kết và ung thư biểu mô tuyến vú [43],[45].

+ Ngăn chặn sự phát triển tế bào ung thư thông qua tăng sinh cyclin D1 và c-myc. Ở liều thấp làm ngừng chu kỳ tế bào, liều cao gây quá trình apotosis (tự chết theo chương trình của tế bào).

+ Kích hoạt gen ức chế khối u (gen P53 và P21), caspase 8,3 và một số proteinkinase khác [46].

Tác dụng chống ung thư thông qua bắt giữ chu kỳ tế bào như:

+ Ức chế sự biểu hiện của cyclin D1 và CDK4 thông qua quá trình acetyl hóa và điều hòa p53

+ Ức chế cạnh tranh ATP bằng cách điều chỉnh giảm sự biểu hiện của mRNA và protein của cyclin D18 [44].

1.5.2.3. Cam thảo (Glycyrrhiza uralensis)

Hình 1.3. Cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*)

* Tên khoa học: *Glycyrrhiza uralensis*

* Thành phần hóa học:

- Các saponin

Các saponin là nhóm hợp chất quan trọng nhất trong Cam thảo, trong đó acid glycyrrhizic (còn gọi là acid glycyrrhizinic) là chất quan trọng nhất.

Acid glycyrrhizic là một saponin nhóm oleanan, có vị rất ngọt (gấp 60 lần đường saccharose), chỉ có trong bộ phận ở dưới mặt đất, hàm lượng từ 10 – 14% trong dược liệu khô. Glycyrrhizic là dạng muối Mg và Ca của acid glycyrrhizic được Robiquet phân lập năm 1809 dưới dạng vảy màu vàng. Glycyrrhizin tinh khiết ở dạng bột kết tinh trắng dễ tan trong nước nóng, cồn loãng, không tan trong ether và chloroform.

Trong cam thảo còn có các dẫn chất triterpenoid khác như: acid liquiritic (acid này khác acid glycyrrhetic bởi nhóm carboxyl ở vị trí C-29), acid 18-α-hydroxyglycyrrhetic, acid 24-hydroxyglycyrrhetic, acid 24-hydroxyliquiritic, glabrolid, desoxyglabrolid, isoglabrolid, 21-α-hydroxyisoglabrolid, liquiridiolic, acid 11-desoxoglycyrrhetic và acid 24-hydroxy 11-desoxoglycyrrhetic.

- Các flavonoid

Đây là nhóm hoạt chất quan trọng thứ hai trong rễ cam thảo với hàm lượng 3 – 4%. Liquiritin (liquiritirosid) và isoliquiritin (isoliquiritirosid) là hai chất quan trọng nhất

* Tác dụng dược lý:

- Nghiên cứu gần đây cho thấy cam thảo có tác dụng nâng cao khả năng miễn dịch của cơ thể.

- Dịch chiết cam thảo có tác dụng chống loét dạ dày. Tác dụng đã được chứng minh bằng thí nghiệm trên súc vật.

- Tác dụng chống co thắt được chứng minh trên ruột cô lập của chuột lang hoặc thỏ cho thấy tác dụng đối kháng với histamin, acetylcholin. Tác dụng chống co thắt và tác dụng bảo vệ chống loét dạ dày chủ yếu là do các thành phần flavonoid.

- Các saponin của dịch chiết cam thảo có tác dụng long đờm.

- Cam thảo có tác dụng kháng viêm. Glycyrrhizin làm giảm mô hạt tạo thành xung quanh viên bông cấy dưới da của chuột cống trắng, làm giảm đổ sưng của chân chuột sau khi tiêm formol. Acid liquiritic cũng có tác dụng chống viêm, chống loét và làm chóng lành sẹo.

* Tính vị, quy kinh: Cam, bình. Vào các kinh tâm, phế, tỳ, vị và thông 12 kinh.

* Công năng, chủ trị: Kiện tỳ ích khí, nhuận phế chỉ ho, giải độc, chỉ thống, điều hòa tác dụng các thuốc. Chích Cam thảo: Bổ tỳ, ích khí, phục mạch. Chủ trị: Tỳ vị hư nhược, mệt mỏi yếu sức, hóa đờm chỉ ho, đánh trống ngực, mạch kết đại (mạch dừng), loạn nhịp tim. Sinh Cam thảo: Giải độc tả hoả. Chủ trị: Đau họng, mụn nhọt, thải độc.

* Cách dùng, liều lượng: Ngày dùng từ 4g đến 12g, dạng thuốc sắc hoặc bột [47],[48],[49].

1.5.2.4. Quế (Ramulus Cinnanomi)

Hình 1.4. Quế (*Ramulus Cinnanomi*)

* Tên khoa học: *Cinnamomum* cassia Presl, họ Long não (*Lauraceae*).

Bộ phận dùng: Vỏ thân hoặc vỏ cành đã chế biến và phơi khô của cây Quế

* Tính vị quy kinh: Tân, cam, đại nhiệt. Vào các kinh thận, tỳ, tâm, can.

* Công dụng: Bổ hỏa trợ đương tán hàn, chỉ thống, hoạt huyết thông kinh. Chủ trị: Lưng gối đau lạnh, bụng đau lạnh, nôn mửa, tiêu chảy, bế kinh, đau bụng kinh, phù thũng, tiểu tiện rối loạn (đái không thông lợi, đái nhiều lần).

* Thành phần hóa học:

- Vỏ quế:

+ Tinh dầu 1 – 3%, có thể đạt đến 6% (quế Quảng Nam)

+ Các hợp chất diterpenoid (cinnacassiol), phenylglycosid, chất nhày, các hợp chất flavonoid, tanin và coumarin.

- Lá:

+ Tinh dầu: 0,14 – 1,04%. Phân tích tinh dầu lá quế Yên Bái bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon – 13 xác định được 5 thành phần: benzaldehyd, bazylacetat, aldehyd cinnamic, cinnamylacetat và coumarin. Hàm lượng aldehyd cinnamic dao động 12 tháng trong năm từ 34,65 – 95,55%. Thấp nhất vào tháng 6 và các tháng sau đó (tháng 7, 8, 9: 57,74%, 69,16%, 82,43%). Ngược lại làm lượng cinnamyl acetat cao nhất vào tháng 6 (57,933%) và giữ ở hàm lượng đáng kể trong suốt các tháng mùa hè. Từ tháng 10 cho đến giữa tháng 5 hàm lượng aldehyd cinnamic trong lá luôn luôn đạt trên 80%. Vì

vậy nếu khai thác tinh dầu vỏ kết hợp với lá nên khai thác trước tháng 5 và sau tháng 9.

* Tác dụng dược lý:

- Quế là vị dược liệu quý dùng trong cả Tây y và Đông y. Quế có tác dụng kích thích tiêu hóa, hỗ trợ hô hấp và tuần hoàn, tăng sự bài tiết, co mạch, tăng nhu động ruột và co bóp tử cung. Theo những nghiên cứu gần đây, quế còn có tác dụng chống khối u, chống xơ vữa động mạch vành, chống oxy hóa. Trong Tây y dùng dưới dạng cồn thuốc, rượu thuốc, rượu mùi.

- Quế còn sử dụng rất nhiều để làm gia vị. Một mặt do mùi vị quế kích thích ăn ngon, kích thích tiêu hóa, mặt khác còn do quế ức chế sự phát triển của nấm, bảo vệ thức ăn khỏi thiu thối. Ở nồng độ 1% bột quế có tác dụng ức chế sự phát triển của Aspergilus flavus và nồng độ 0,25 – 0,5% ức chế sự tạo thành độc tố aflatoxin.

* Tính vị, quy kinh: Ngọt cay, đại nhiệt. Tác dụng vào cả 5 kinh: tâm, phế, thận, can, tỳ.

* Công dụng: Đông y xếp quế vào vị thuốc bổ. Có tác dụng bổ mệnh môn hỏa, thông huyết mạch, trừ hàn tích. Dùng để hồi dương cứu nghịch, mệnh môn hỏa suy, tạng phủ lạnh, tiêu hóa kém, đau đầy bụng. Trong Đông y còn dùng quế chi để chữa cảm lạnh không ra mồ hôi, tê thấp, chân tay đau buốt. Tinh dầu quế có tác dụng sát khuẩn, kích thích tiêu hóa, kích thích hệ thống thần kinh làm dễ thở và tuần hoàn lưu thông, kích thích nhu động ruột, được dùng phối hợp với các vị thuốc khác dưới dạng rượu thuốc, cồn ngọt và dạng dầu cao xoa.

* Cách dùng, liều dùng: Ngày dùng từ 1 g đến 4 g, dạng thuốc hãm, hoặc thuốc hoàn tán [47],[48],[50].

1.5.2.5. Nấm đông trùng (Cordyceps militaris)

Hình 1.5. Nấm đông trùng (*Cordyceps militaris*)

* Tên khoa học: *Cordyceps militaris*

* Thành phần hóa học:

Theo một số nghiên cứu về thành phần hóa học của thể quả nấm Cordyceps militaris có chứa: Protein (40,69%); các vitamin: A; B1; B6; B12; B3; các nguyên tố khoáng: Se; Zn; Cu - Một số hợp chất như: Cordycepin; Adenosine,.... có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng và đem lại giá trị dược liệu cao [51].

Ngoài ra còn rất nhiều hợp chất có giá trị: N-acetylgalactosamine, và exopolysaccharide, chitinase, cicadapeptins và myriocin, các chất có hoạt tính sinh học là saccharide (trehalose), nucleosides (adenosine, inosine), strerols (ergosterol).

- Acid amin

Theo nghiên cứu của Hyun (2008): xác định được trong quả thể và thể vàng của C. militaris có tổng hàm lượng acid amin tự do lần lượt là 69,32 mg/g và 14,03 mg/g. Hàm lượng các acid amin riêng lẻ trong quả thể và thể vàng của C. militaris từ 1,15 -15,06 mg/g và từ 0,36 - 2,99 mg/g [34]. Acid amin có hàm lượng lớn nhất là lysine (15,06 mg/g), một số acid amin khác như: acid glutamic; prolin; threonine; arginine và alanin trong quả thể. Chang và cộng sự (2001) báo cáo rằng các acid amin phong phú nhất trong sợi nấm C. militaris là acid aspartic (2,66 mg/g), valine (2,21 mg/g) và tyrosine (1,57 mg/g) [52].

- Acid béo

Acid béo được chiết xuất từ các mẫu khô bằng phương pháp của Hamilton (1992).

Kết quả: trong quả thể nấm của C. militaris rất giàu acid béo không bão hòa (khoảng 70% tổng số acid béo). Trong đó, lượng acid linoleic là acid không no phổ biến nhất chiếm 61,3% quả thể và 33,0% thể vàng. Acid béo no chủ yếu là acid Palmitic chiếm 24,5% quả thể và 21,5% thể vàng [52].

- Adenosine và Cordycepin

Adenosine và Cordycepin là hai hợp chất có dược tính cao của nấm Cordyceps militaris. Nồng độ adenosine là 0,18% trong quả thể và 0,06% trong thể vàng. Đối với hợp chất Cordycepin trong quả thể có hàm lượng cao gấp 3 lần so với trong thể vàng (0,97% và 0,36%) [52].

- Polysaccharide

Các polysaccharide CPS-1 và CPS-2 được tách chiết từ nấm Cordyceps militaris có thành phần như: monosaccharide, mannose và galactose. Kết quả: các polysaccharide này có khả năng phục hồi các tổn thương gan do Ethanol. Theo Yan (2008) cho rằng tác dụng này do chức năng chống oxy hóa của các polysaccharide [53].

* Tác dụng dược lý:

- Chống oxy hoá: Chiết xuất trong nước của C. militaris chứa hàm lượng Cordycepin, phenolics và flavonoid được đánh giá là chống oxy hóa mạnh nhất. Nó có hoạt tính cao trong ức chế quá trình oxy hóa acid linoleic, chelat hóa các ion kim loại, và loại bỏ DPPH và gốc hydroxyl. Ngoài ra có hoạt tính thu dọn gốc tự do tương tự với acid L-ascorbic và ức chế peroxy hóa lipid tương đương với α-tocopherol [54],[55].

- Chống ung thư: Hoạt tính chống ung thư do C.militaris chứa 2 thành phần Cordycepin và Adenosine [56].

- Hạ đường huyết: Cordyceps militaris có tác dụng hạ đường huyết, giảm cholesterol, hạ huyết áp trong điều trị đái tháo đường type 2.

Cảm ứng Apoptotic qua caspase trung gian: tăng chết tế bào nhiều loại ung thư gan, phổi, vú, tuyến tiền liệt, bệnh bạch cầu và u nguyên bào thần kinh.

Cảm ứng Apoptotic qua trung gian MAPK và chống tăng sinh - Gây quá trình chết và giảm tăng sinh hoặc kích hoạt p38 MAPK trong các tế bào ung thư bàng quang, thận, phổi, bạch cầu và u nguyên bào thần kinh đệm.

Bắt giữ G2/M-phage, S-phage trong các tế bào bệnh bạch cầu và G1-phage trong các tế bào u nguyên bào thần kinh và u ác tính.

Hiệu ứng chống tăng sinh qua con đường GSK - 3β

+ Ở K phổi, Cordycepin làm giảm mức phosphoryl hóa của EGFR và Akt.

+ Hình thành cAMP vòng kích hoạt protein G qua trung gian ADORA3 ức chế protein kinase A (PKA) và GSK-3β ức chế tăng sinh tế bào ung thư.

Chống di căn: ức chế metalloproteinase MMP-2 và MMP-9, kích thích chất ức chế mô của metalloproteinase TIMP-1 và TIMP-2 ức chế kết tập tiểu cầu và giảm sự xâm lấn của tế bào ung thư hắc tố.

- Chống viêm: Chiết xuất của C.militaris trong kiềm giúp phân lập β-(1→3)-D-glucan polyme có hoạt tính chống viêm mạnh nhất có polysaccharide của C. militaris.

Cơ chế: Ức chế biểu hiện IL-1β, TNF-α và COX-2; Ngoài ra, còn chống ung thư và chống thụ thai do formalin và viêm phúc mạc do LPS ở chuột [57].

- Bảo vệ và điều hoà miễn dịch: Bảo vệ và điều hòa miễn dịch là một trong những tác dụng sinh học quan trong của nấm C.militaris. Polypeptide trong C.militaris có thể điều chỉnh khả năng miễn dịch thông qua việc điều chỉnh gen Hist1h2bp, Ctsg và Elane ở chuột. Trong đó:

+ Gen Ctsg và Elane điều hòa bạch cầu trung tính, cải thiện khả năng miễn dịch của cơ thể.

+ Hist1h2bp là một trong những loại histones liên quan đến cơ chế điều hòa miễn dịch của cơ thể. Đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa gen, sự tăng sinh và apoptosis của các tế bào khối u, điều hòa các tự kháng nguyên, điều chỉnh phosphatidylserine, giúp giảm bớt áp lực và cải thiện trí nhớ,... [58].

- Tác dụng kháng virus: Cordyceps militaris tác động lên nhiều loại virus như: HIV, HSV, HCV, virus cúm. Thành phần Polysaccharis từ chiết xuất Cordyceps militaris kích thích miễn dịch bẩm sinh thông qua IL-12 và kích hoạt các tế bào tiêu diệt tự nhiên để chống lại các tế bào chủ bị nhiễm virus.

Cơ chế như sau:

+ Thúc đẩy hấp thu NO, ROS, TNF-α, và quá trình thực bào (Lee và Hong (2011)).

+ Tăng sinh tế bào lympho và sản xuất IFN-γ và IL-4 (Wang (2013) [59].

1.5.2.6. Gừng (Zingiber officinale)

Hình 1.6. Gừng (*Zingiber officinale*)

* Tên khoa học: *Zingiber officinale*

* Thành phần hóa học:

Gừng chứa tinh dầu (2 - 3%), nhựa dầu (4,2 – 6,5%), chất béo (3%) và chất cay: zingerol, zingeron, shagaol,...

Tinh dầu gừng là chất lỏng không màu hoặc màu vàng nhạt. Tinh dầu gừng có mùi đặc trưng của gừng nhưng không chứa các chất cay. Thành phần chủ yếu của tinh dầu là hợp chất hydrocarbon sesquiterpenic: α - zingeiberen

(35,6%), arcurcumen (17,7%), β - farnesen (9,8%); ngoài ra còn có chứa một lượng nhỏ các hợp chất alcol monoterpenic: geraniol (1,4%), linalol (1,3%), borneol (1,4%)...

Nhựa dầu gừng có chứa 20 – 25% tinh dầu và 20 – 30% các chất cay.

* Tính vị, quy kinh: Tân, nhiệt. Vào các kinh tâm, phế, tỳ, vị, thận, đại tràng.

* Công năng, chủ trị: Ôn trung tán hàn, hồi dương, thùng mạch, táo thấp tiêu đàm. Chủ trị: Đau bụng lạnh, đầy trướng không tiêu, nôn mửa ỉa chảy, tứ chi lạnh, đàm ẩm. ho suyễn. Thán khương tăng cường chi huyết.

* Cách dùng, liều lượng: Ngày dùng từ 4 g đến 8 g, dạng thuốc sắc hoặc hoàn tán. Thường phối hợp với các vị thuốc khác [47],[48],[50].

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

2.1. Chất liệu nghiên cứu

2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu

- Chế phẩm nghiên cứu: EFCOVIDA dạng bột, được sản xuất bởi Công ty trách nhiệm hữu hạn Công nghệ cao Trịnh Năng. Thuốc thử đạt Tiêu chuẩn cơ sở.

Bảng 2.1. Thành phần EFCOVIDA

Thành phần	**Hàm lượng (mg)**	**Tiêu chuẩn**
Endo Fullerene	15	Vị thuốc đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam xuất bản lần thứ 5; Thuốc thử đạt tiêu chuẩn cơ sở.
Nano Curcumine	15	
Cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis)*	15	
Quế (*Ramulus Cinnanomi)*	15	
Nấm đông trùng (*Cordyceps militaris)*	15	
Gừng (*Zingiber officinale)*	10	
Tá dược (vừa đủ)		

- Liều dùng dự kiến sử dụng cho 1 người (50kg) uống trong 24h: 250 mg/24h. Quy đổi ra liều dự kiến có tác dụng: Ở chuột nhắt trắng liều 1 là 60 mg/kg/24h. Liều 2 – liều cao gấp 2 lần liều 1 là 120 mg/kg/24h (hệ số ngoại suy trên chuột nhắt là 12) [60].

2.1.2. Hóa chất nghiên cứu

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

- Levamisol dạng bột, biệt dược Tetramisole hydrocloride lọ 5g của hãng Sigma, Mỹ. Thuốc được dùng làm đối chứng dương trong nghiên cứu miễn dịch.

- Nhũ dịch OA (Ovalbumin + $Al(OH)_3$): dùng làm kháng nguyên gây mẫn cảm cho chuột.

- 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 4°C, sử dụng trong thời hạn 2 tuần. Sản phẩm của công ty Dược phẩm Nam Khoa.

2.1.3. Máy móc nghiên cứu

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

- Kit định lượng IL-4, IL-6, IFN-, TNF-α và IgG của Hãng Cloud-Clone Corp, Mỹ.

- Ống nghiệm, bơm tiêm và một số thiết bị, dụng cụ phụ trợ khác.

- Bộ dụng cụ mổ động vật cỡ nhỏ.

- Kim cong đầu tù chuyên dụng dùng cho chuột uống thuốc (Nhật Bản).

- Một số thiết bị và dụng cụ nghiên cứu khác.

2.2. Đối tượng nghiên cứu:

Chuột nhắt trắng chủng Swiss trưởng thành, khỏe mạnh, cả hai giống, nặng 20±2 gram 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 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm, có đối chiếu với nhóm chứng.

Thí nghiệm được tiến hành trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng hoá chất cyclophosphamid (CY) [61],[62].

Thiết kế nghiên cứu

Tiêm màng bụng cyclophosphamid (CY), liều duy nhất 200 mg/kg thể trọng để gây suy giảm miễn dịch.

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô nghiên cứu:

- Lô 1 (n=10) Chứng sinh học: Chuột không bị tác động gì.
- Lô 2 (n=10) Mô hình: Chuột được tiêm CY + uống nước cất.
- Lô 3 (n=10) Chứng dương: Chuột được tiêm CY + uống levamisol liều 10 mg/kg.
- Lô 4 (n=10) EFCOVIDA liều 60 mg/kg/ngày: Chuột được tiêm CY + uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg/ngày (tương đương liều 250 mg/ngày/người, hệ số ngoại suy trên chuột nhắt là 12).
- Lô 5 (n=10) EFCOVIDA liều 120 mg/kg/ngày: Chuột được tiêm CY + uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg/ngày (tương đương liều 500 mg/ngày/người, hệ số ngoại suy trên chuột nhắt là 12).

Mô hình nghiên cứu được tiến hành trong 8 ngày. Chuột bắt đầu được uống nước cất và các thuốc liên tục từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7 của nghiên cứu. Trong thời gian uống thuốc:

- Ngày thứ 2: chuột ở tất cả các lô được gây mẫn cảm bằng tiêm màng bụng hồng cầu cừu 5% (0,5 mL/chuột) và tiêm dưới da gáy kháng nguyên OA ($Al(OH)_3$ + ovalbumin) (0,1 mL/chuột).
- Ngày thứ 4: tiêm màng bụng CY liều 200 mg/kg cho các lô 2 đến lô 5.
- Ngày thứ 7: tiêm phát hiện bằng 50 µl kháng nguyên OA vào một bên gan bàn chân chuột, bên còn lại tiêm thể tích tương tự dung dịch NaCl 0,9%.

Sau 24 giờ tiêm vào gan bàn chân chuột, giết chuột tiến hành xác định các chỉ số nghiên cứu bao gồm đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA trên các đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và trên các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu:

2.3.1. Đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA trên các đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu

- Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối: được tính là trọng lượng lách, tuyến ức tương ứng với thể trọng chuột.

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

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

Chuột được giết bằng cách kéo đứt đốt sống cổ, mổ bụng để 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.

- 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 và tuyến ức của 30% số chuột mỗi lô. Xét nghiệm giải phẫu vi thể được tiến hành tại khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện 103 do ThS.BS. Nguyễn Thành Chung đọc và nhận định kết quả.

2.3.2. Đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA trên các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu

- 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 µl kháng nguyên OA (liều

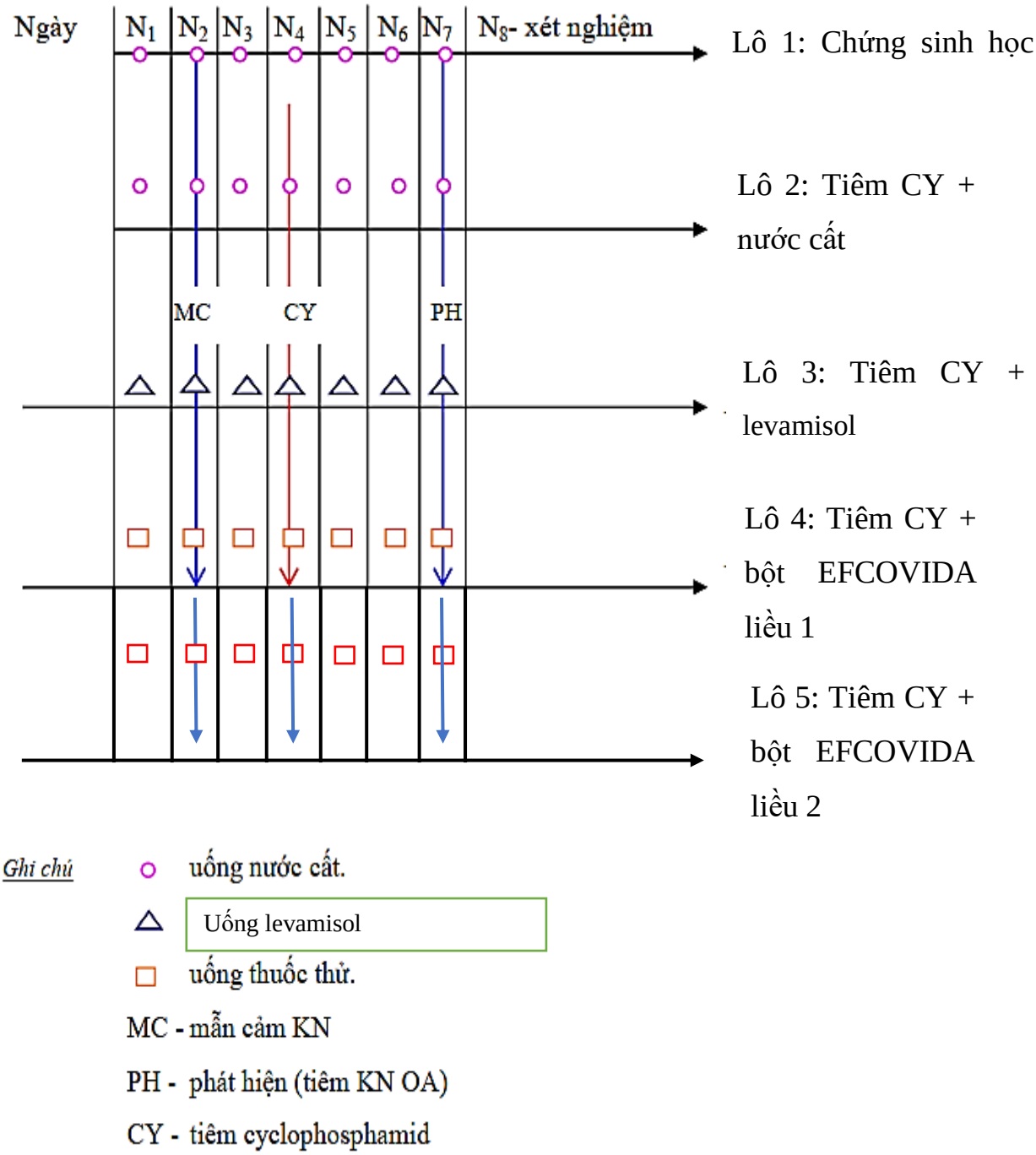
phát hiện) vào một bên gan bàn chân chuột, bên còn lại tiêm thể tích tương tự NaCl 0,9%. Sau 24 giờ tiêm kháng nguyên phát hiện, đo bề dày hai gan bàn chân chuột bằng thước palmer. Phản ứng bì được tính bằng hiệu số chênh lệch bề dày gan bàn chân chuột 2 bên sau khi tiêm phát hiện.

- Định lượng IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α và IgG ở máu ngoại vi bằng phương pháp ELISA.

2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm: Bộ môn Dược lý – Đại học Y Hà Nội
- Thời gian: Tháng 4/2022 – 10/2022

2.5. Sơ đồ nghiên cứu:



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

2.6. Xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu nghiên cứu được biểu diễn dưới dạng $\overline{X} \pm SD$, xử lý thống kê theo thuật toán thống kê T-test Student bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

	p < 0,05	*p < 0,01*	*p < 0,001*
Khác biệt so với lô chứng sinh học	*	**	***
Khác biệt so với lô mô hình	Δ	ΔΔ	ΔΔΔ

2.7. Sai số và khống chế sai số

- Sai số các phương pháp thu thập số liệu.

- Các phương pháp được áp dụng để hạn chế tối đa các sai số có thể xảy ra trong quá trình thu thập, phân tích và xử lý số liệu:

+ Động vật nghiên cứu được lựa chọn tương đối đồng đều, khỏe mạnh, không có dị tật hay dấu hiệu bất thường.

+ Thời gian thực hiện các bước thí nghiệm giữa các lô chuột là thống nhất cùng một thời điểm.

+ Số liệu được đo đạc cẩn thận và chính xác bằng các dụng cụ, máy móc tại phòng thí nghiệm. Lưu trữ số liệu, thông tin bằng sổ ghi chép, chụp ảnh.

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

2.8. Vấn đề đạo đức của nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên chuột nhắt trắng, số lượng động vật sử dụng trong các mô hình thí nghiệm được hạn chế ở mức tối thiểu, 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.

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 [63].

CHƯƠNG 3
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả về tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch không đặc hiệu:

3.1.1. Kết quả đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA lên sự thay đổi trọng lượng lách, tuyến ức.

3.1.1.1. Trọng lượng lách tương đối

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của EFCOVIDA trên trọng lượng lách tương đối

Lô	n	Trọng lượng lách tương đối (‰)
Lô 1: Chứng sinh học	10	7,75 ± 2,24
Lô 2: Mô hình CY	10	2,43 ± 0,55***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	2,57 ± 0,37***
Lô 4: EFCOVIDA liều 60 mg/kg	10	2,72 ± 1,07***
Lô 5: EFCOVIDA liều 120 mg/kg	10	2,37 ± 0,54***

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

Kết quả trình bày ở bảng 3.1 cho thấy:

- 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 có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

- Lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg: Trọng lượng lách tương đối có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

- Lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg: Trọng lượng lách tương đối không có sự khác biệt so với lô mô hình (p > 0,05).

3.1.1.2. Trọng lượng tuyến ức tương đối

Bảng 3.2: Ảnh hưởng của EFCOVIDA lên trọng lượng tuyến ức tương đối

Lô	n	Trọng lượng ức tương đối (‰)
Lô 1: Chứng sinh học	10	2,93 ± 1,02
Lô 2: Mô hình CY	10	0,73 ± 0,21***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	1,02 ± 0,51***
Lô 4: EFCOVIDA liều 60 mg/kg	10	0,60 ± 0,32***
Lô 5: EFCOVIDA liều 120 mg/kg	10	0,88 ± 0,27***

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

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy:

- 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 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 EFCOVIDA liều 60 mg/kg (lô 4): Trọng lượng tuyến ức tương đối không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình (p > 0,05).

- Lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (lô 5): Trọng lượng tuyến ức 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).

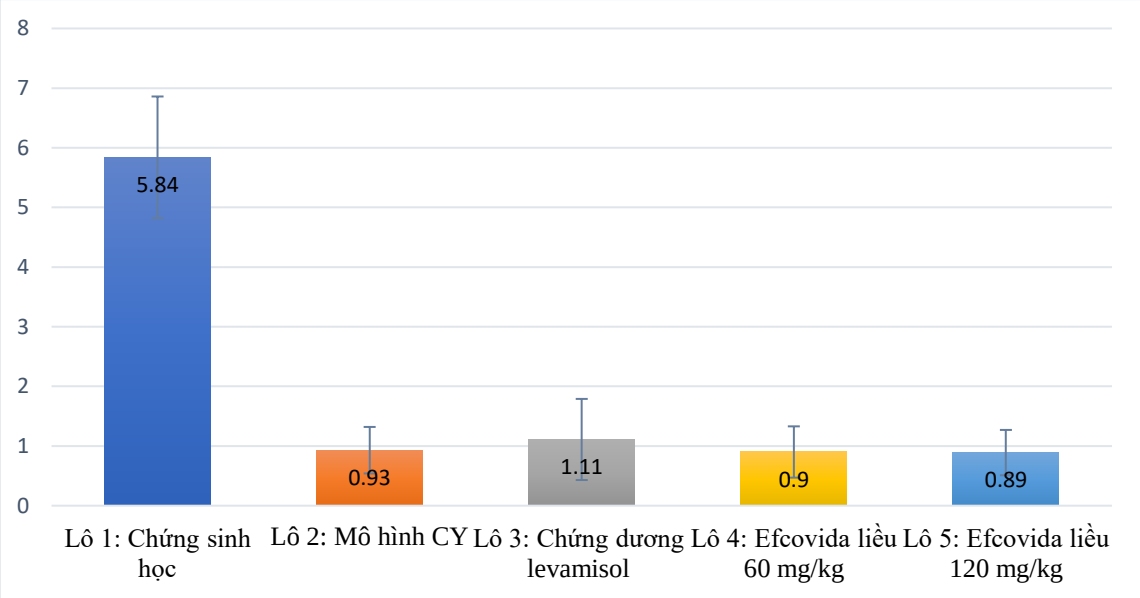
3.1.1.3. Giải phẫu vi thể lách và tuyến ức

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

Lô nghiên cứu	***Lách***	***Tuyến ức***
Lô 1 Chứng sinh học	3/3 mẫu bệnh phẩm có cấu trúc lách bình thường, rõ tủy trắng và tuỷ đỏ giàu lympho bào trưởng thành.	3/3 mẫu bệnh phẩm có cấu trúc tuyến ức bình thường, rõ cấu trúc vùng vỏ và vùng tuỷ, vùng vỏ giàu lympho bào trưởng thành.
Lô 2 Mô hình	3/3 mẫu bệnh phẩm có giảm mạnh số lượng lympho bào trưởng thành so với lô chứng sinh học.	3/3 mẫu bệnh phẩm giảm không đồng đều số lượng lympho bào trưởng thành so với lô chứng sinh học.
Lô 3 Levamisol	3/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ không đồng đều số lượng lympho bào trưởng thành so với mô hình.	3/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ không đồng đều số lượng lympho bào so với mô hình.
Lô 4 EFCOVIDA liều 60 mg/kg	1/3 mẫu bệnh phẩm tăng mạnh số lượng lympho bào so với lô mô hình. 2/3 mẫu bệnh phẩm tăng vừa số lượng lympho bào so với lô mô hình.	3/3 mẫu bệnh phẩm tăng mạnh số lượng lympho bào so với mô hình.
Lô 5 EFCOVIDA liều 120 mg/kg	2/3 mẫu bệnh phẩm tăng vừa số lượng lympho bào so với mô hình. 1/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào trưởng thành so với mô hình.	1/3 mẫu bệnh phẩm tăng vừa số lượng lympho bào so với mô hình. 2/3 mẫu bệnh phẩm tăng nhẹ số lượng lympho bào so với mô hình.

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 cải thiện tổn thương của lách và tuyến ức do tác động của CY so với lô mô hình. EFCOVIDA cả 2 liều đều giúp cải thiện tổn thương của lách và tuyến ức gây ra do CY so với lô mô hình.

3.1.2. Kết quả đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA lên sự thay đổi số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi



Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi

Kết quả trình bày ở biểu đồ 3.1 cho thấy:

- 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 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 EFCOVIDA liều 60 mg/kg và 120 mg/kg: Số lượng bạch cầu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).

3.1.3. Kết quả đánh giá tác dụng của bột EFCOVIDA lên sự thay đổi công thức bạch cầu trong máu ngoại vi

Bảng 3.4: Ảnh hưởng của EFCOVIDA 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	3,25 ± 0,78	1,39 ± 0,44	1,20 ± 0,50
Lô 2: Mô hình CY	0,62 ± 0,27***	0,25 ± 0,11***	0,06 ± 0,05***
Lô 3: Chứng dương levamisol	0,64 ± 0,26***	0,30 ± 0,21**	0,17 ± 0,29***
Lô 4: EFCOVIDA liều 60 mg/kg	0,58 ± 0,26***	0,24 ± 0,18***	0,08 ± 0,15***
Lô 5: EFCOVIDA liều 120 mg/kg	0,54 ± 0,27***	0,23 ± 0,13***	0,12 ± 0,18***

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

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Số lượng cả 3 loại bạch cầu (bạch cầu lympho, bạch cầu trung tính và bạch cầu mono) giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với p < 0,001.

- Lô uống levamisol (lô 3): Số lượng các loại 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).

- Các lô uống EFCOVIDA (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. Kết quả về tác dụng của bột EFCOVIDA trên các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

3.2.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA lên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu qua tế bào T

3.2.1.1. Phản ứng bì với kháng nguyên OA

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA đến phản ứng bì với kháng nguyên OA

Lô	n	Phản ứng bì (% tăng chiều dày bàn chân chuột)
Lô 1: Chứng sinh học	10	97,59 ± 35,54
Lô 2: Mô hình CY	10	67,44 ± 28,12*
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	107,88 ± 45,62$^{\Delta}$
Lô 4: EFCOVIDA liều 60 mg/kg	10	67,14 ± 36,34
Lô 5: EFCOVIDA liều 120 mg/kg	10	91,21 ± 29,65

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

$^{\Delta}$: Khác biệt so với Mô hình với p < 0,05

Kết quả trình bày ở bảng 3.5 cho thấy:

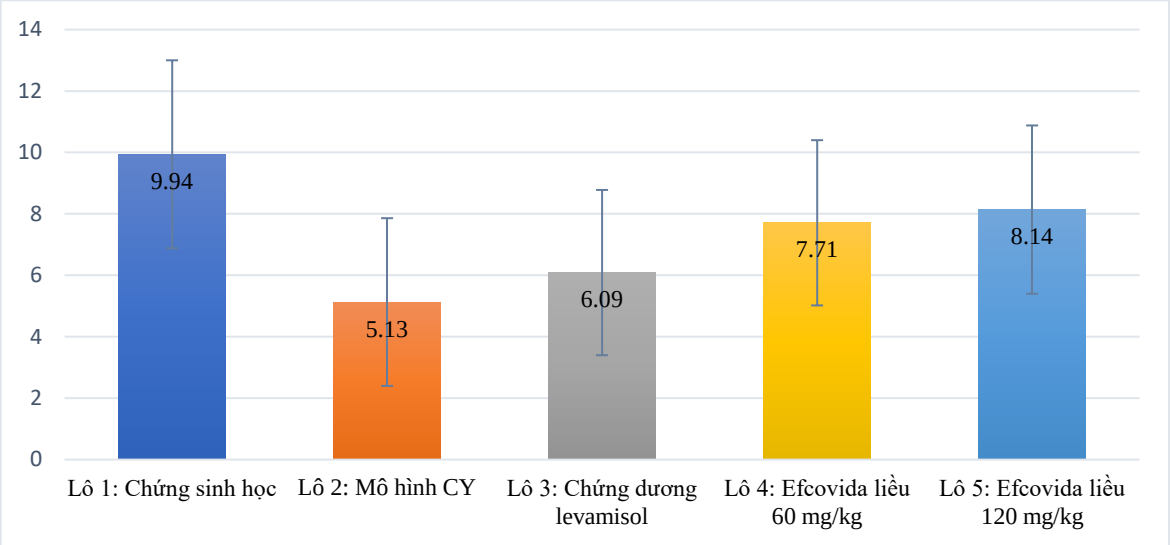
– Lô mô hình (lô 2): Phản ứng bì giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học với p < 0,05.

– Lô uống levamisol (lô 3): Phản ứng bì tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với p < 0,05.

– Lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (lô 4): Phản ứng bì không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình (p > 0,05).

– Lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (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



Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của EFCOVIDA lên nồng độ IL-4 trong máu ngoại vi

Kết quả trình bày ở biểu đồ 3.2 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IL-4 trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với $p < 0,001$.

- Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IL-4 trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg: Nồng độ IL-4 trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg: Nồng độ IL-4 trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình với $p < 0,05$.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của thuốc thử lên nồng độ IL-6 trong máu ngoại vi

Lô	**n**	**Nồng độ IL-6 (**pg/mL**)**
Lô 1: Chứng sinh học	10	8,64 ± 3,62
Lô 2: Mô hình CY	10	5,75 ± 2,62
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	7,86 ± 3,38
Lô 4: EFCOVIDA liều 60 mg/kg	10	7,25 ± 2,92
Lô 5: EFCOVIDA liều 120 mg/kg	10	8,23 ± 3,18

Kết quả trình bày ở bảng 3.6 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IL-6 trong máu ngoại vi có xu hướng giảm so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IL-6 trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (lô 4) : Nồng độ IL-6 trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (lô 5): Nồng độ IL-6 trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của EFCOVIDA lên nồng độ TNF-α trong máu ngoại vi

Lô	n	Nồng độ TNF-α (pg/mL)
Lô 1: Chứng sinh học	10	20,11 ± 7,90
Lô 2: Mô hình CY	10	14,10 ± 4,48
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	14,99 ± 9,90
Lô 4: EFCOVIDA liều 60 mg/kg	10	20,82 ± 7,24 $^{\Delta}$
Lô 5: EFCOVIDA liều 120 mg/kg	10	14,04 ± 7,97

Chú thích: $^{\Delta}$: Khác biệt so với Mô hình với p < 0,05

Kết quả trình bày ở bảng 3.7 cho thấy:

– Lô mô hình (lô 2): Nồng độ TNF-α trong máu ngoại vi có xu hướng giảm so với lô chứng sinh học, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.

– Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ TNF-α trong máu ngoại vi có xu hướng tăng so với lô mô hình nhưng chưa có sự khác biệt có ý nghĩa (p > 0,05).

– Lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (lô 4): 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 EFCOVIDA liều 120 mg/kg (lô 5): Nồng độ TNF-α trong máu ngoại vi không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình (p > 0,05).

Bảng 3.8: Ảnh hưởng của EFCOVIDA lên nồng độ IFN-γ trong máu ngoại vi

Lô	**n**	**Nồng độ IFN-γ (**pg/mL**)**
Lô 1: Chứng sinh học	10	502,35 ± 108,28
Lô 2: Mô hình CY	10	367,46 ± 138,52*
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	343,93 ± 141,27*
Lô 4: EFCOVIDA liều 60 mg/kg	10	345,80 ± 136,19*
Lô 5: EFCOVIDA liều 120 mg/kg	10	356,65 ± 167,40*

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

Kết quả trình bày ở bảng 3.8 cho thấy:

- Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IFN-γ trong máu ngoại vi giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học với p < 0,05.

- Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IFN-γ trong máu ngoại vi không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình (p > 0,05).

- Lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (lô 4) Nồng độ IFN-γ trong máu ngoại vi không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình (p > 0,05).

- Lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (lô 5): Nồng độ IFN-γ trong máu ngoại vi không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình (p > 0,05).

3.2.2. Ảnh hưởng của EFCOVIDA lên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu qua tế bào B

Bảng 3.9: Ảnh hưởng của EFCOVIDA lên nồng độ IgG trong máu ngoại vi

Lô	**n**	**Nồng độ IgG** (µg/mL**)**
Lô 1: Chứng sinh học	10	203,51 ± 20,51
Lô 2: Mô hình CY	10	89,47 ± 35,89***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	74,34 ± 32,37***
Lô 4: EFCOVIDA liều 60 mg/kg	10	78,79 ± 32,59***
Lô 5: EFCOVIDA liều 120 mg/kg	10	66,58 ± 35,80***

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

Kết quả trình bày ở biểu đồ 3.9 cho thấy:

Lô mô hình (lô 2): Nồng độ IgG trong máu ngoại vi giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học với p < 0,001.

Lô uống levamisol (lô 3): Nồng độ IgG trong máu ngoại vi không khác biệt có ý nghĩa so với lô mô hình (p > 0,05).

Các lô uống EFCOVIDA (lô 4 và lô 5): Nồng độ IgG trong máu ngoại vi không khác biệt có ý nghĩa so với lô mô hình (p > 0,05).

CHƯƠNG 4
BÀN LUẬN

4.1. Bàn luận về đối tượng nghiên cứu và mô hình gây tổn thương hệ miễn dịch

4.1.1. Bàn luận về đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu thuốc trên động vật thực nghiệm là một việc bắt buộc phải tiến hành trước khi thuốc được đưa ra điều trị trên lâm sàng. Trong đề tài này đã chọn chuột nhắt trắng để tiến hành thí nghiệm. Chuột thí nghiệm đảm bảo đồng đều về các tiêu chuẩn: chuột nhắt trắng chủng Swiss thuần chủng, cả hai giới, trưởng thành, nặng 20 ± 2g do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp, được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước uống tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Dược lý – Trường Đại học Y Hà Nội 7 ngày trước và trong suốt thời gian nghiên cứu. Những tiêu chuẩn trên nhằm đảm bảo sự đồng đều về đáp ứng sinh học của chuột thực nghiệm. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng súc vật khác nhau như thỏ, lợn, bỏ, khỉ..., nhưng chuột nhắt trắng là động vật chọn làm thí nghiệm phổ biến hơn cả do nó có một số ưu điểm: tuổi sinh trưởng của chuột nhắt trắng ngắn hơn do quá trình sinh học xảy ra trong cơ thể nhanh chóng hơn, tác dụng của thuốc trên cơ thể cũng xảy ra sớm hơn so với các súc vật khác có thời gian sinh trưởng kéo dài hơn. Do đó, thời gian tiến hành thí nghiệm ngắn hơn, các hóa chất, dược liệu dùng trong nghiên cứu đỡ tốn kém hơn, việc cho ăn, chăm sóc dễ dàng, tiện lợi, an toàn so với súc vật khác. Hơn nữa giá thành của chuột nhắt trắng rẻ hơn so với các động vật lớn khác nên chọn động vật này sẽ tiết kiệm được chi phí [32].

4.1.2. 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 [64],[65].

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.

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 [66]. 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 [67],[68]. 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 [34]. 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 [5],[69],[70]. 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 [71]. 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.

4.1.3. 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 [72],[73].

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 [74],[75]. 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 [76]. 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 [5],[69].

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) [5],[69],[76].

4.2. Bàn luận về tác dụng của EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch không đặc hiệu.

4.2.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên trọng lượng lách tương đối và tuyến ức tương đối

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 [64],[65]. 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 mẫn 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 [64],[65]. 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 nhắt trắng giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Ở 3 lô dùng levamisol và bột EFCOVIDA các liều, TLLTĐ cũng giảm có ý nghĩa so với lô chứng sinh học. So với lô mô hình, TLLTĐ ở lô EFCOVIDA liều 60 mg/kg có xu hướng tăng và sự khác biệt là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở lô dùng bột EFCOVIDA liều 120 mg/kg, TLLTĐ không có sự khác biệt so với lô mô hình ($p > 0,05$).

Về trọng lượng tuyến ức tương đối (TLTƯTĐ), ở lô mô hình, TLTƯTĐ giảm có ý nghĩa so với lô chứng sinh học ($p < 0,01$). Ở 3 lô dùng levamisol và

bột EFCOVIDA các liều, TLTƯTĐ cũng giảm so với lô chứng sinh học. So với lô mô hình, bột EFCOVIDA liều 60 mg/kg TLTƯTĐ không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$) và bột EFCOVIDA liều 120 mg/kg làm tăng TLTƯTĐ có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

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 [71],[77],[78]. 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.

Như vậy, bột EFCOVIDA làm tăng trọng lượng các cơ quan lympho (lách và tuyến ức) ở chuột nhắt 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 (bột EFCOVIDA liều 120 mg/kg có tác dụng tốt hơn liều 60 mg/kg).

4.2.2. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên số lượng bạch cầu chung và số lượng các loại bạch cầu trong máu ngoại vi

4.2.2.1. 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 [71].

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 [71],[78]. 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 số lượng bạch cầu có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở lô bột EFCOVIDA liều 60 mg/kg và liều 120 mg/kg, số lượng bạch cầu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$). Kết quả này chỉ ra tác dụng kích thích miễn dịch của levamisol và bột EFCOVIDA trên tế bào gốc tạo máu trong tủy xương, từ đó làm cải thiện số lượng bạch cầu chung trong máu ngoại vi.

4.2.2.2. 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 [64],[65],[71].

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, ... [64],[65].

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 levamisol số lượng các loại bạch cầu có xu hướng tăng so với lô mô hình, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở lô dùng bột EFCOVIDA liều 60 mg/kg và 120mg/kg, số lượng các loại bạch cầu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).

Như vậy, bột EFCOVIDA có xu hướng làm tăng số lượng các loại bạch cầu trong máu ngoại vi và bột EFCOVIDA với liều 120 mg/kg đã thể hiện rõ tác dụng trên BC lympho. Kết quả này cho thấy bột EFCOVIDA có tác dụng kích thích miễn dịch.

4.3. Bàn luận về tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu.

4.3.1. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA 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 [64].

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, ... [65]. 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 [79]. 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 – $Al(OH)_3$ 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 [80],[81].

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 [82]. 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 mẫn 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 và bột EFCOVIDA liều 120mg/kg làm gia tăng phản ứng bì so với lô mô hình; bột EFCOVIDA liều 60mg/kg phản ứng bì không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$). Điều này cho thấy bột EFCOVIDA liều 120 mg/kg cải thiện phản ứng bì với kháng nguyên OA tốt hơn so với liều 60 mg/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-4 và nồng độ IL-6 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 nhắt, mà TNF-α có vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa quá trình này [83]. Bột EFCOVIDA ở cả 2 liều có tác dụng làm tăng nồng độ IL-4, IL-6 và làm tăng TNF-α so với lô mô hình.

Như vậy, bột EFCOVIDA 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-4, IL-6 và làm tăng TNF-α.

4.3.2. Ảnh hưởng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu qua tế bào 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 tủa, ngưng kết và hoạt hóa hệ miễn dịch không đặc hiệu [64],[71].

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) chĩa 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 [64],[65]. 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 [84].

Do đó, trên chuột nhắt bị suy giảm lympho bào B do CY, chúng tôi tiến hành định lượng kháng thể IgG 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 [85]. 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 [64],[65]. Tế bào lympho B mẫn 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. 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 IgG 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 IgG 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 IgG do lympho B biệt hóa thành tương bào tiết ra trong máu ngoại vi giảm khi tiêm CY cho chuột nhắt trắng.

So với lô mô hình, Levamisol và bột EFCOVIDA cả hai liều nồng độ IgG trong máu ngoại vi không khác biệt có ý nghĩa so với lô mô hình ($p > 0,05$).

Như vậy, bột EFCOVIDA ở cả 2 liều có tác dụng kích thích miễn dịch dịch thể thông qua làm tăng nồng độ IgG trong máu ngoại vi.

4.4. Lý giải tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch theo y học cổ truyền:

Từ "miễn dịch" xuất hiện đầu tiên trong "Miễn dịch loại phương" do Lý Thị viết vào thời nhà Minh. Y học cổ truyền từ lâu đã nhận ra rằng sự xuất hiện và phát triển bệnh tật có liên quan mật thiết đến chính khí của cơ thể (tức khả năng miễn dịch), dùng âm dương, tinh, khí, huyết, tân dịch, tạng phủ, hệ thống kinh lạc để lý giải tổ chức cơ cấu, công năng sinh lý, sự phát triển và biến hóa bệnh tật trong cơ thể con người, đồng thời chỉ đạo chẩn đoán và điều trị lâm sàng, phản ánh cái gọi là hệ thống miễn dịch và chức năng miễn dịch của Y học hiện đại. "Tố vấn – Bảo mệnh toàn hình luận" viết: "Nhân sinh hữu hình, bất ly âm dương". "Linh khu – Thọ thiên cương nhu" viết: "Cho nên bên trong có âm dương, bên ngoài cũng có âm dương". "Tố vấn – Sinh khí thông thiên luận" có nói: "Âm bình dương bí, tinh thần nãi trị; âm dương ly quyết, tinh khí nãi tuyệt". Điều này cho thấy tâm quan trọng của âm dương trong hoạt động chức

năng của cơ thể, một khi âm dương thất điều thì miễn dịch cơ thể suy yếu, bệnh tật phát sinh [86].

Tỳ chủ vận hóa, là nguồn sinh hóa khí huyết, là gốc của hậu thiên, vạn vật chi mẫu. Sự sinh thành của vệ khí, sung túc của nguyên khí, cường nhược của chính khí đều dựa vào sự cung dưỡng của Tỳ Vị. "Linh khu – Ngũ long tân dịch biệt" viết: "Tỳ vi chi vệ". Vệ khí từ đồ ăn thức uống chuyển thành, tính nó nhanh nhẹn, tuần hành khắp nơi, là hàng rào bảo vệ của cơ thể chống lại ngoại tà. "Linh khu – Bản tạng" có viết: "Vệ khí có nguồn gốc từ tinh vi thủy cốc do Tỳ Vị vận hóa, điều lý bì phu, tấu lý". Tỳ khí kiện vận, hóa nguyên sung túc, khí huyết vượng thịnh, tạng phủ hình thể tứ chi cân cốt được nuôi dưỡng, chính khí sung thịnh, có khả năng chống lại bệnh tật. Ngược lại, Tỳ hư vận hóa thất thường, khí huyết hư suy, tạng phủ hình thể tứ chi thất dưỡng, chính khí suy giảm, dễ mắc bệnh tật [86].

Huyết là chất dịch màu đỏ chảy trong lòng mạch, là cơ sở vật chất chủ yếu cho hoạt động sống của con người. "Tố vấn – Kinh mạch biệt luận" viết: "Ẩm nhập ở Vị, tràn đầy tinh khí, vận chuyển đến Tỳ, Tỳ khí tán tinh, bên trên quy về Phế thông điều thủy đạo, bên dưới chuyển đến bàng quang, thủy tinh phân bố ra bốn phía và kinh mạch". Sự tăng trưởng và phát triển của các cơ quan miễn dịch, các tế bào miễn dịch và các phân tử miễn dịch đều phụ thuộc vào sự duy trì của máu. Máu là cơ sở vật chất quan trọng cho sự phát triển và trưởng thành của các tế bào miễn dịch, mà máu chủ yếu đến từ "Tỳ". Vì vậy, công năng hoạt động bình thường của Tỳ là điều kiện tiên quyết cho các tế bào miễn dịch hoạt động [87].

Các học giả hiện đại đã thực hiện một số lượng lớn nghiên cứu về "Tỳ hư chứng" bằng cách sử dụng các phương pháp và phương tiện miễn dịch học, phát hiện ra rằng: Sự xuất hiện của "Tỳ hư chứng" có liên quan đến miễn dịch không đặc hiệu, miễn dịch dịch thể, miễn dịch tế bào, miễn dịch phân tử và miễn dịch di truyền… Khi Tỳ hư, tỷ lệ tế bào T và tế bào T hỗ trợ trong máu

ngoại vi thấp hơn hẳn so với bình thường, trong khi tế bào T ức chế không thay đổi nhiều hoặc tăng tương đối, tỷ lệ CD4+/CD8+ bất thường, chỉ số RBC-C3bR giảm, hàm lượng sTgA trong nước bọt thấp hơn bình thường, quá trình thực bào của đại thực bào giảm, số lượng và chức năng của các tế bào như bạch cầu ái toan giảm... [86] Trong thực hành lâm sàng, phương pháp kiện Tỳ và các bài thuốc kiện Tỳ đều có thể cải thiện đáng kể chức năng miễn dịch của cơ thể. Bài thuốc "Tứ quân tử thang" được sử dụng điều trị những bệnh nhân Tỷ hư, quan sát chức năng miễn dịch trước và sau điều trị. Kết quả cho thấy, "Tứ quân tử thang" làm giảm mức độ phức hợp miễn dịch tuần hoàn (CIC), tăng tốc độ chuyển đổi tế bào lyympho, tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) và các phân nhóm lympho T CD3+, CD4+/CD8+, CD8+ đều trở lại bình thường hoặc gần bình thường, chỉ số thực bào của bạch cầu trung tính tăng lên. Như vậy, bài thuốc "Tứ quân tử thang" với tác dụng bổ khí, kiện Tỳ có cải thiện đáng kể chức năng miễn dịch của cơ thể, đặc biệt là miễn dịch tế bào [86].

Bột EFCOVIDA với công dụng kiện tỳ ích khí, bổ hòa trợ dương giúp nâng cao chính khí, nên bột EFCOVIDA có tác dụng tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu về tác dụng tăng cường miễn dịch của các vị thuốc có trong chế phẩm này thuộc nhóm thuốc bổ khí, huyết, âm, dương của YHCT.

Fullerenes được phát hiện năm 1985 bởi Harold Kroto thuộc Đại học Sussex, làm việc với James R. Heath, Sean O'Brien, Robert Curl và Richard Smalley từ Đại học Rice, Fullerenes trong tàn dư than chì (Graphite) được tạo ra bằng cách bốc hơi carbon trong bầu khí quyển helium; Fullerene đã được nghiên cứu để sử dụng thuốc tiềm năng: liên kết kháng sinh đặc hiệu với cấu trúc để nhắm mục tiêu vi khuẩn kháng thuốc và thậm chí nhắm mục tiêu một số tế bào ung thư như khối u ác tính [36].

Nano Curcumine: dạng bào chế của tinh chất Curcuminoid từ Nghệ theo công nghệ Nano hiện đại. Kích thước: từ 10 – 200 nm giúp *nanocurcumin* xâm

nhập tốt, tập trung nhiều quanh nhân và ức chế sự phát triển của cả 3 dòng tế bào dòng tế bào ung thư vú (MCF7), phổi (H1299) và đại trực tràng (HCT116) ngay tại nồng độ thấp [38],[39]. Diện tích bề mặt: tương đối lớn, làm tăng tốc độ hấp thu và khả năng hòa tan trong nước, tăng sinh khả dụng của *curcumin*. Vì vậy, ứng dụng trong y học và lâm sàng với tác dụng chống viêm, ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn,....[40].

Cam thảo vị ngọt, tính bình, quy Tâm, Phế, Tỳ, Vị kinh và thông 12 kinh, có tác dụng bổ Tỳ ích khí, thanh nhiệt giải độc, khứ đàm chỉ khái, hoãn cấp chỉ thống, điều hòa các vị thuốc. Cảm thảo thường dùng trong các trường hợp Tỳ Vị hư nhược, mệt mỏi vô lực, Tâm quý khí đoản, khái thấu nhiều đàm, quản phúc, tứ chi cấp thống, ung nhọt sưng đau, giải độc và hòa hoãn dược tính của các vị thuốc. Đào Hoằng Cảnh gọi Cam thảo là "Quốc lão" vì "thử thảo tối vi chúng dược chi vương, kinh phương thiểu hữu bất dụng giả" (đây là vua của các loại dược liệu, các bài thuốc kinh điển ít ai không dùng đến nó). Lý Thời Trân trong "Bản thảo cương mục" có viết: "Trong các loại dược liệu thì Cam thảo là quân, trị 12 loại độc nhũ thạch, giải 1200 loại độc thảo dược, điều hòa dược tính của nhiều loại thuốc. Vì vậy, Cam thảo được mệnh danh là Quốc lão" [88]. Acid glycyrrhizic là thành phần chính trong Cam thảo, có tác dụng kháng virus đáng kể. Acid glycyrrhizic có thể làm giảm đáng kể tình trạng nhiễm mỡ, hoại tử tế bào gan, ức chế sự tăng sinh xơ của gan và thúc đẩy quá trình tái tạo tế bào gan..., ít tác dụng phụ, nên là thuốc đang được quan tâm trong điều trị viêm gan B. Trong nghiên cứu về dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan người PLC/RRF/S biểu hiện kháng nguyên bề mặt viêm gan B, người ta phát hiện rằng acid glycyrrhizic có thể ức chế sự tiết 1-IbsAg ngoại bào, ức chế sự biểu hiện của T-msAg, từ đó ức chế quá trình hủy hoại tế bào gan, cải thiện chức năng gan ở bệnh nhân viêm gan B mạn tính, tăng cường và cải thiện khả năng ức chế HbsAg và tình trạng miễn dịch của I-IBV [89], [90]. Các nghiên cứu cho thấy Acid glycyrrhizic có ảnh hưởng đến hoạt động điều hòa miễn dịch của

cơ thể. Tổng số lượng bạch cầu tăng lên gấp 5 lần sau khi tiêm Acid glycyrrhizic vào màng bụng chuột. Các tế bào tủy xương và các tế bào dương tính với α-esterase cũng tăng lên sau khi sử dụng acid glycyrrhizic. Sự tương tác giữa acid glycyrrhizic và kháng nguyên có thể làm tăng hiệu giá của các kháng thể đặc hiệu, đồng thời ức chế đáng kể quá mẫn chậm (DTH) [91]. Thông qua thử nghiệm nuôi cấy tế bào lympho lách trong ống nghiệm thấy rằng polysaccharides trong cam thảo có thể tăng cường đáng kể mức độ chuyển hóa của tế bào lympho và bài tiết IL-2 ($p<0,01$). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, các chiết xuất khác nhau của Cam thảo, đặc biệt là flavonoid có hoạt tính chống oxy hóa [92], [93], hoạt tính chống viêm [94], [95], hoạt tính kháng khuẩn [96], [97], diệt virus và hoạt tính kháng u, ức chế nhiều loại tế bào ung thư [98], [99], [100]. Gần đây, một số nghiên cứu đã phát hiện Flavonoid trong Cam thảo có tác dụng kháng u thông qua kích hoạt các đại thực bào [98], ức chế con đường dẫn truyền tín hiệu MAPK và Akt [101], ức chế quá trình phosphoryl hóa NF-KB và Erk1/2 [102], làm tăng quá trình tự chết theo chương trình của các tế bào [103].

Nhục quế tân, cam đại nhiệt, quy Thận, Tỳ, Tâm, Can kinh, tác dụng bổ hỏa trợ dương, tán hàn chỉ thống, ôn kinh thông mạch, dẫn hỏa quy nguyên, dùng trong các chứng dương nuy, cung lãnh, phúc thống, hàn bệnh, hung tý... "Bản kinh phong nguyên" viết: "Ích hỏa tiêu âm, đại bổ dương khí hạ tiêu hỏa bất túc, tính nó hạ hành dẫn hỏa quy nguyên". Ở một mức độ nào đó, phản ứng viêm có thể được coi là một dạng hoặc một phần của phản ứng miễn dịch, đồng thời, viêm mạn tính cũng là yếu tố nguy cơ cao làm xuất hiện nhiều khối u ác tính. Cinnamaldehyde trong Nhục quế có tác dụng tiêu diệt, ức chế hoặc gây độc tế bào rõ ràng đối với nhiều loại tế bào khối u in vivo và in vitro, chẳng hạn như: ung thư cổ tử cung, ung thư vú, bệnh bạch cầu, ung thư buồng trứng, ung thư phổi... [104] Muhammad và cộng sự phát hiện rằng Cinnamaldehyde có tác dụng chống viêm thông qua ức chế con đường NF – kappa B do

Helicobacter pylori gây ra và được sử dụng cho các bệnh về dạ dày liên quan đến vi khuẩn này gây ra thông qua các nghiên cứu lâm sàng và in vivo [105]. Nước sắc Nhục quế có thể kích hoạt biểu hiện của IFN – γ trong tế bào T mà không làm thay đổi quá trình sản xuất IL-2 và ức chế biểu hiện của p38, JNK ERK1/2, STAT4, do đó Nhục quế có thể được sử dụng để điều hòa miễn dịch trong các bệnh nhiễm trùng [106]. Akber và cộng sự đã chỉ ra rằng dẫn xuất acid 4-hydroxycinnamic 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde (4H3MC) ức chế đáng kể hoạt động của PKC kinase và quá trình phosphoryl hóa của PKC trong tế bào T để giảm sản xuất các khối u ác tính [107]. Assadollahi và cộng sự đã phát hiện ra chiết xuất của nước sắc Nhục quế có thể ức chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy cấp tính HL-60, cơ chế liên quan đến sự dừng lại của pha G1 trong chu kỳ tế bào [108]. Aldehyd là thành phần chính trong tinh dầu quế, phần trăm khối lượng của aldehyd trên 60%. Aldehyd có tính khử tốt, là cơ sở cho hoạt tính chống oxy hóa của tinh dầu quế. Đơn Vượng và cộng sự phát hiện ra rằng acid hydroxycinnamic và các dẫn xuất của nó của tinh dầu quế trong việc loại bỏ các gốc tự do DPPH cao hơn nhiều so với hoạt tính của BHT nhóm chứng dương [109], [110].

Sinh khương tân, ôn, có tác dụng giải biểu tán hàn, ôn trung chỉ nôn, hành thủy giải độc, hóa đàm chỉ khái. Lưu Huy báo cáo rằng, chiết xuất rượu gừng làm tăng đáng kể TLLTĐ và TLTƯTĐ, tăng tỷ lệ thực bào của đại thực bào, tăng tỷ lệ dương tính của α-naphthyl acetate (α-ANAE+) và IgM, tăng cường chức năng chuyển đổi của tế bào lympho T trên mô hình chuột mang khối u Hep A. Sinh khương có thể cải thiện tình trạng suy giảm miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu của động vật mang khối u gây ra, đồng thời có tác dụng ngăn ngừa và điều trị khối u [111].

Nấm đông trùng *(Cordyceps militaris)* được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa, chống ung thư, hạ đường huyết, tác dụng khác virus [54], [55], [56], [59]. Bảo vệ và điều hòa miễn dịch là một trong những tác dụng sinh học

quan trong của nấm C.militaris. Nghiên cứu của Nghê Quốc Siêu cho thấy Nấm đông trùng làm tăng đáng kể TLLTĐ ($p<0,01$), tăng tỷ lệ thực bào của đại thực bào phúc mạc ($p<0,01$), tăng nồng độ IgM huyết thanh, tăng tốc độ hình thành E-rosette của tế bào lympho T ở chuột [112]. Polypeptide trong C.militaris có thể điều chỉnh khả năng miễn dịch thông qua việc điều chỉnh gen Hist1h2bp, Ctsg và Elane ở chuột [59].

Phối hợp 6 vị thuốc trên tạo thành chế phẩm EFCOVIDA có tác dụng kiện tỳ ích khí, trợ dương và nghiên cứu này cũng đóng góp một phần việc chứng minh tác dụng tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể.

KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu tác dụng điều biến miễn dịch của bột EFCOVIDA trên động vật thực nghiệm. Nhóm nghiên cứu rút ra kết luận:

1. **Kết luận tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch không đặc hiệu**:

- Bột EFCOVIDA liều 60 mg/kg trên chuột nhắt trắng có xu hướng làm tăng trọng lượng lách tương đối so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (p>0,05).
- Bột EFCOVIDA liều 120 mg/kg trên chuột nhắt trắng có xu hướng làm tăng trọng lượng tuyến ức tương đối so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (p>0,05).
- Bột EFCOVIDA cả hai liều đều giúp cải thiện tổn thương lách và tuyến ức gây ra do Cyclophosphamid so với lô mô hình.
- Bột EFCOVIDA cả hai liều 60mg/kg và liều 120mg/kg không làm thay đổi số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu trong máu ngoại vi.

Trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu, bột EFCOVIDA có tác dụng tương đương với lô chứng dương dùng levamisol.

2. **Kết luận tác dụng của bột EFCOVIDA trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu**:

- Bột EFCOVIDA liều 120 mg/kg trên chuột nhắt trắng làm tăng nồng độ IL-4 trong máu ngoại vi so với lô mô hình, có ý nghĩa thống kê (p<0,05). Bột EFCOVIDA liều cao có tác dụng làm tăng nồng độ IL-4 trong máu ngoại vi rõ rệt và tác dụng tốt hơn lô chứng dương dùng levamisol.
- Bột EFCOVIDA liều 60 mg/kg làm tăng nồng độ TNF-α trong máu ngoại vi so với lô mô hình, có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Bột EFCOVIDA liều thấp có tác dụng làm tăng nồng độ TNF-α trong máu ngoại vi rõ rệt và tác dụng tốt hơn lô chứng dương dùng levamisol .

- Bột EFCOVIDA cả hai liều 60mg/kg và liều 120mg/kg có xu hướng làm tăng nồng độ IL-6 trong máu ngoại vi so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (p>0,05).
- Bột EFCOVIDA ở cả 2 liều 60 mg/kg và liều 120mg/kg không làm thay đổi nồng độ IFN-γ, nồng độ IgG trong máu ngoại vi so với lô mô hình, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

Trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu, bột EFCOVIDA liều 120 mg/kg trên chuột nhắt trắng làm tăng nồng độ IL-4, liều 60 mg/kg làm tăng nồng độ TNF-α trong máu ngoại vi, hai tác dụng này tốt hơn lô chứng dương dùng levamisol. Trên các chỉ số miễn dịch đặc hiệu còn lại, bột EFCOVIDA ở cả 2 liều 60 mg/kg và liều 120mg/kg có xu hướng điều chỉnh các chỉ số theo chiều hướng tốt lên, tuy nhiên sự khác biệt so với lô mô hình chưa có ý nghĩa thống kê với p> 0,05.

KIẾN NGHỊ

- Dựa trên kết quả thu thập được trên đề tài của chúng tôi kèm theo kết quả nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn của một nhánh đề tài khác, chúng tôi kiến nghị sử dụng Bột EFCOVIDA trên lâm sàng sau khi được thông qua Hội đồng y đức để đánh giá tác dụng điều biến miễn dịch của Bột EFCOVIDA trên bệnh nhân.
- Nghiên cứu dạng bào chế phù hợp để đưa vào sử dụng, thuận tiện trên lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bộ môn Miễn dịch- Sinh lý bệnh** (2014), *Miễn dịch học*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, tr. 16-17.
2. **De Tommasi et al** (2000), *Miễn dịch thiết yếu*, *Bản dịch của Roitt I.M*, Trường Đại học Y Hà Nội, tr. 102-104.
3. **Đào Văn Chinh, Nguyễn Quốc Tuấn, Phạm Vân Thức** (2002). *Miễn dịch học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, tr. 49-50
4. **Bộ môn Dược lý** (2020), *Dược lý học*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, tr. 135, 178, 189-190.
5. **Phạm Thị Vân Anh** (2011), Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch và chống oxy hóa của cao quả nhàu trên động vật thực nghiệm, Luận án tiến sĩ Y học, Trường đại học Y Hà Nội.
6. **Hoàng Thị Lề, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông, Phan Thị Thu Anh** (2011), "Tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch của bài thuốc "đại thiên nương" ở chuột nhắt trắng trên mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid (cy)", *Tạp chí nghiên cứu y học*, số 4(75), tr. 12-17.
7. **Nguyễn Duy Cương** (2021), 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, Học viện Y – Dược học cổ truyền Việt Nam.
8. **Phan Thị Phi Phi** (2015), *Miễn dịch học đại cương,* Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam, tr. 109-111.
9. **Fabregat I., Fernando J., Mainez J. và cộng sự.** (2014). TGF-beta signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des*, 20(17), 2934–2947.
10. **Mai Văn Điển** (2009), *Miễn dịch học.* Nhà xuất bản Y học, tr. 45,56
11. **Bành Văn Khừu, Đặng Quốc Khánh** (2002), *Những học thuyết cơ bản của Y học cổ truyền*, Nhà xuất bản Hà Nội, tr. 16, 24, 249 – 251.

12. **Nguyễn Bá Tĩnh** (2007), *Tuệ Tĩnh toàn tập*, Nhà xuất bản Y học, tr.20.
13. **Trường đại học Y Hà Nội, Khoa Y học cổ truyền** (2012), *Bài giảng Y học cổ truyền,* tập 1, Nhà xuất bản y học, tr.43 – 46.
14. **Trường đại học Y Hà Nội, Khoa Y học cổ truyền** (2006), *Chuyên đề nội khoa Y học cổ truyền,* Nhà xuất bản Y học, tr. 547 – 564.
15. **Hải Thượng Lãn Ông Lê Hữu Trác** (2008), *Hải Thượng y tông tâm lĩnh*, tập 2, Nhà xuất bản y học, tr. 20.
16. **Trường đại học Y Hà Nội, Khoa Y học cổ truyền** (2006), *Nội kinh*, Nhà xuất bản Y học, tr. 133-135.
17. **Hứa Kế Bình, Cầu Duy Diệm** (1988). Nghiên cứu thời gian sống thêm trên bệnh nhân ưng 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.
18. **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.
19. **Rao X. Q., Yu R. C., Zhang J H.** (1991), "Sheng xue tang on immunological functions of cancer patients with spleen – deficiency syndrome", *Zhong Xi Yi He Jie He Za Zhi*, 11(4), pp.218 – 219, 197.
20. **Nguyễn Xuân Phách, Lê Bảo Toàn, Lê Văn Thảo** (1993), "Thăm dò tác dụng của tảo Spirullina strên bệnh nhân ung thư được điều trị bằng tia xạ", *Tạp chí y học Việt Nam*, số 7, tr. 144-147.
21. **Kuo Y.H and Kuo L.M.** (1997). Antitumour and anti – AIDS triterpenes from Celastrus hindsii. *Phytochemistry*, 44(7), 1275 – 1281.
22. **Toh D-F, Patel D, Chan E et.at.** (2011). Anti – proliferative efects of raw and steamed extracts of Panax notogingseng and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells. *Chin Med*, 6(1),4.
23. **Mishra J, Rajput R, Singh K, et al** (2019). Antioxidant – Rich Peptide Fractions Derived from Hight-Altitude Chinese Caterpillar

Medicinal Mushroom Ophiocordyceps sinensis (Ascomycetes) Inhibit Bacterial Pathogens. *Int J Med Mushrooms*, 21(2), 155-168.

24. **Phạm Huy Quyến** (1996). *Tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ cây nhàu trên súc vật thí nghiệm.* Trường Đại học Y Hà Nội, tr. 107.
25. **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, tr. 47-49.
26. **Đỗ Quốc Việt** (2000). *Nghiên cứu các hợp chất anthraquinon trong cây nhàu Việt Nam.* Viện hóa học Hà Nội, tr. 133-137.
27. Phan Anh Tuấn (2006), " Đánh giá tác dụng phục hồi thương tổn hệ miễn dịch sau chiếu xạ của "đông trùng hạ thảo - sâu chít (brihaspa atrostigmella moore 1868)" giai đoạn thực nghiệm", Luận án tiến sĩ, Trường Đại học y Hà Nội, tr.48 - 54
28. **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, tr. 99-102.
29. **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, tr. 88-93.
30. **Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông** (2020). Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Tập 491 tháng 6 số 1,tr. 261-266.
31. **Nguyễn Thị Vinh Hà, Phạm Huy Quyến, Phan Thị Phi Phi** (1994), "Về mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm", *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học*, Đại học Y Hà Nội, (5), tr. 16-17.

32. **Phạm Thị Vân Anh** (2009), " Suy giảm miễn dịch ở người và phương pháp nghiên cứu suy giảm miễn dịch thực nghiệm", chuyên đề tiến sỹ, trường Đại Học y Hà Nội, tr. 48.
33. **Bộ môn Y học hạt nhân** (2000), *Bài giảng y học hạt nhân*, Trường đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, tr. 155-156.
34. **Phan Thị Phi Phi, Nguyễn Thanh Đạm** (1982), "Tác dụng tổn thương miễn dịch trong chiếu tia", Chuyên san phóng xạ bệnh viện Chợ Rẫy, tr. 97-98.
35. **Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., & Prato, M**. (2003). Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *European journal of medicinal chemistry*, *38*(11-12), 913-923.
36. https://www.postposmo.com/vi/fullerene/
37. **Adhimoolam Karthikeyan, Natesan Senthil, Taesun Min** (2020). "Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications", *Frontiers in pharmacology*, 11, 487-487.
38. **Chen, Y., Lu, Y., Lee, R. J., & Xiang, G.** (2020). Nano encapsulated curcumin: and its potential for biomedical applications. International Journal of Nanomedicine, 15, 3099.
39. **A Mullaicharam, A Maheswaran** (2012). "Pharmacological effects of curcumin", *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2(2), 92-99.
40. **Fakhri, S., Moradi, S. Z., Ash-Rafzadeh, A., & Bishayee, A**. (2021). Targeting cellular senescence in cancer by plant secondary metabolites: A systematic review. Pharmacological research, 105961.
41. **M. Gera, N. Sharma, M. Ghosh, et al.** (2017). "Nanoformulations of curcumin: an emerging paradigm for improved remedial application", *Oncotarget*, 8(39), 66680-66698.

42. **Vietnam Journal of Science** (2016). Curcumin - "Thần dược" từ phương Đông, http://www.vjsonline.org/news/1472347266, accessed 26-11-2020.
43. **Abhijeet Alok, Indra Deo Singh, Shivani Singh, et al.** (2015). "Curcumin - Pharmacological Actions And its Role in Oral Submucous Fibrosis: A Review", *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 9(10), ZE01-ZE3.
44. **Matthew C. Fadus, Cecilia Lau, Jai Bikhchandani, et al.** (2017). "Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(3), 339-346.
45. **R. S. Mulik, J. Mönkkönen, R. O. Juvonen, et al.** (2010). "Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: enhanced in vitro anticancer activity by induction of apoptosis", *Int J Pharm*, 398(1-2), 190-203.
46. **Varisa Pongrakananon, Yon Rojanasakul** (2011). "Anticancer Properties of Curcumin", 25(4), 203-2.
47. **Đỗ Tất Lợi** (2016). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản y học, tr. 235-237, 278, 356, 472.
48. **Bộ Y tế** (2018). *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 1095 – 1096, 1179, 1296 – 1297.
49. **Bộ Y tế** (2015). Dược liệu học, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tập 1, tr. 215 – 223.
50. **Bộ Y tế** (2015). Dược liệu học, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tập 2, tr. 223 – 225, 235 - 237.
51. **Bộ Y tế** (2006). *Kĩ thuật bào chế và sinh dược học các dạng thuốc NXB Y học*, Hà Nội, tr. 178-180.
52. **H. Hur** (2008). "Chemical Ingredients of Cordyceps militaris", *Mycobiology*, 36(4), 233-5.

53. **Nguyễn Thị Liên Thương, Trịnh Diệp Phương Danh, Nguyễn Văn Hiệp** (2016). Nấm đông trùng hạ thảo Cordyceps militaris: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi nấm, *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ*, tr. 9-22.

54. **P. Marsup, K. Yeerong, W. Neimkhum, et al.** (2020). "Enhancement of Chemical Stability and Dermal Delivery of Cordyceps militaris Extracts by Nanoemulsion", *Nanomaterials (Basel)*, 10(8).

55. **Y. X. Gu, Y. W. Song, L. Q. Fan, et al.** (2007). "Antioxidant activity of natural and cultured Cordyceps sp]", *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 32(11), 1028-31.

56. **So Young Yoon, Soo Jung Park, Yoon Jung Park** (2018). "The Anticancer Properties of Cordycepin and Their Underlying Mechanisms", *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3027.

57. **F. R. Smiderle, C. H. Baggio, D. G. Borato, et al.** (2014). "Anti-inflammatory properties of the medicinal mushroom Cordyceps militaris might be related to its linear (1→3)-β-D-glucan", *PLoS One*, 9(10), e110266.

58. **Guangyu Xu, Guangxin Yuan, Liping An, et al.** (2018). "Immunomodulatory mechanism of Cordyceps militaris polypeptide through regulating gene Hist1h2bp, Ctsg, and elane in mice", *Pharmacognosy Magazine*, 14, 404.

59. **Hwan Hee Lee, Heejin Park, Gi-Ho Sung, et al.** (2014). "Anti-influenza effect of Cordyceps militaris through immunomodulation in a DBA/2 mouse model", *Journal of Microbiology*, 52(8), 696-701.

60. **Đỗ Trung Đàm** (2006), Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật. *Tạp chí dược học*, số 479, tr. 38-41.

61. **Kynina E.S., Dziubak S.T., Vitvitskiĭ V.M. và cộng sự** (1991). Immunomodulating effect of levamisole in antibiotic therapy. *Antibiot Khimioterapiia Antibiot Chemoterapy Sic*, 36(1), 26–28

62. **Bristish National Formulatoiy** (2008). Immunological products and vaccines. *BMJ Grong RPS Publ*, 56, 651–674.
63. **Bộ y tế** (2015), Quyết định ban hành tài liệu chuyên môn *"Hướng dẫn sử dụng tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu"*, số 141/QĐ K2ĐT Hà Nội ngày 27 tháng 10 năm 2015.
64. **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.
65. **Vũ Triệu An** (2001), Miễn dịch học, *Nhà xuất bản Y học*, Hà Nội.
66. **Hussain A, Shadma W, Maksood A, et al** (2013). Protective effects of Picrorhiza kurroa on cyclophosphamide-induced mmunosuppression in mice. *Pharmacognosy Res*, 5(1), 30-35.
67. **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.
68. **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
69. **Nguyễn Văn Rư 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.
70. **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.
71. **Goodman and Gilman** (2010), The pharmacological basis of therapeutics, twelfth edition, McGraw-Hill Companies, Inc
72. **Đào Văn Phan** (2012), Dược lý học lâm sàng, Trường Đại học Y Hà Nội, *Nhà xuất bản Y học*, Hà Nội.

73. **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.
74. **Gupta M** (2016). Levamisole: A multi-faceted drug in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 82(2), 230-236
75. **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
76. **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.
77. *Bộ Y tế* (2015), Dược thư quốc gia, Hội đồng Dược điển Việt Nam, *Nhà xuất bản Y học*, Hà Nội, 473-476.
78. **Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, et al** (2015), Rang and Dale‟s pharmacology, eighth edition, Elsiver, UK.
79. **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.
80. **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
81. **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.
82. **Katzung GB** (2011), Basic and Clinical Pharmacology, twelfth edition, McGraw-Hill Companies, Inc.

83. **Ohtani T, Nakamura T, Toda K, et al** (2006). Cyclophosphamide enhances TNF-a-induced apoptotic cell death in murine vascular endothelial cell. *FEBS Lett*, 580(6), 1597-600.

84. **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.

85. **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

86. **陈芳伶** (2011), 中医免疫学的构建, 博士, 山东中医药大学.

Trần Phương Linh (2011), Xây dựng Miễn dịch học Y học cổ truyền, Luận văn Tiến sĩ, Đại học Trung y dược Sơn Tây.

87. **许剑 và 陈耀凯** (2020). 从中医“脾系”与“免疫”的相关性探讨艾滋病论治. 中国艾滋病性病, **26**(**10**), 1129–1131.

Hứa Kiếm và Diệu Khải (2020). Thảo luận về điều trị AIDS từ mối tương quan giữa "Tỳ hệ" và "Miễn dịch" trong Y học cổ truyền. *AIDS ở Trung Quốc*, **26**(**10**), 1129–1131.

88. **郭传杰** (2021), 巴豆配伍甘草治疗急性髓系白血病的增效减毒作用机制研究, 博士, 成都中医药大学.

Quách Truyền Kiệt (2021), Nghiên cứu cơ chế hiệp đồng, tác dụng giảm độc của Ba đậu kết hợp với Cam thảo trong điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, Luận văn Tiến sĩ, Đại học Trung y dược Thành Đô.

89. **姜雪, 孙森凤, 王悦** và cộng sự. (2017). 甘草药理作用研究进展. 化工时刊, **31**(**07**), 25–28.

Mỹ Tuyết, Tôn Sâm Phượng, Vương Duyệt và cộng sự. (2017). Sự phát triển trong nghiên cứu tác dụng dược lý của Cam thảo. Hóa công thời san, **31**(**07**), 25–28.

90. **Romero M.R., Efferth T., Serrano M.A.** và cộng sự**.** (2005). Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an “in vitro” replicative system. *Antiviral Res*, **68**(**2**), 75–83.

91. **Raphael T.J. và Kuttan G.** (2003). Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*, **10**(**6–7**), 483–489.

92. **Biondi D.M., Rocco C., và Ruberto G.** (2003). New dihydrostilbene derivatives from the leaves of Glycyrrhiza glabra and evaluation of their antioxidant activity. *J Nat Prod*, **66**(**4**), 477–480.

93. **Wang Y., Zhang X., Ma X.** và cộng sự**.** (2019). Study on the kinetic model, thermodynamic and physicochemical properties of Glycyrrhiza polysaccharide by ultrasonic assisted extraction. *Ultrason Sonochem*, **51**, 249–257.

94. **Liu K., Pi F., Zhang H.** và cộng sự. (2017). Metabolomics Analysis To Evaluate the Anti-Inflammatory Effects of Polyphenols: Glabridin Reversed Metabolism Change Caused by LPS in RAW 264.7 Cells. *J Agric Food Chem*, **65**(**29**), 6070–6079.

95. **Guo W., Liu B., Yin Y.** và cộng sự. (2019). Licochalcone A Protects the Blood-Milk Barrier Integrity and Relieves the Inflammatory Response in LPS-Induced Mastitis. *Front Immunol*, **10**, 287.

96. **Singh V., Pal A., và Darokar M.P**. (2015). A polyphenolic flavonoid glabridin: Oxidative stress response in multidrug-resistant Staphylococcus aureus. *Free Radic Biol Med*, **87**, 48–57.

97. **Wang L., Yang R., Yuan B.** và cộng sự. (2015). The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. *Acta Pharm Sin B*, **5**(**4**), 310–315.

98. **王兵, 王亚新, 赵红燕** và cộng sự. (2013). 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展. 吉林医药学院学报, **34**(**03**), 215–218.

Vương Binh, Vương Nghiệp Tân, Triệu Hồng Yên và cộng sự. (2013). Sự phát triển trong nghiên cứu tác dụng dược lý của các thành phần chủ yếu trong Cam thảo. Tạp chí Học viện Y tế Cát Lâm, **34**(**03**), 215–218.

99. **Hsieh M.-J., Chen M.-K., Chen C.-J.** và cộng sự. (2016). Glabridin induces apoptosis and autophagy through JNK1/2 pathway in human hepatoma cells. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*, **23**(**4**), 359–366.

100. **Yu S.-J., Cho I.-A., Kang K.-R.** và cộng sự. (2017). Licochalcone-E induces caspase-dependent death of human pharyngeal squamous carcinoma cells through the extrinsic and intrinsic apoptotic signaling pathways. *Oncol Lett*, **13**(**5**), 3662–3668.

101. **Huang W.-C., Su H.-H., Fang L.-W. và cộng sự.** (2019). Licochalcone A Inhibits Cellular Motility by Suppressing E-cadherin and MAPK Signaling in Breast Cancer. *Cells*, **8**(**3**), 218.

102. **Hsieh M.-J., Lin C.-W., Yang S.-F. và cộng sự.** (2014). Glabridin inhibits migration and invasion by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 through modulation of NF-κB and AP-1 activity in human liver cancer cells. *Br J Pharmacol*, **171**(**12**), 3037–3050.

103. **Kwon S.J., Park S.Y., Kwon G.T. và cộng sự.** (2013). Licochalcone E present in licorice suppresses lung metastasis in the 4T1 mammary orthotopic cancer model. *Cancer Prev Res Phila Pa*, **6**(**6**), 603–613.

104. **邓淑蓉 và 潘宇政** (2018). 肉桂主要化学成分及药理作用研究概况. 现代中西医结合杂志, **27**(**04**), 448–451.

Đặng Thục Dung và Phan Vũ Chính (2018). Tổng quan nghiên cứu về thành phần hóa học chính và tác dụng dược lý của Nhục quế. Tạp chí về sự kết hợp Y học cổ truyền và Y học hiện đại, **27**(**04**), 448–451.

105. **Muhammad J.S., Zaidi S.F., Shaharyar S. và cộng sự**. (2015). Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde in Helicobacter pylori induced gastric inflammation. *Biol Pharm Bull*, **38**(**1**), 109–115.
106. **Lee B.-J., Kim Y.-J., Cho D.-H.** và cộng sự. (2011). Immunomodulatory effect of water extract of cinnamon on anti-CD3-induced cytokine responses and p38, JNK, ERK1/2, and STAT4 activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **33**(**4**), 714–722.
107. **Akber U., Na B.-R., Ko Y.-S.** và cộng sự. (2015). Phytocomponent 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde ablates T-cell activation by targeting protein kinase C-θ and its downstream pathways. *Int Immunopharmacol*, **25**(**1**), 130–140.
108. **Assadollahi V., Parivar K., Roudbari N.H.** và cộng sự. (2013). The effect of aqueous cinnamon extract on the apoptotic process in acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Adv Biomed Res*, **2**, 25.
109. **曾艳霞, 朱霞石, 陈丽** và cộng sự. (2021). 桂枝及其配伍药的化学成分及生物活性研究进展. 安徽农业科学, **49**(**21**), 3–6.

    Tăng Diệm Hà, Chu Hà Thạch, Trần Lệ và cộng sự. (2021). Sự phát triển trong nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của Quế chi và các vị thuốc phối hợp. Khoa học Nông nghiệp An Huy, **49**(**21**), 3–6.
110. **张艳 và 仝其根** (2012). 桂皮精油的提取及其化学成分的 GC-MS 分析. 中国农学通报, **28**(**09**), 264–269.

    Trương Diệm và Đồng Kỳ Căn (2012). Chiết xuất tinh dầu quế và phân tích GC-MS về thành phần hóa học của nó. Bản tin nông nghiệp Trung Quốc, **28**(**09**), 264–269.

111. **张淑娟, 张育贵, 辛二旦 và cộng sự**. (2020). 生姜药理作用研究进展. 甘肃中医药大学学报, **37**(**06**), 79–81.

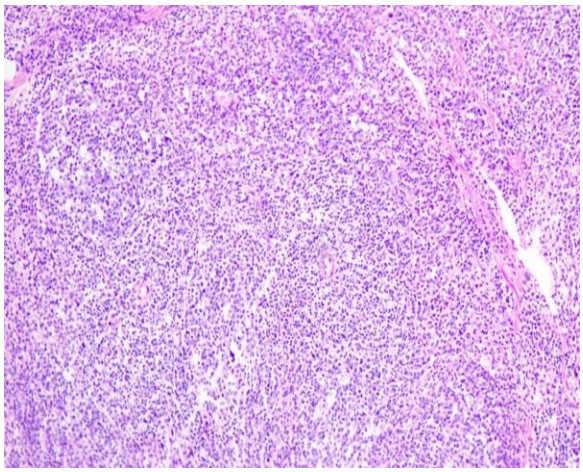
Trương Thục Quyên, Trương Dục Quý, Tân Nhị Đán và cộng sự. (2020). Sự phát triển trong nghiên cứu tác dụng dược lý của Sinh khương. Tạp chí Đại học Trung y dược Cam Túc, **37**(**06**), 79–81.

112. **倪国超** (2009), 虫草菌质对小鼠免疫功能、抗氧化能力和运动能力影响的研究, 硕士, 西南大学.

Nghê Quốc Siêu (2009), Nghiên cứu tác dụng của Nấm đông trùng đối với chức năng miễn dịch, khả năng chống oxy hóa và khả năng tập vận động của chuột, Luận văn Thạc sĩ, Đại học Tây Nam.

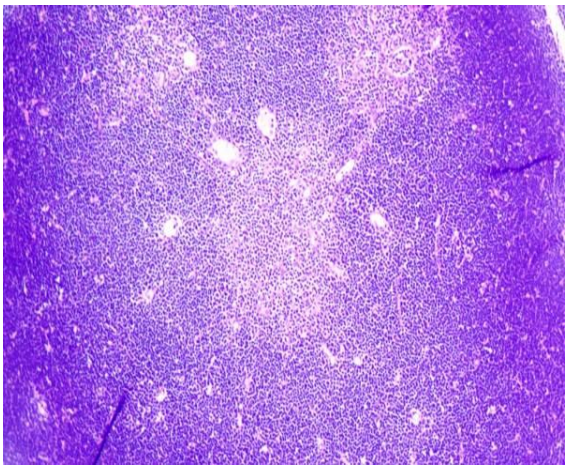
PHỤ LỤC 1

KẾT QUẢ GIẢI PHẪU BỆNH LÁCH VÀ TUYẾN ỨC CỦA CHUỘT



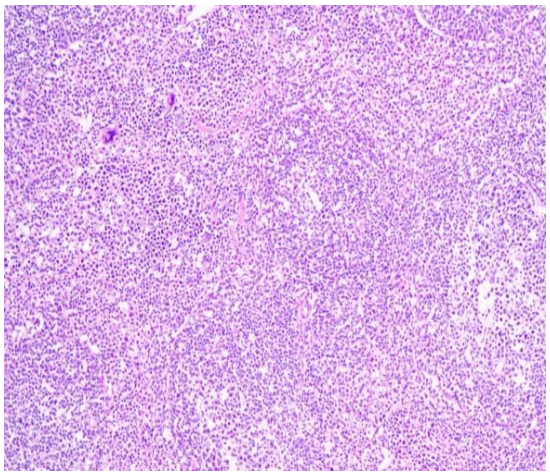
<u>Ảnh 1</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học (chuột số 4) (HE × 20)

Lách bình thường



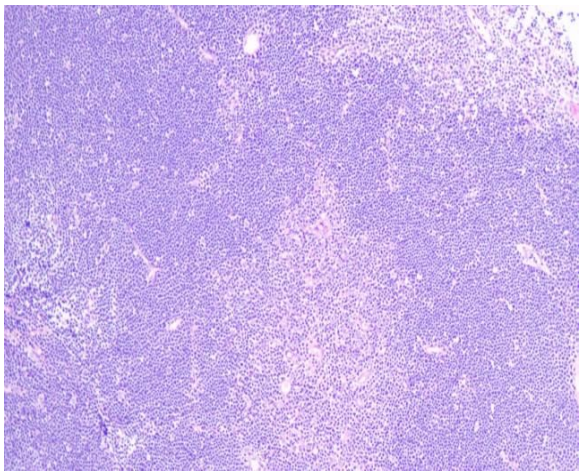
<u>Ảnh 2</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học (chuột số 4) (HE × 20)

Tuyến ức bình thường



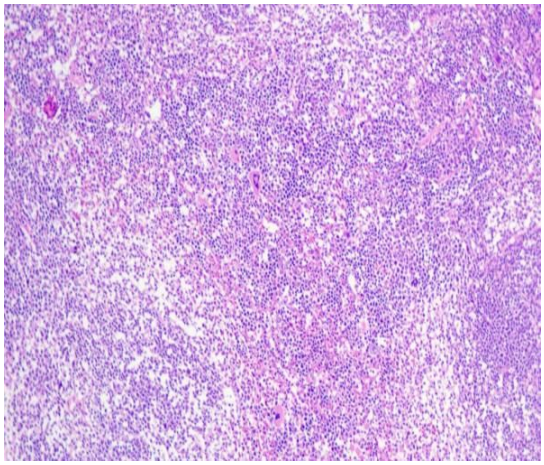
<u>Ảnh 3</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học (chuột số 8) (HE × 20)

Lách bình thường



<u>Ảnh 4</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học (chuột số 8) (HE × 20)

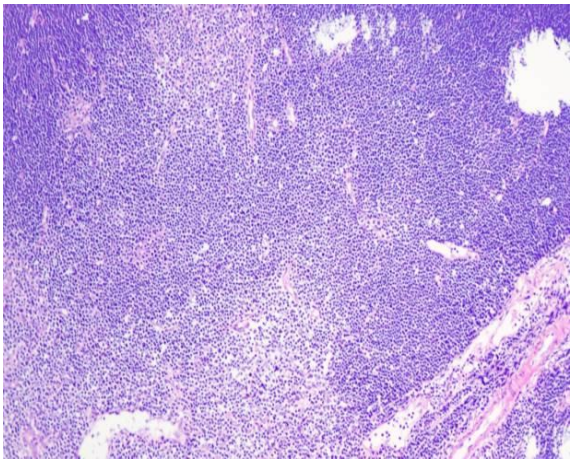
Tuyến ức bình thường



<u>Ảnh 5</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học (chuột số 9)

(HE × 20)

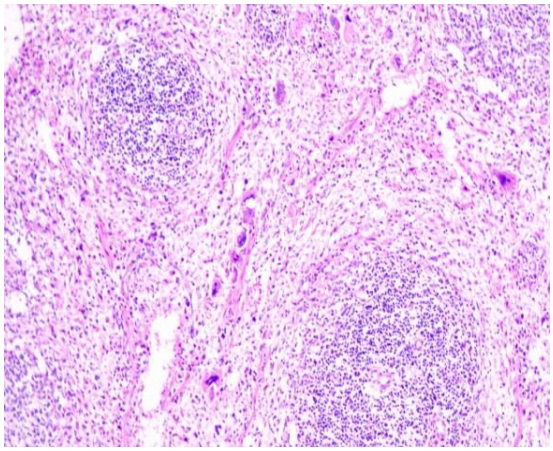
Lách bình thường



<u>Ảnh 6</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học (chuột số 9)

(HE × 20)

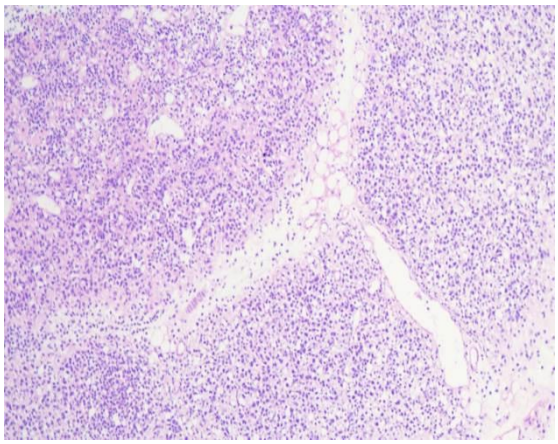
Tuyến ức bình thường



<u>Ảnh 7</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô mô hình (chuột số 18)

(HE × 20)

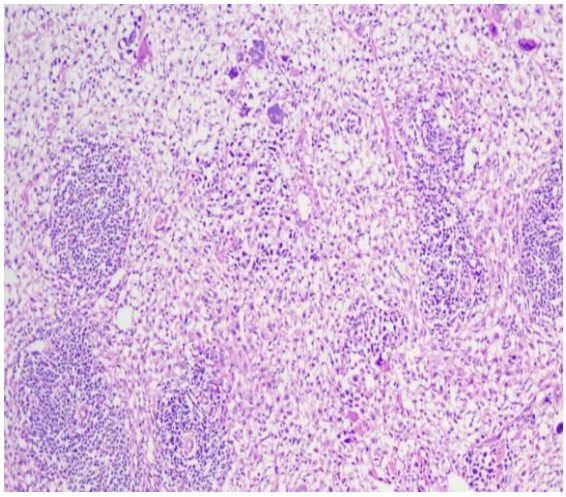
Số lượng lympho bào giảm mạnh so với chứng sinh học



<u>Ảnh 8</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô mô hình (chuột số 18)

(HE × 20)

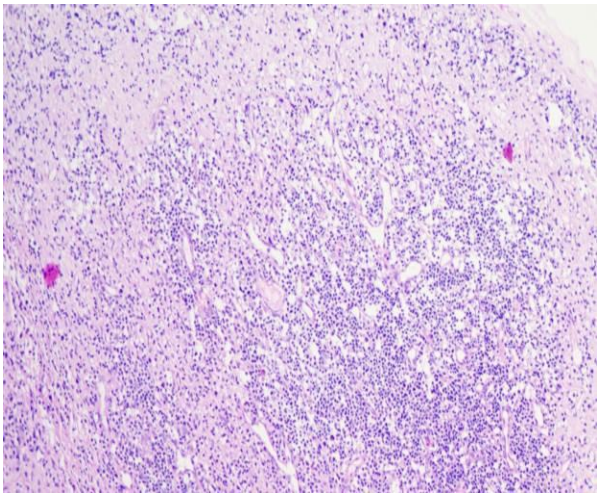
Số lượng lympho bào giảm không đồng đều so với chứng sinh học



<u>Ảnh 9</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô mô hình (chuột số 19)

(HE × 20)

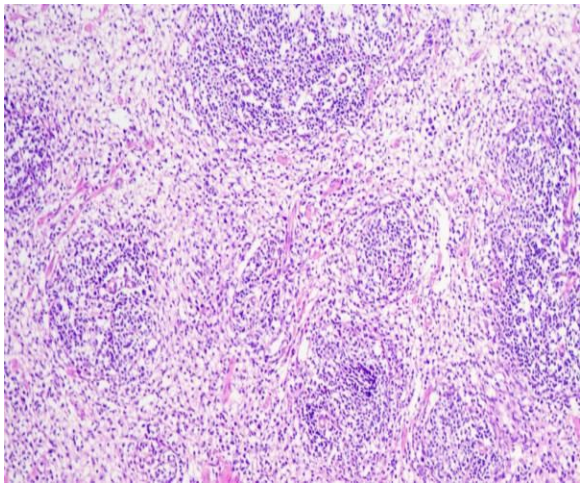
Số lượng lympho bào giảm mạnh so với chứng sinh học



<u>Ảnh 10</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô mô hình (chuột số 19)

(HE × 20)

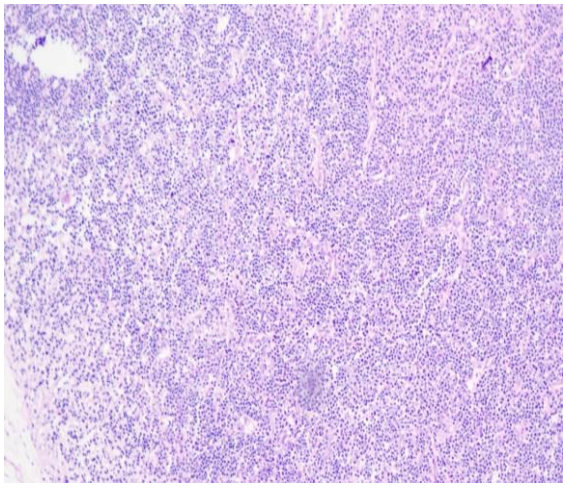
Số lượng lympho bào giảm không đồng đều so với chứng sinh học



<u>Ảnh 11</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô mô hình (chuột số 20)

(HE × 20)

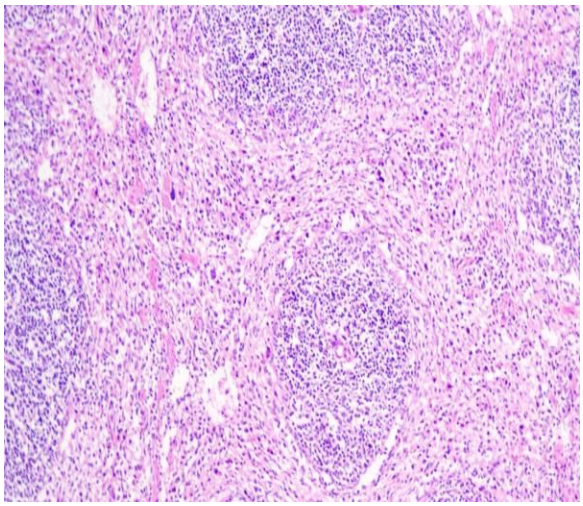
Số lượng lympho bào giảm mạnh so với chứng sinh học



<u>Ảnh 12</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô mô hình (chuột số 20)

(HE × 20)

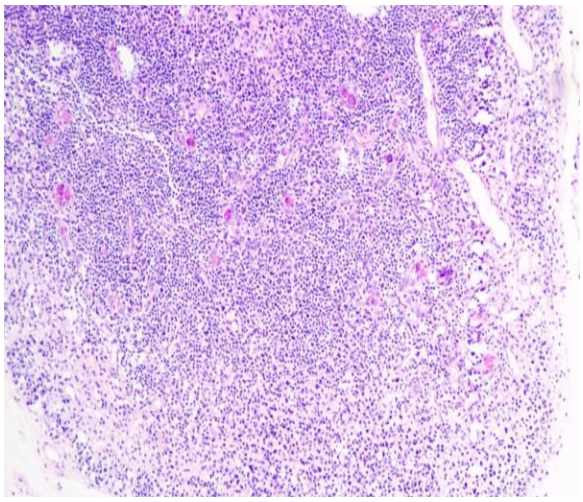
Số lượng lympho bào giảm không đồng đều so với chứng sinh học



<u>Ảnh 13</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống levamisol (chuột số 21)

(HE × 20)

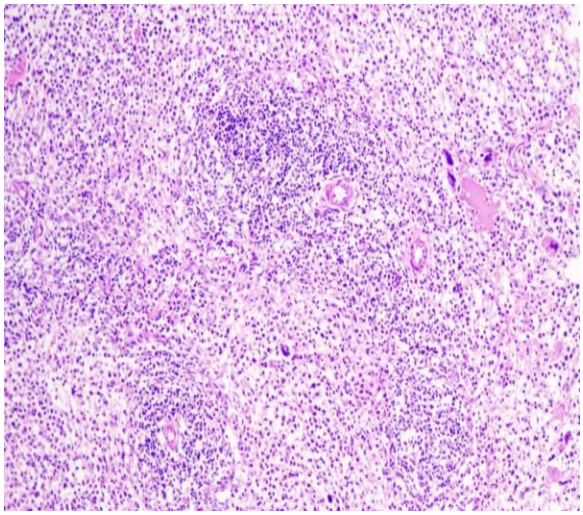
Số lượng lympho bào tăng nhẹ so với mô hình



<u>Ảnh 14</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống levamisol

(chuột số 21) (HE × 20)

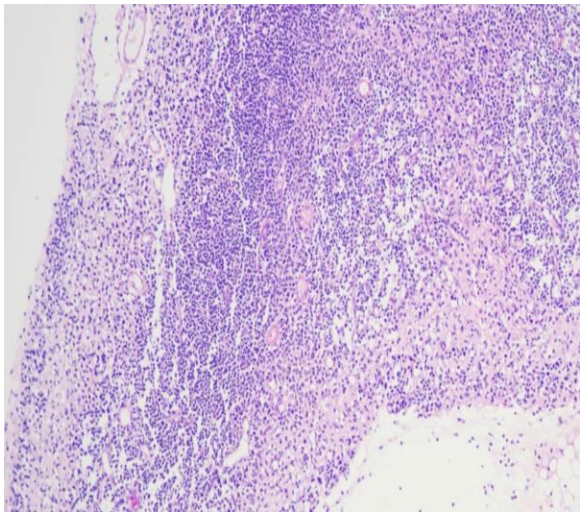
Số lượng lympho bào tăng nhẹ so với mô hình



<u>Ảnh 15</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống levamisol (chuột số 22)

(HE × 20)

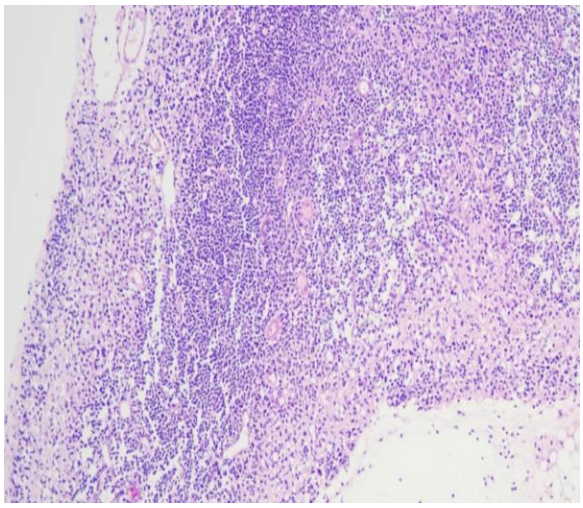
Số lượng lympho bào tăng nhẹ



<u>Ảnh 16</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống levamisol

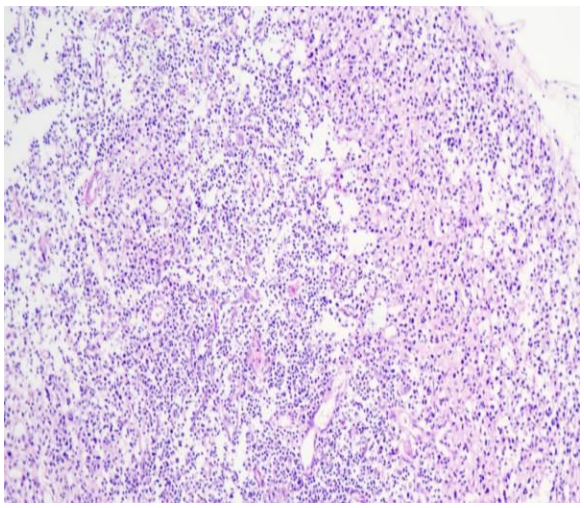
(chuột số 22) (HE × 20)

Số lượng lympho bào tăng nhẹ



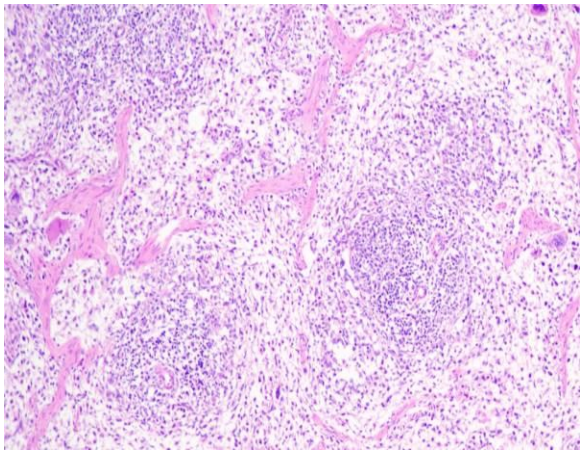
<u>Ảnh 17</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống levamisol (chuột số 23) (HE × 20)

Số lượng lympho bào tăng nhẹ



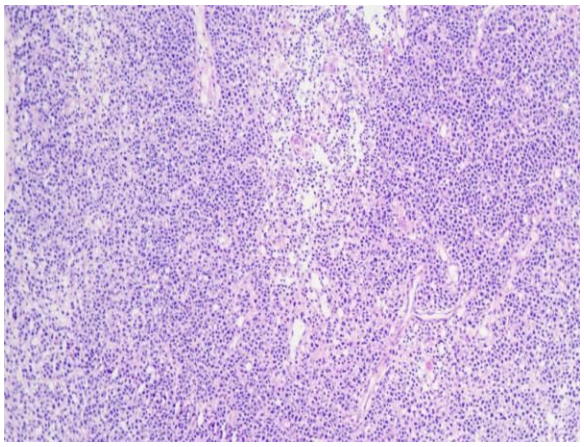
<u>Ảnh 18</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống levamisol (chuột số 23) (HE × 20)

Số lượng lympho bào tăng nhẹ



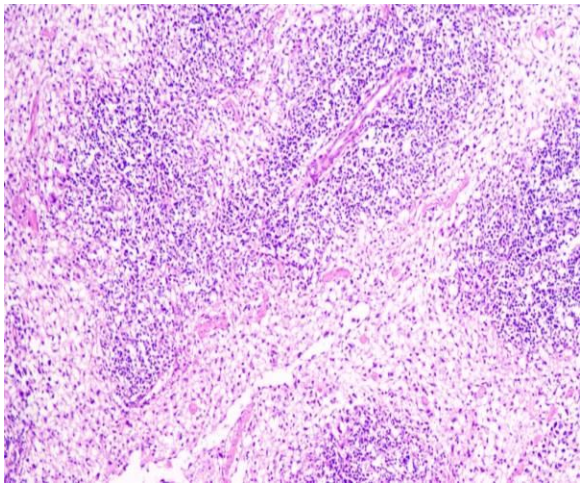
<u>Ảnh 19</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (chuột số 31) (HE × 20)

Số lượng lympho bào tăng vừa so với mô hình

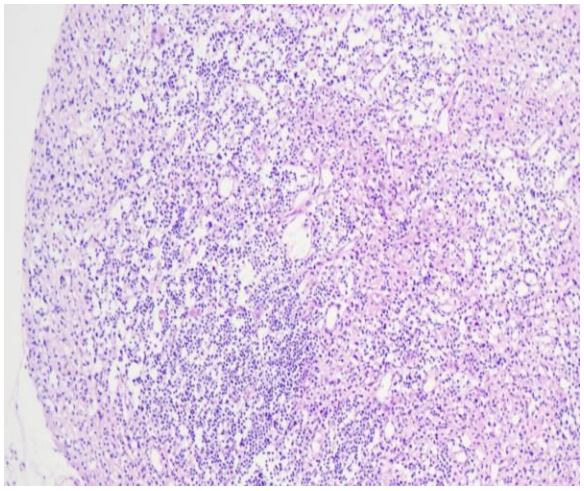


<u>Ảnh 20</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (chuột số 31) (HE × 20)

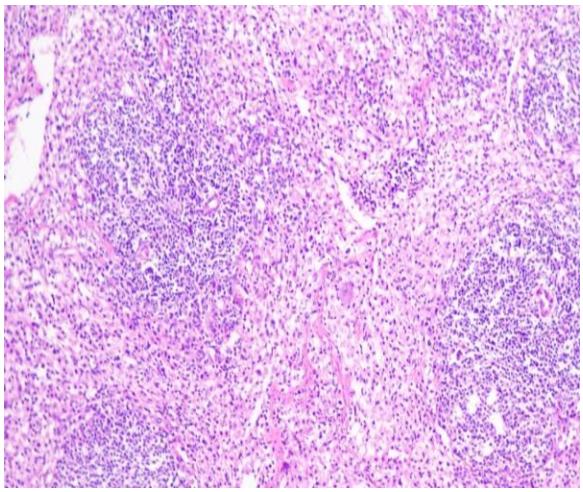
Số lượng lympho bào tăng mạnh so với mô hình



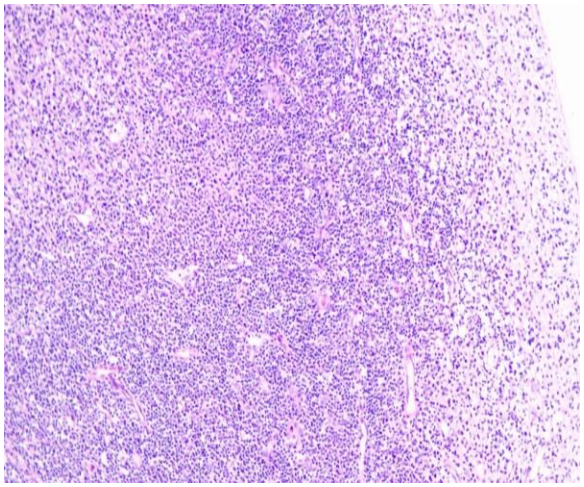
<u>Ảnh 21</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (chuột số 32) (HE × 20) **Số lượng lympho bào tăng vừa so với mô hình**



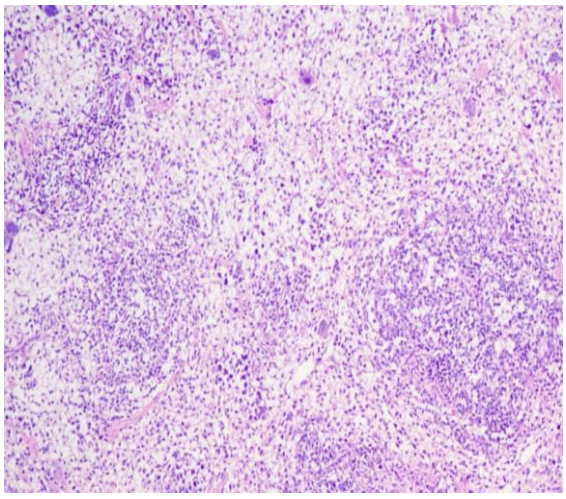
<u>Ảnh 22</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (chuột số 32) (HE × 20) **Số lượng lympho bào tăng vừa so với mô hình**



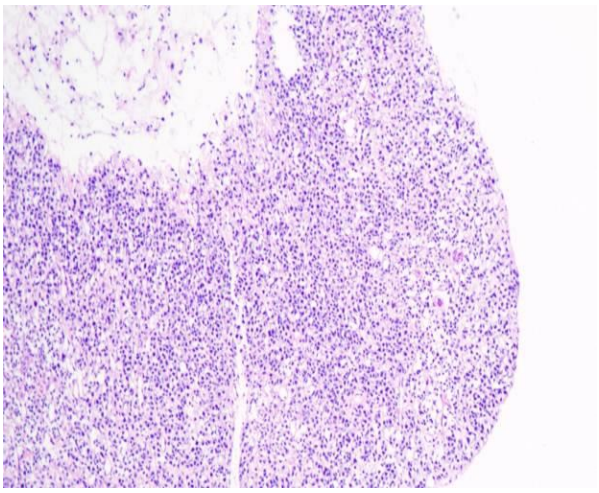
<u>Ảnh 23</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (chuột số 35) (HE × 20) **Số lượng lympho bào tăng mạnh so với mô hình**



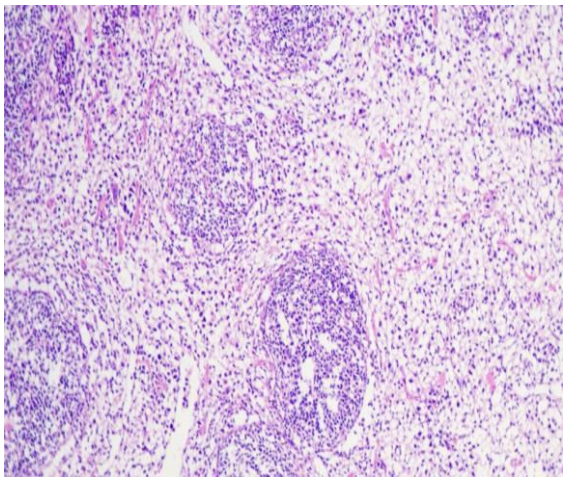
<u>Ảnh 24</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống EFCOVIDA liều 60 mg/kg (chuột số 35) (HE × 20) **Số lượng lympho bào tăng mạnh so với mô hình**



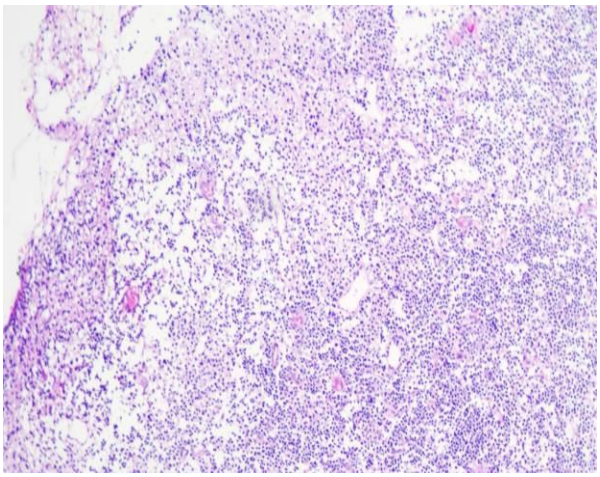
<u>Ảnh 25</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (chuột số 46) (HE × 20)
Số lượng lympho bào tăng nhẹ so với mô hình



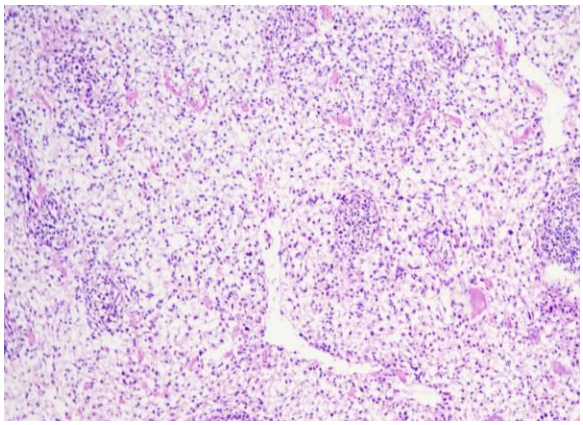
<u>Ảnh 26</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (chuột số 46) (HE × 20)
Số lượng lympho bào tăng nhẹ so với mô hình



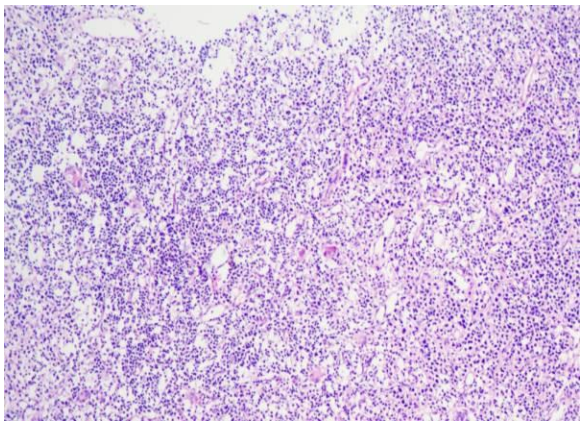
<u>Ảnh 27</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (chuột số 47) (HE × 20)
Số lượng lympho bào tăng vừa so với mô hình



<u>Ảnh 28</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (chuột số 47) (HE × 20)
Số lượng lympho bào tăng nhẹ so với mô hình



<u>Ảnh 29</u>: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (chuột số 48)(HE × 20) **Số lượng lympho bào tăng vừa so với mô hình**



<u>Ảnh 30</u>: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống EFCOVIDA liều 120 mg/kg (chuột số 48)(HE × 20) **Số lượng lympho bào tăng vừa so với mô hình**

PHỤ LỤC 2

PHIẾU KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM CỦA BỘT EFCOVIDA