

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TÊ

HỌC VIỆN Y - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



ĐOÀN NHẬT TÂN

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG TĂNG
CƯỜNG MIỄN DỊCH, CHỐNG HUYẾT
KHỐI CỦA VIÊN NANG “LIÊN NGÂN
SK” TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TÊ

HỌC VIỆN Y - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



ĐOÀN NHẬT TÂN

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG TĂNG
CƯỜNG MIỄN DỊCH, CHỐNG HUYẾT
KHỐI CỦA VIÊN NANG “LIÊN NGÂN
SK” 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: PGS.TS. Đậ Xuân Cảnh

HÀ NỘI, NĂM 2023

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, với tất cả lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn 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 PGS.TS. Đậu Xuân Cảnh 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. Nguyễn Hoàng Ngân cùng toàn thể thầy cô, các anh chị kỹ thuật viên tại bộ môn Dược lý, Học viện Quân Y 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, những người thân yêu đã luôn bên cạnh động viên tôi từ những lúc khó khăn nhất, 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

Đoàn Nhật Tân

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đoàn Nhật Tân, 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 PGS.TS. Đậu Xuân Cảnh.

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 2023

Tác giả

Đoàn Nhật Tân

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. Định nghĩa	3
1.1.2. Phân loại	3
1.1.3. Ứng dụng gây miễn dịch để phòng ngừa nhiễm trùng	5
1.2. Tổng quan huyết khối theo y học hiện đại	5
1.2.1. Định nghĩa	5
1.2.2. Cơ chế hình thành huyết khối	6
1.2.3. Những yếu tố gây nên huyết khối tắc mạch	7
1.2.4. Dấu hiệu của huyết khối	7
1.3. Vai trò của thuốc Y học cổ truyền trong tăng cường miễn dịch và chống huyết khối	7
1.4. Một số nghiên cứu về tăng cường hệ miễn dịch và chống huyết khối bằng y học cổ truyền trên thế giới và trong nước	9
1.4.1. Một số nghiên cứu trên thế giới	9
1.4.2. Một số nghiên cứu trong nước	11
1.5. Một số mô hình gây suy giảm miễn dịch trên thực nghiệm đã sử dụng	13
1.5.1. Gây suy giảm miễn dịch bằng thuốc ức chế miễn dịch	13
1.5.2. Gây suy giảm miễn dịch bằng chiếu tia xạ toàn thân	13
1.6. Một số mô hình chống đông trên thực nghiệm đã được sử dụng	14
1.6.1. Mô hình gây đông máu bệnh lý bằng lipopolisaccharid trên chuột cống	14
1.6.2. Mô hình gây đông máu bệnh lý trên thỏ bằng thrombin của Margaretten – MC Kay (1964)	14

1.6.3. Mô hình gây huyết khối đuôi chuột bằng K-Carrageenan	14
1.6.4. Mô hình huyết khối tĩnh mạch sâu ở khi đầu chó	15
1.6.5. Mô hình gây huyết khối động mạch cảnh bằng Ferric Chloride FeCl ₃	15
1.7. Tổng quan về viên nang Liên ngân SK	15
1.7.1. Xuyên tâm liên (<i>Herba Andrographitis</i>)	16
1.7.2. Kim ngân hoa (<i>Flos Lonicerae</i>)	18
1.7.3. Đinh lăng (<i>Radix Polysciacis</i>)	19
1.7.4. Sâm đại hành (<i>Curculigo orchioides Gaertn</i>)	20
1.7.5. Nhân sâm (<i>Radix Ginseng</i>)	21
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG, CHẤT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. Chất liệu và phương tiện nghiên cứu	23
2.1.1. Chất liệu nghiên cứu	23
2.1.2. Hóa chất nghiên cứu	23
2.1.3. Thiết bị nghiên cứu	24
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	24
2.2.1. Địa điểm nghiên cứu	24
2.2.2. Thời gian nghiên cứu	24
2.3. Động vật nghiên cứu	24
2.4. Phương pháp nghiên cứu	25
2.4.1. Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch	25
2.4.2. Đánh giá tác dụng chống huyết khối	27
2.5. Sơ đồ nghiên cứu	28
2.6. Xử lý số liệu và phân tích số liệu	29
2.7. Vấn đề đạo đức của nghiên cứu	29
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	30
3.1. Kết quả đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch	30
3.1.1. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột	30

3.1.2. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên sự thay đổi trọng lượng lách, tuyến ức	32
3.1.3. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên các chỉ số huyết học	33
3.1.4. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên các chỉ số cytokine huyết thanh	35
3.1.5. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên mô bệnh học lách và tuyến ức	36
3.2. Kết quả đánh giá tác dụng chống huyết khối	38
3.2.1. Kết quả hình thành huyết khối đuôi chuột	38
3.2.2. Kết quả đánh giá huyết khối đuôi chuột sau 48h	39
3.2.3. Kết quả đánh giá số lượng tiểu cầu và Fibrinogen trong máu chuột	40
3.2.4. Kết quả đánh giá thời gian đông máu APTT (giây); PT (giây); TT (giây)	42
Chương 4. BÀN LUẬN	45
4.1. Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của viên nang Liên ngân SK trên động vật thực nghiệm	45
4.2. Đánh giá tác dụng chống huyết khối của viên nang Liên ngân SK trên động vật thực nghiệm	53
KẾT LUẬN	60
KIẾN NGHỊ	62
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
Phụ lục	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng việt	Tiếng Anh
BASO	Bạch cầu basophils	
DHCB		Dehydrocorybulbine
ĐVTN	Động vật thực nghiệm	
EOS	Bạch cầu eosinophils	
Hb	Hemoglobin	
Hct	Hematocrit	
INF		Interferon
LYM	Bạch cầu lymphocytes	
MONO	Bạch cầu monocytes	
MDKĐH	Miễn dịch không đặc hiệu	
MĐĐH	Miễn dịch đặc hiệu	
NEU	Bạch cầu neutrophils	
NSAID	Thuốc chống viêm không steroid	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PLT	Tiểu cầu	
RBC	Hồng cầu	
TLLTĐ	Trọng lượng lách tương đối	
TLTƯTĐ	Trọng lượng tuyến ức tương đối	
YHCT	Y học cổ truyền	
YHHĐ	Y học hiện đại	
PNS		Panax notoginseng
VT	Huyết khối tĩnh mạch	
WBC	Bạch cầu	
WHO	Tổ chức y tế thế giới	World Health Organization

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 2.1. Thành phần viên nang cứng Liên ngân SK	23
Bảng 3.1. Sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột nghiên cứu ($\bar{x} \pm SD$)	30
Bảng 3.2. Trọng lượng lách và tuyến ức chuột nghiên cứu ($\bar{x} \pm SD$)	32
Bảng 3.3. Kết quả đánh giá số lượng và công thức bạch cầu ($\bar{x} \pm SD$)	33
Bảng 3.4. Kết quả đánh giá số một số chỉ tiêu huyết học khác ($\bar{x} \pm SD$) ...	34
Bảng 3.5. Kết quả đánh giá nồng độ một số cytokine huyết thanh chuột ($\bar{x} \pm SD$)	35
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của LNSK đến sự hình thành huyết khối	39
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của LNSK đến số lượng tiểu cầu (G/L) trong máu chuột	40
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của LNSK đến Fibrinogen (mg/L) trong máu chuột	41
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của LNSK đến thời gian đông máu APTT (giây) ...	42
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của LNSK đến thời gian đông máu PT (giây)	43
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của LNSK đến thời gian đông máu TT (giây)	44

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Ảnh 1.1. Xuyên tâm liên (<i>Herba Andrographitis</i>)	16
Ảnh 1.2. Kim ngân hoa (<i>Flos Lonicerae</i>)	18
Ảnh 1.3. Đinh lăng (<i>Radix Polysciacis</i>)	19
Ảnh 1.4. Sâm đại hành (<i>Curculigo orchioides Gaertn</i>)	20
Ảnh 1.5. Nhân sâm (<i>Radix Ginseng</i>)	21
Ảnh 3.1. Hình ảnh mô bệnh học lách chuột ở các lô nghiên cứu	36
Ảnh 3.2. Hình ảnh mô bệnh học tuyến ức của chuột ở các lô nghiên cứu	37
Ảnh 3.3. Huyết khối đuôi chuột gây bởi κ -carrageenan tiêm phúc mạc ...	38

ĐẶT VẤN ĐỀ

Miễn dịch và chống huyết khối tĩnh mạch là hai lĩnh vực được ứng dụng nhiều trong y học và ngày càng phát triển. Hệ miễn dịch có vai trò bảo vệ cơ thể trước các tác nhân gây bệnh. Hiện nay, bệnh lý liên quan suy giảm miễn dịch hay các bệnh lý do huyết khối tĩnh mạch ngày càng gia tăng [1],[2].

Bảo vệ và nâng cao hệ miễn dịch của cơ thể có vai trò rất quan trọng trong điều trị các bệnh tự miễn, bệnh ung thư, bệnh mạn tính. Miễn dịch trị liệu có vai trò nhất định trong điều trị những bệnh lý này. Các chất kích thích miễn dịch có nguồn gốc rất đa dạng [2]. Chất kích thích miễn dịch có nguồn gốc sinh học: sản phẩm tiết của các tế bào miễn dịch có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch như các interleukin (IL-2), interferon (interferon α,β) và các yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt, đại thực bào (GM-CSF)..., gọi chung là các cytokin [2],[3]. Các chất kích thích miễn dịch 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 BCG,... Các chất này có hiệu quả tốt trong việc tăng cường hệ miễn dịch, tuy nhiên còn nhiều tác dụng không mong muốn. Bên cạnh đó, các thuốc có nguồn gốc sinh học giá thành còn đắt, bệnh suy giảm miễn dịch thường kéo dài, nên chi phí cho một ca bệnh thường rất tốn kém kinh tế và thời gian. Thuốc có nguồn gốc hóa dược có độc tính cao, ảnh hưởng đến chức năng gan thận, một số trường hợp còn gặp tai biến trên lâm sàng [4]. Việc tìm ra sản phẩm có tác dụng nâng cao miễn dịch, chống huyết khối tĩnh mạch ít có tác dụng phụ và giá thành thấp đang được các thầy thuốc quan tâm.

Suy giảm miễn dịch và huyết khối tĩnh mạch không có bệnh danh trong Y học cổ truyền (YHCT), nằm trong phạm vi chứng: hư lao, huyết chứng,

huyết ú...[5]. Có rất nhiều nghiên cứu các vị thuốc, bài thuốc có tác dụng điều trị suy giảm miễn dịch và huyết khối thu được kết quả khả quan.

Việt Nam với nền Y học cổ truyền lâu đời, truyền thống sử dụng thảo dược là thuốc vô cùng phong phú. Với phương châm “Nam dược trị Nam nhân” nghĩa là: dùng thuốc nam trị bệnh cho người Nam của ông tổ thuốc nam – Tuệ Tĩnh đã ảnh hưởng sâu sắc đến nhiều thế hệ thầy thuốc Y học cổ truyền Việt Nam. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm kiếm chất kích thích miễn dịch và chống huyết khối nguồn gốc Y học cổ truyền nhằm tăng thêm sự lựa chọn cho người thầy thuốc đồng thời cung cấp thêm phương pháp điều trị, hạn chế được tác dụng không mong muốn cho người bệnh là rất cần thiết.

“Liên ngân SK” là chế phẩm nghiệm phương của PGS.TS. Đậu Xuân Cảnh trong đó có sự kết hợp của các vị thuốc Nhân sâm, Xuyên tâm liên, Kim ngân hoa, Đinh lăng, Sâm đại hành theo lý luận y học cổ truyền có tác dụng bổ khí, ích huyết, giải độc, tiêu viêm. Do đó “Liên ngân SK” có tác dụng nâng cao sức khỏe, tăng cường hệ miễn dịch, chống huyết khối [7]. Tuy nhiên hiện nay chưa có nghiên cứu dược lý về chế phẩm này. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: **“Nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch, chống huyết khối của viên nang “Liên Ngân SK” trên động vật thực nghiệm”**, với hai mục tiêu:

1. *Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của viên nang “Liên Ngân SK” trên động vật thực nghiệm;*

2. *Đánh giá tác dụng chống huyết khối của viên nang “Liên Ngân SK” trên động vật thực nghiệm.*

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan miễn dịch theo y học hiện đại

1.1.1. Định nghĩa

Miễn dịch là khả năng của cơ thể nhận ra và loại bỏ các vật lạ, trong miễn dịch học gọi là kháng nguyên [8].

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 [8].

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 [8],[9].

- 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 niêm mạc của 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 [8],[9].

+ Cơ chế hóa học

Trong các dịch tiết tự nhiên có chứa các hóa 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 chi có khả năng loại bỏ hầu hết các vi khuẩn [8],[9].

+ 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 [8],[9].

- 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 [8],[9].

1.1.2.2. Hệ thống miễn dịch đặc hiệu

Miễn dịch đặc hiệu hay còn gọi là miễn dịch thích nghi hay miễn dịch thu được là trạng thái miễn dịch xuất hiện khi cơ thể đã tiếp xúc với kháng nguyên. Miễn dịch đặc hiệu còn có thể có được khi truyền các tế bào có thẩm quyền miễn dịch hoặc truyền kháng thể [8],[9].

- Các thuộc tính cơ bản của miễn dịch đặc hiệu

+ Tính đặc hiệu;

+ Tính phân biệt cấu trúc bản thân và cấu trúc lạ;

+ Trí nhớ miễn dịch [8],[9].

- Các yếu tố dịch thể tham gia đáp ứng miễn dịch đặc hiệu: kháng thể là yếu tố dịch thể tham gia vào đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và có hai dạng:

+ Dạng lưu hành tự do trong dịch thể có khả năng kết hợp với các kháng nguyên hòa tan đặc hiệu để dẫn đến các thay đổi sinh học.

+ Dạng biểu lộ trên bề mặt các tế bào lympho B, có vai trò là thụ thể kháng nguyên của tế bào B còn được gọi là các globulin bề mặt (slg) [8],[9].

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

1.1.3.1. 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 [8],[9],[10].

1.1.3.2. 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 [8],[9],[10].

1.2. Tổng quan huyết khối theo y học hiện đại

1.2.1. Định nghĩa

Huyết khối là quá trình các tế bào máu tập trung đến các mạch máu bị rách và làm ngừng chảy máu khi bạn bị thương, ví dụ như bạn vô tình làm mình chảy máu, lúc này quá trình đông máu sẽ được kích hoạt. Các tiểu cầu được triệu tập đến vùng tổn thương để tạo ra nút chặn ban đầu.

Các yếu tố đông máu trong máu gây ra một phản ứng dây chuyền nhanh chóng, dẫn đến hình thành các sợi fibrin giữ các tiểu cầu với nhau. Nhiều tiểu cầu phóng thích các chất hóa học để thu hút các tiểu cầu khác tạo thành một cục máu đông bền hơn và ngăn chặn tình trạng chảy máu.

Các protein trong cơ thể giúp xác định thời điểm dừng lại quá trình tạo cục máu đông khi nó đủ lớn. Khi vết thương được chữa lành, các sợi sẽ tự hòa tan và những tiểu cầu quay trở lại mô máu bình thường [6].

1.2.2. Cơ chế hình thành huyết khối

Huyết khối hay cục máu đông được định nghĩa là một quá trình bệnh lý do sự phát động và lan rộng bất hợp lý của các phản ứng đông cầm máu trong cơ thể dẫn đến hình thành cục máu đông trong lòng mạch máu. Tùy theo kích thước của huyết khối, đường kính mạch máu mà huyết khối có thể gây tắc mạch hoàn toàn hay bán tắc hoặc nghẽn mạch... [6].

1.2.2.1. Các giai đoạn hình thành huyết khối:

Quá trình hình thành cục máu đông (huyết khối) chính là quá trình đông máu với trên 30 yếu tố tham gia vào quá trình này, trải qua các giai đoạn:

- Giai đoạn thành mạch.
- Giai đoạn huyết tương.
- Giai đoạn huyết khối đông [6].

1.2.2.2. Phân loại huyết khối

Xét về cấu trúc, huyết khối thường có hai loại là huyết khối trắng và đỏ, cũng có thể gặp loại hỗn hợp. Huyết khối trắng hình thành khi tế bào nội mạc mạch máu bị tổn thương, tiểu cầu kết dính và ngưng tập, thành phần chủ yếu là tiểu cầu; thường gặp ở động mạch như mạch vành, mạch não,...

Huyết khối đỏ hình thành khi dòng máu chảy chậm với thành phần chính là sợi fibrin bao bọc hồng cầu, thường gặp ở tĩnh mạch.

Ngoài ra, huyết khối còn được phân thành huyết khối động mạch, tĩnh mạch và vi mạch.

Huyết khối động mạch có thành phần chủ yếu là tiểu cầu. Tổn thương thành mạch và sự tăng hoạt hóa tiểu cầu là yếu tố chính gây huyết khối. Thường gặp ở người bệnh tim mạch như tăng huyết áp, mỡ máu, đái tháo đường... [6].

1.2.3. Những yếu tố gây nên huyết khối tắc mạch

1.2.3.1. Bất thường thành mạch

Cấu trúc thành mạch bình thường gồm 3 lớp: ngoại mạc, trung mạc và nội mạc. Trong đó, lớp nội mạc tiếp xúc trực tiếp với dòng máu lưu thông trong mạch. Bình thường, lớp nội mạc sẽ tổng hợp và bài tiết ra những chất ức chế hoạt hóa tiểu cầu và làm giãn mạch. Khi có sự không toàn vẹn của nội mạc sẽ khiến tắc mạch bởi mất các đặc tính chống tắc mạch và sự bộc lộ các thành phần hoạt hoá tiểu cầu ở dưới nội mạc. Thường gặp ở những người bệnh xơ vữa động mạch vành, tăng huyết áp,... [6].

1.2.3.2. Bất thường dòng chảy của máu

Khi dòng chảy của máu tăng, độ dịch chuyển cao hoặc dòng chảy của máu giảm, độ dịch chuyển giảm hoặc độ nhớt của máu tăng đều sẽ kích hoạt tiểu cầu dẫn đến hình thành huyết khối gây tắc mạch [6].

1.2.3.3. Bất thường các thành phần máu

Tất cả những bất thường về tiểu cầu, yếu tố đông máu, các chất ức chế đông máu cũng như những yếu tố tham gia hệ thống tiêu sợi huyết đơn độc hoặc kết hợp đều có thể dẫn tới huyết khối (cục máu đông) [6].

1.2.4. Dấu hiệu của huyết khối

- Sưng nề một chân.
- Đổi màu da.
- Khó thở.
- Đau ở một chân hoặc tay.
- Đau dữ dội ở ngực [6].

1.3. Vai trò của thuốc Y học cổ truyền trong tăng cường miễn dịch và chống huyết khối

Y học cổ truyền đang ngày càng thu hút được sự chú ý của giới học thuật. Vài năm qua, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào hiệu quả tăng cường miễn dịch của YHCT. Duy trì sự điều hòa hằng định miễn dịch của hệ thống

miễn dịch là điều cần thiết để có sức khỏe bình thường. Nhiều bệnh nguy hiểm có thể xảy ra khi bất thường trong sự điều hòa miễn dịch. Khi miễn dịch bị ức chế, hệ thống miễn dịch thất bại trong việc bảo vệ cơ thể chống lại tác nhân nhiễm trùng và các chất gây hại dẫn đến nhiễm trùng và ung thư [11].

Tác dụng kích thích miễn dịch

Cà gai leo và mật nhân đã được chứng minh có tác dụng kích thích miễn dịch, tăng đáp ứng miễn dịch dịch thể, tăng nồng độ IgG máu ngoại vi, tăng đáp ứng miễn dịch tế bào, tăng nồng độ IL-2, giảm nồng độ TNF - và gia tăng số lượng CD4(Th) máu ngoại vi [12].

Nhân sâm thành phần ginsenoside Rc, Rd, Rgl và ginsan được báo cáo là có khả năng làm kích thích sự tăng sinh tế bào T và kích thích miễn dịch. Chiết xuất nhân sâm làm kích thích sự tăng sinh tế bào T và kích thích miễn dịch. Chiết xuất nhân sâm đã gây ra thành công các đáp ứng kháng nguyên IgM, IgG và IgA đặc hiệu khi dùng đường uống hoặc trong màng bụng [13],[14].

Nghiên cứu cây nhàu đã chứng minh được cao quả nhàu có tác dụng kích thích miễn dịch và chống oxy hóa trên thực nghiệm [15].

Ức chế miễn dịch: Kết hợp các bài thuốc Tân di tán, Hương sa lục quân tử, Tiểu thanh long thang làm giảm sự tương tác giữa tế bào nhiều chân và tế bào TCD4+ trên bệnh nhân hen phế quản và viêm mũi dị ứng [16].

Điều hòa miễn dịch: Thuốc YHCT có thể có khả năng làm giảm hoặc điều chỉnh sự phát triển và hoạt động của hệ thống miễn dịch để loại bỏ các triệu chứng do rối loạn chức năng của hệ thống miễn dịch. Thuốc YHCT có thể điều chỉnh các phản ứng miễn dịch theo cách ngược lại để giữ sự cân bằng của hệ thống miễn dịch và duy trì sức khỏe của cá nhân [17].

Các loại thảo dược như Nhân sâm, Sâm Ngọc Linh, Tam thất hoang, Đông trùng hạ thảo, Nấm lim xanh, Linh chi,... qua nghiên cứu, thành phần polysaccharide từ các vị thảo dược này được chứng minh qua nhiều thử

nghiệm dược lý cho thấy có tác dụng điều hòa miễn dịch rộng rãi và ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư [11].

1.4. Một số nghiên cứu về tăng cường hệ miễn dịch và chống huyết khối bằng y học cổ truyền trên thế giới và trong nước

1.4.1. Một số 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 [18].

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, Tầm 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 [19].

Rao X.Q và cộng sự (1991) 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 [20].

Tảo Spirulina (1993): theo Tổ chức y tế thế giới (WHO) và cơ quan quản lý dược phẩm Hoa Kỳ công nhận tảo Spirulina 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 Spirulina lượng chất phóng xạ đã được đào thải khỏi đường tiết niệu ở người bị nhiễm xạ rất cao [21].

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 và chống sao chép HIV trong tế bào lympho [22].

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 [23].

Nghiên cứu của Hồng Đông Mai (2015), sử dụng dịch truyền "Đan sâm" trên bệnh nhân nhồi máu não, kết quả đạt loại tốt (90%) [24].

Nghiên cứu của Dương Lập Vân (2015), điều trị 75 bệnh nhân nhồi máu não bằng thuốc y học cổ truyền kết hợp với y học hiện đại. Kết quả nhóm bệnh nhân sử dụng thuốc y học cổ truyền kết hợp đạt loại tốt (89%) so với nhóm bệnh nhân chỉ sử dụng đơn thuần y học hiện đại (67%) [25].

Trần Ngọc Minh (2015) so sánh 47 bệnh nhân di chứng nhồi máu não uống bài thuốc "Trần can tức phong thang gia vị" kết hợp với thuốc nền (Aspirin, Atorvastatin) với nhóm 47 bệnh nhân di chứng nhồi máu não chỉ uống thuốc nền. Kết quả nhóm uống kết hợp y học cổ truyền với y học hiện đại đạt hiệu quả (93,6%) cao hơn nhóm điều trị nền đơn thuần (83%) [26].

Lâm Anh Kiệt, Hồ Kim Minh (2016), Nghiên cứu trên 200 bệnh nhân di chứng thất ngôn, trong đó 100 bệnh nhân (nhóm I) điều trị bằng châm cứu và bài BỔ dương hoàn ngũ kết hợp thuốc nền y học hiện đại, 100 bệnh nhân (nhóm II) chỉ sử dụng y học hiện đại đơn thuần. Kết quả nhóm I đạt hiệu quả (92%) cao hơn nhóm II (77,0%) [27].

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-, IFN- và TGF-1. Nghiên cứu này có ưu điểm là theo dõi sự biến đổi nồng độ cytokin kéo dài trong 6 năm. Qua đó, tác giả đưa ra kết luận: sự dịch chuyển mô hình cytokin của 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 [28].

1.4.2. Một số nghiên cứu trong nước

Nghiên cứu trên cây nhàu, Phạm Huy Quyền (1996) đã chứng minh tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ nhàu toàn phần trên chuột nhắt trắng và trên invitro [29].

Nguyễn Gia Chấn và cộng sự (1998) 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 [30].

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 [31].

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) [32].

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 nhất 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 [33].

Lê Thị Tâm (2017), “Nghiên cứu tác dụng chống ngưng tập tiểu cầu của các phân đoạn dịch chiết sâm vũ điệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) và tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T. Tsai et K. M. Feng) in vitro” và Nguyễn Thị Tuyết Trinh (2017), “Nghiên cứu tác dụng chống đông máu của các phân đoạn dịch chiết sâm vũ điệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) và tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T. Tsai et K. M. Feng) in vitro”, Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ Đại học, Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội – Nghiên cứu tác dụng chống đông và chống kết tập tiểu cầu in vitro của các phân đoạn dịch chiết tam thất hoang cho thấy duy nhất chỉ có phân đoạn butanol có tác dụng chống đông (theo còn đường nội sinh và ngoại sinh) và chống kết tập tiểu cầu [34],[35].

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 nhất 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 [12].

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

1.5.1. 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 cũng 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 mãn cảm [36],[37].

1.5.2. 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 [38],[39],[40].

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) [36],[37].

1.6. Một số mô hình chống đông trên thực nghiệm đã được sử dụng

1.6.1. Mô hình gây đông máu bệnh lý bằng lipopolisaccharid trên chuột cống

Trước khi gây mô hình, chuột được uống nước cất và thuốc tương ứng. Tiêm Lipopolysaccharid tĩnh mạch đuôi, liều 3 mg/kg thể trọng với thể tích 0,5 mL/100g trọng lượng chuột để gây đông máu. Chuột được lấy máu tại các thời điểm trước tiêm Lipopolysaccharid 4h, 8h sau tiêm Lipopolysaccharid. Tất cả các mẫu được hòa loãng (tỷ lệ 1:9) với 4% natricitrat. [41],[42],[43],[44].

1.6.2. Mô hình gây đông máu bệnh lý trên thỏ bằng thrombin của Margaretten – MC Kay (1964)

Tiêm tĩnh mạch rìa tai thỏ 1 lần dung dịch Thrombin, liều 15UI (tiêm chậm trong vòng 3 phút) sau đó cho thỏ uống thuốc chống đông. Thể tích cho uống ở tất cả các lô là 5ml/kg/24h, chia đều 2 lần vào 8h sáng và 14h chiều. Cho thỏ uống liên tục trong 1 tuần. Tại các thời điểm trước khi tiêm thrombin (T0), sau tiêm 24h (T1), 72h (T2), 5 ngày (T3), 7 ngày (T4). Thỏ được lấy máu tĩnh mạch để xét nghiệm các chỉ tiêu đông máu [45],[46].

1.6.3. Mô hình gây huyết khối đuôi chuột bằng K-Carrageenan

Mô hình này dựa trên cơ sở tăng đông máu, tổn thương nội mô và sự thay đổi lưu lượng máu bình thường. Việc thắt nút đơn giản để thay đổi lưu lượng máu ở chuột đã cải thiện đáng kể tần suất và dấu hiệu huyết khối sau khi tiêm K-carrageenan vào tĩnh mạch. Đặc biệt, tiêm 1 mg/kg K-carrageenan kết hợp với 10 phút thắt ở đuôi làm tăng tần suất huyết khối lên gần như 100% ở chuột cống [47].

1.6.4. Mô hình huyết khối tĩnh mạch sâu ở khỉ đầu chó

Nghiên cứu này thiết lập một mô hình mới về huyết khối tĩnh mạch bằng cách ức chế hệ thống protein C kết hợp với ứ đọng tĩnh mạch và tổn thương tĩnh mạch tinh vi. Các con vật được quan sát trong khoảng thời gian 6 giờ vào ngày đầu tiên và sau đó trong khoảng thời gian từ 11 đến 15 ngày [48].

1.6.5. Mô hình gây huyết khối động mạch cảnh bằng Ferric Chloride $FeCl_3$

Trên thực tế có rất nhiều mô hình huyết khối khác nhau đã được phát triển trên chuột. Trong số đó, tổn thương mạch do clorua sắt ($FeCl_3$) là một mô hình huyết khối tắc, được sử dụng rộng rãi báo cáo sự hoạt hóa và kết tập tiểu cầu trong bối cảnh hệ thống mạch kín vô trùng. Mô hình này dựa trên tổn thương tế bào nội mô do oxy hóa khử, đơn giản và nhạy cảm với cả thuốc chống đông máu và thuốc chống tiểu cầu [49].

1.7. Tổng quan về viên nang Liên ngân SK

Viên nang “Liên ngân SK”

THÀNH PHẦN:

Xuyên tâm liên (*Herba Andrographii*) 180mg

Kim ngân hoa (*Flos Lonicerae*)180mg

Đinh lăng (*Radix Polysciacis*) 50mg

Sâm đại hành (*Curculigo orchioides Gaertn*)50mg

Nhân sâm (*Panax ginseng*)40mg

Phụ gia: Vỏ nang – Gelatin, chất độn (tinh bột ngô), chất ổn định (Calci carbonat), chất chống đông vón (Talc, Magnesi stearat) vừa đủ 1 viên.

Khối lượng tịnh (không tính vỏ nang): 500mg/viên

1.7.1. Xuyên tâm liên (*Herba Andrographitis*)



Ảnh 1.1. Xuyên tâm liên (*Herba Andrographitis*)

- Tên khoa học: *Herba Andrographitis*.

- Dược liệu dùng là thành phần trên mặt đất phơi hay sấy khô của cây Xuyên tâm liên – *Andrographis paniculata* (Burm.) Nees., họ Ô rô – Acanthaceae.

- Tính vị, quy kinh: Vị rất đắng, tính hàn. Vào kinh phế, can, tỳ.

- Công năng, chủ trị: Thanh nhiệt giải độc, thân nhiệt tảo thấp, thanh tràng chỉ lý, thanh phế chỉ khái. Chủ trị các bệnh viêm ruột, lý cấp tính, viêm phổi, viêm họng, amidan. ho, ho gà, viêm gan virus, viêm đường tiết niệu, mụn nhọt, ung thũng đình độc, rắn độc cắn.

- Thành phần hóa học:

Các dẫn chất diterpenlacton: Thành phần chính trong Xuyên tâm liên là các dẫn chất diterpenlacton có cấu trúc labdan. Chất chính là Andrographolid có trong toàn cây nhưng cao nhất là ở lá. Andrographolid có vị rất đắng kết tinh từ MeOH điểm chảy 230°C. Hàm lượng andrographolid trong lá chiếm khoảng 2,39%. Dẫn chất diterpenlacton thứ hai là neoandrographolid, một glucosid đã được xác định cấu trúc năm 1986. Dẫn chất này có vòng lacton 5 cạnh chưa no ở vị trí α , β nên dương tính với thuốc thử Baliet (thuốc thử phát hiện vòng butenolic trong glycosid tim). Mới đây, người ta đã phân lập được glucosid của andrographolid với phần đường glucose gắn vào carbon carbinol

bậc II và gọi là andrographolid [Seth S.K. et al. J. of Mol. Structure (2010) 965,45-49].

- Tác dụng dược lý:

Các nghiên cứu trên chuột nhất cho thấy Xuyên tâm liên có tác dụng kích thích hệ miễn dịch bằng cả 2 con đường: đáp ứng đặc hiệu với kháng nguyên tạo nên kháng thể tiêu diệt vi khuẩn và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu tăng cường khả năng thực bào.

+ Xuyên tâm liên có tác dụng ức chế sự nhân bản của nhiều loại tế bào ung thư, kích thích sự biệt hóa tế bào giúp chống lại bệnh ung thư.

+ Xuyên tâm liên có tác dụng hạ sốt. Ở liều 300mg/kg Xuyên tâm liên có tác dụng hạ sốt tương đương với aspirin cùng liều. Xuyên tâm liên có tác dụng ngừa cảm lạnh trên thử nghiệm lâm sàng mù đôi ở người tình nguyện. Sau 3 tháng sử dụng liều 200mg/ngày, tỷ lệ người cảm lạnh chỉ còn 30% so với 62% ở nhóm chứng.

+ Dịch chiết Xuyên tâm liên có ảnh hưởng lên khả năng tồn tại của HIV do ức chế các enzym ảnh hưởng lên quá trình vận chuyển phosphat.

+ Xuyên tâm liên có tác dụng bảo vệ gan chống lại các tác nhân gây hại cho gan như CCl₄, galactosamin, paracetamol. Tác dụng chủ yếu do các andrographolid trong đó anhydrographisid có tác dụng mạnh nhất.

+ Xuyên tâm liên có tác dụng chống tiêu chảy. Tác dụng chủ yếu là do các dẫn chất diterpen.

+ Các thử nghiệm dược lý cho thấy andrographolid, hoạt chất chính trong cây có nhiều tác dụng trên các mô hình thử nghiệm như: diệt đơn bào, chống độc gan, kháng HIV, kích thích miễn dịch, chống ung thư, hạ đường huyết và chống cao huyết áp.

- Cách dùng, liều lượng: Dùng dưới dạng thuốc bột 4-6g hoặc thuốc sắc 10-20g. Dùng ngoài: Ngày dùng 20g đến 40g lá tươi, giã nát để đắp, hoặc sắc lấy nước rửa chỗ mụn nhọt, ngứa lở [50],[51].

1.7.2. Kim ngân hoa (*Flos Lonicerae*)



Ảnh 1.2. Kim ngân hoa (*Flos Lonicerae*)

- Tên khoa học: *Flos Lonicerae*.
- Dược liệu là nụ hoa có lẫn một số hoa đã nở của cây Kim ngân – *Lonicera japonica* Thunb. hoặc một số loài *Lonicera* khác như *L. dasystyla* Rehd., *L. confusa* DC. họ Kim ngân – Caprifoliaceae.
- Tính vị, quy kinh: Cam, hàn. Vào các kinh phế, vị, tâm.
- Công năng, chủ trị: Thanh nhiệt, giải độc, tán phong nhiệt. Chủ trị: Ung nhọt, ban sởi, mày đay, lở ngứa, cảm mạo phong nhiệt, ôn bệnh phát nhiệt, nhiệt độc huyết li.
- Thành phần hóa học:
 - + Trong nụ hoa *L. japonica* có các nhóm hợp chất sau: các dẫn chất cafeoyl quinic, flavonoid, iridoid và saponin.
 - + Nụ hoa kim ngân có acid chlorogenic và các đồng phân của nó như: acid cryptochlorogenic, acid neochlorogenic và các acid isochlorogenic a,b và c (3,4-,3,5- và 4,5-di-O-cafeoyl quinic). Hàm lượng của acid chlorogenic trong nụ hoa có thể tới 6%.
 - + Các flovonoid trong nụ bao gồm: rutin, luteolin-7-O- β -D-galactosid, lonicerin, hyperosid, luteolin-7-O-neohesperidosid, triclin-7-O- β -D-glucospyranosid, ochna-flavon L, chrisoeirol-7-O- β -D-hesperidosid, triclin-7-O- β -D-neohesperidosid, chrysoeriol-7-O- β -D-neohesperidosid, avicularin và quercetin. 3 chất đầu có hàm lượng cao nhất (với tỷ lệ khoảng 4,5:2:1).

- Tác dụng dược lý:

+ Kim ngân có tác dụng kháng khuẩn trên một số vi khuẩn thuộc các chi *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Salmonella* và một số loại virus.

+ Swerosid được chứng minh có tác dụng bảo vệ gan.

+ Các nghiên cứu cũng cho thấy Kim ngân có tác dụng ngăn cản sự tích tụ mỡ ở bụng.

+ Kim ngân được dùng chủ yếu để trị các viêm nhiễm đường hô hấp trên như viêm amydan, viêm họng, viêm thanh quản. Ngoài ra còn được dùng để điều trị viêm da, mụn nhọt, sưng vú, viêm ruột thừa; trị lý trực trùng, viêm màng kết do siêu vi, cúm.

- Cách dùng, liều lượng: 6-15g có thể đến 30g [50],[51].

1.7.3. Đinh lăng (*Radix Polysciacis*)



Ảnh 1.3. Đinh lăng (*Radix Polysciacis*)

- Tên khoa học: *Radix Polysciacis*

- Bộ phận dùng là Rễ đã phơi hay sấy khô của cây Đinh lăng [*Polyscias fruticosa* (L.) Harms], họ Nhân sâm (*Araliaceae*).

- Tính vị, quy kinh: Ngọt, bình. Quy vào kinh phế, tỳ, thận.

- Công năng, chủ trị: Bổ khí, lợi sữa, giải độc. Chủ trị: Suy nhược cơ thể và suy nhược thần kinh, tiêu hóa kém, ngủ kém, phụ nữ sau đẻ ít sữa.

- Thu hái và chế biến: Thu hái, rửa sạch đất cát, thái lát, phơi hoặc sấy khô. Thu hoạch rễ vào mùa thu đông sau khi cây trồng trên 5 năm. Đào lấy rễ, rửa sạch, bóc lấy vỏ rễ, thái lát, phơi khô. Đinh lăng sống: Loại bỏ tạp chất,

rửa sạch, phơi hoặc sấy khô. Đinh lăng chế rượu gừng và mật: Tẩm rượu gừng 5% vào Đinh lăng sống, trộn đều cho thấm rượu gừng, sao qua nhỏ lửa. Tẩm thêm Mật ong, trộn đều cho thấm mật rồi sao vàng cho thơm. Dùng 5 L rượu gừng 5% và 5 kg Mật ong cho 100 kg dược liệu.

- Cách dùng, liều lượng: Ngày dùng từ 2g đến 6g, dạng thuốc sắc hoặc thuốc tán bột. Thường phối hợp với một số vị thuốc khác [50],[51].

1.7.4. Sâm đại hành (*Curculigo orchioides* Gaertn)



Ảnh 1.4. Sâm đại hành (*Curculigo orchioides* Gaertn)

- Tên khoa học: *Curculigo orchioides* Gaertn.

- Bộ phận dùng: Thân hành đã phơi hay sấy khô của cây Sâm đại hành (*Eleutherine subaphylla* Gagnep.), họ Lay ơn (*Iridaceae*).

- Tính vị, quy kinh: Cam ôn. Vào các kinh can, tỳ, phế.

- Công năng, chủ trị: Tư âm dương huyết, chi huyết, sinh cơ, chỉ khái, tiêu độc. Chủ trị: Thiếu máu, vàng da, hoa mắt, nhức đầu, mệt mỏi, băng huyết, ho ra máu. Thương tích tụ huyết (giã đắp), ho gà viêm họng, tê bại do suy dinh dưỡng, mụn nhọt, lở ngứa.

- Thu hái và chế biến: Thu hoạch từ cây 1 năm tuổi trở lên. Khi cây tàn lụi, đào lấy thân hành, cắt bỏ phần rễ, lá, rửa sạch thái dọc củ thành lát, phơi hoặc sấy khô (dưới 60°C). Để nguyên miếng hoặc tán bột. Nếu chưa dùng thì sau khi đào củ, rửa sạch đất, để nguyên cả lớp rễ và vỏ ngoài, tách ra từng củ, vùi vào cát ẩm để cho củ lâu khô.

- Cách dùng, liều lượng: Ngày dùng từ 4g đến 12g thuốc sắc, hãm, bột hoặc thuốc viên [50],[51].

1.7.5. Nhân sâm (*Radix Ginseng*)



Ảnh 1.5. Nhân sâm (*Radix Ginseng*)

- Tên khoa học: *Radix Ginseng*.
- Tên khác : Bạch điều sâm, bạch sâm, biệt trúc sâm, Triều tiên sâm.....
- Tính vị, quy kinh: Cam, khô, bình. Vào kinh tỳ, phế, tâm.
- Công năng, chủ trị: Đại bổ nguyên khí, ích huyết, kiện tỳ ích phế, sinh tân, an thần ích trí. Chủ trị: Khí hư muốn thoát, chân tay lạnh, mạch vi, tỳ hư, kém ăn, phế hư ho suyễn; tân dịch thương tổn, miệng khát nước, nội nhiệt tiêu khát, đái tháo, bệnh lâu ngày gây yếu, tâm hồi hộp, suy tim kiệt sức, hay choáng ngất.
- Thành phần hóa học: Saponin: Thành phần chính trong Nhân sâm là các saponin triterpenoid nhóm dammaran gọi chung là ginsenosid. Hàm lượng saponin trong rễ củ chính vào khoảng 3,3%. Ở rễ con hàm lượng saponin có thể tới 6,4%. Rễ sâm trồng có hàm lượng saponin thấp hơn sâm mọc hoang.
- Tác dụng dược lý:
 - Ginsenosid hoặc dịch chiết từ Nhân sâm có những tác dụng sau:
 - Kháng histamin: ngăn ngừa hiện tượng co thắt ruột chó gây ra do tiêm histamin phosphat.
 - + Kháng cholin: giảm co thắt ruột của chuột lang cô lập khi gây co thắt bởi acetyl cholin.

- + Giảm lượng cholesterol của huyết thanh thí nghiệm trên chuột.
- + Tác dụng làm giảm hoạt động nhưng lại làm thức tỉnh, trên chuột làm thí nghiệm thấy nằm nhiều nhưng ngủ ít.
- + Có tác dụng chống stress ở chuột thí nghiệm.
- + Tăng khả năng nhận biết và trí nhớ của chuột.
- + Trên huyết áp có hai giai đoạn nâng và hạ.
- + Tác dụng kích thích tổng hợp ARN trên gan chuột cống nếu tiêm ginsenosid vào màng bụng 4 giờ trước khi tiêm các chất tiền sinh.
- + Tác dụng chuyển glucose thành glycogen, ngăn ngừa hiện tượng giảm glycogen, ATP hoặc creatin phosphat và ngăn ngừa hiện tượng tăng acid lactic và acid pyruvic trong cơ của chuột cống thí nghiệm bằng phương pháp cho chuột bơi, do đó cung cấp nhanh chóng năng lượng cho cơ hoạt động. Ginsenosid có tác dụng tăng sức nếu đưa thuốc vào dạ dày chuột nhắt trắng trước khi làm thí nghiệm cho chuột chạy đến kiệt sức.
- + Tăng bài niệu kèm thải urê.
- + Tăng tác dụng bảo vệ cơ thể đối với bức xạ tốt hơn ionol.
- + Tác dụng giảm sốt, giảm đau do thấp khớp.
- + Tác dụng tăng tính dục, Ginsenosid Rc có tác dụng tăng tính linh động của tinh trùng.
- + Tác dụng kích thích miễn dịch.
- Cách dùng, liều lượng: Ngày dùng từ 4g đến 10g. Dạng thuốc hãm hoặc lấy dịch chiết bằng cách: Thái lát mỏng cho vào chén sứ, thêm ít nước, đậy nắp, đun cách thủy đến khi chiết hết mùi vị.
- Kiên kỵ: Không được dùng phối hợp với Lê lô, Ngũ linh chi [50],[51].

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG, CHẤT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu và phương tiện nghiên cứu

2.1.1. Chất liệu nghiên cứu

Viên nang cứng Liên ngân SK, do công ty cổ phần dược phẩm Santex sản xuất, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Bảng 2.1. Thành phần viên nang cứng Liên ngân SK

STT	Tên vị thuốc	Tên khoa học	Liều (mg)
1	Xuyên tâm liên	<i>Herba Andrographii</i>	180
2	Kim ngân hoa	<i>Flos Lonicerae</i>	180
3	Đình lăng	<i>Radix Polysciacis</i>	50
4	Sâm đại hành	<i>Curculigo orchioides Gaertn</i>	50
5	Nhân sâm	<i>Panax ginseng</i>	40
<i>Tổng</i>			500

Phụ liệu: Chất độn (tinh bột ngô), chất ổn định (calci carbonat, aerosil), chất chống đông vón (Talc, Magnesi stearat) vừa đủ 01 viên.

Liều dùng tính theo mg cao dược liệu trong viên nang cứng. Mỗi viên nang cứng chứa 500 mg cao dược liệu. Dự kiến liều dùng trên người là 6 viên/người/ngày, tương đương 60 mg/kg/ngày. Quy đổi ra liều trên chuột nhắt trắng (hệ số 12) là 720 mg/kg/ngày [52].

Bột thuốc trong viên nang được cho phân tán đều trong nước cất và cho chuột uống qua kim cong đầu tù để đánh giá tính an toàn và tác dụng của mẫu thử.

2.1.2. Hóa chất nghiên cứu

- Hóa chất xét nghiệm sinh hóa của hãng MEDIA, sản xuất tại Italia.
- Hóa chất xét nghiệm huyết học của hãng Human, Đức.

- Kít định lượng IL-2 và TNF- α cho chuột của hãng Invitrogen (Mỹ).
- Cyclophosphamide (CY), β -glucan (Sigma)
- Hematoxylin, Eosin (Sigma) và một số hóa chất làm tiêu bản mô bệnh học khác.

2.1.3. Thiết bị nghiên cứu

- Máy xét nghiệm sinh hoá Biochemical Systems International Srl, Italia, model 3000 Evolution, hóa chất của hãng.
- Máy phân tích huyết học Humancout 30TS, hãng Human, Đức, sử dụng phần mềm phân tích huyết học dành cho chuột thí nghiệm, hóa chất của hãng;
- Cân phân tích 10^{-4} , model CP224S (Sartorius - Đức).
- Máy ly tâm lạnh Microtube (MikRo 22R, Hettich - Đức).
- Máy đo pH (pH metter F-51, Horiba-Kyoto-Nhật Bản).
- Ống nghiệm, bơm tiêm và một số thiết bị, dụng cụ phụ trợ khác.
- Máy ELISA của hãng Bio-Rad (Mỹ).
- Bộ dụng cụ mô 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. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.2.1. Địa điểm nghiên cứu

Bộ môn Dược lý – Học viện Quân y.

2.2.2. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 06/2022 đến tháng 12/2022.

2.3. Động vật nghiên cứu

Chuột nhắt trắng dòng Swiss trưởng thành, khoẻ mạnh, cân nặng 18-20g, số lượng 100 con, cả 2 giống, được sử dụng cho tác dụng tăng cường miễn dịch (50 con) và tác dụng chống huyết khối (50 con).

Động vật do Ban cung cấp động vật thí nghiệm - Học viện Quân y cung cấp, nuôi dưỡng trong điều kiện phòng nuôi động vật thí nghiệm ít nhất 1 tuần trước khi làm thí nghiệm. Chuột được ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động vật nghiên cứu, nước (đun sôi để nguội) uống tự do.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch

2.4.1.1. Thiết kế nghiên cứu

Chuột nhắt trắng 50 con chia thành 5 lô, mỗi lô 10 con.

Lô 1 (chứng): tiêm nước muối sinh lý, uống nước cất.

Lô 2 (mô hình): tiêm CY + uống nước cất.

Lô 3 (β -glucan): tiêm CY + uống β -glucan 250 mg/kg/ngày.

Lô 4 (LNSK liều 1): tiêm CY + uống LNSK 720 mg/kg/ngày.

Lô 5 (LNSK liều 2): tiêm CY + uống LNSK 1440 mg/kg/ngày.

Các lô chuột được tiêm phức mạp cyclophosphamide liều 110mg/kg và liều 150mg/kg vào các thời điểm trước khi bắt đầu uống thuốc 1 ngày và 3 ngày (trùng ứng), theo phương pháp được mô tả bởi JooWanKim và cộng sự (2018) [53]. Lô chứng tiêm phức mạp nước muối sinh lý với cùng thể tích và thời gian như các lô tiêm cyclophosphamide. Sau đó, chuột được cho uống thuốc hoặc nước cất liên tục trong 5 ngày.

2.4.1.2. Các chỉ tiêu nghiên cứu

*** Đánh giá tác dụng của bài thuốc lên sự thay đổi cân nặng cơ thể chuột**

- Sự thay đổi cân nặng cơ thể trong thời gian tiêm phức mạp CY: bằng cân nặng cơ thể ở thời điểm bắt đầu uống thuốc trừ đi cân nặng cơ thể ở ngày tiêm CY liều đầu tiên.

- Sự thay đổi cân nặng cơ thể trong thời gian dùng thuốc: bằng cân nặng cơ thể chuột 12h sau uống thuốc lần cuối trừ đi cân nặng cơ thể chuột ở thời điểm bắt đầu uống thuốc.

- Sự thay đổi cân nặng cơ thể chuột trong toàn bộ thời gian thí nghiệm: bằng cân nặng cơ thể chuột 12h sau uống thuốc lần cuối trừ đi cân nặng cơ thể chuột ở ngày tiêm CY liều đầu tiên.

*** *Đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên sự thay đổi lách, tuyến ức***

- Bộc lộ lách, tuyến ức, lọc sạch các tổ chức xung quanh, dùng gạc thấm khô rồi đem cân. Ghi lại trọng lượng lách, tuyến ức của từng chuột. Tính trọng lượng lách tương đối (TLLTĐ) và trọng lượng tuyến ức tương đối (TLTUTĐ) (được tính là trọng lượng lách, tuyến ức tương ứng với 100g thể trọng chuột).

*** *Đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên các chỉ số huyết học***

Lấy máu hóc mắt làm xét nghiệm huyết học toàn bộ, gồm các chỉ số: số lượng bạch cầu tổng số (WBC), số lượng các loại bạch cầu (neutrophils, NEU; lymphocytes, LYM; monocytes, MONO; eosinophils, EOS; and basophils, BASO), số lượng hồng cầu (RBC), nồng độ hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), số lượng tiểu cầu (PLT).

*** *Đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên các chỉ số cytokine huyết thanh***

Lấy máu hóc mắt của chuột (ngày thứ 6), định lượng IL-2, TNF- α bằng phương pháp ELISA.

Các bước tiến hành ELISA-TNF- α kit: Được thực hiện theo quy trình của hãng Invitrogen (Mỹ), sử dụng kit thử ELISA -TNF- α .

- Xây dựng đường chuẩn: Vì nồng độ cytokine trong huyết thanh chuột là tương đối thấp so với nồng độ dãy chuẩn ban đầu nên cần phải pha loãng dãy chuẩn theo hướng dẫn của hãng.

- Quy trình:

+ Thêm 50 μ l dung dịch phủ giếng Incubation buffer và 50 μ l huyết thanh nghiên cứu, 50 μ l Biotinylated Ms TNF- α vào mỗi giếng, ủ 2 giờ trong tối ở nhiệt độ 37°C.

+ Rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X. Thêm 100 μ l SAV-HRP 1X vào mỗi giếng, ủ tối trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

+ Tiếp tục rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X rồi thêm 100 µl dung dịch Stabilized chromogen vào mỗi giếng (trong điều kiện tối), sau đó tiếp tục ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Khi dung dịch trong giếng chuyển màu xanh thì bỏ sung 100 µl stop solution vào mỗi giếng (trong điều kiện tối). Sau 30 phút, đo mức độ hấp thụ màu OD của mẫu ở bước sóng 450nm.

Các bước tiến hành ELISA Interleukin-2 (IL2) kit: Được thực hiện theo quy trình của hãng Invitrogen (Mỹ), sử dụng kit thử ELISA-IL-2.

- Xây dựng đường chuẩn: Để xây dựng đường chuẩn tương tự kit TNF- α , pha mẫu IL-2 chuẩn theo dãy nồng độ.

- Thêm 50 µl dung dịch phủ giếng Incubation buffer và 50 µl dung dịch mẫu vào mỗi giếng. Bọc giấy bạc, ủ 2 giờ ở nhiệt độ 37°C.

- Rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X. Thêm 100 µl Biotinylated IL-2 vào mỗi giếng, ủ lắ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Tiếp tục rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X rồi thêm 100 µl SAV-HRP 1X vào mỗi giếng. Bọc giấy bạc rồi ủ 45 phút ở nhiệt độ phòng.

- Tiếp tục rửa mỗi giếng 4 lần bằng WBF 1X. Thêm 100 µl dung dịch TMB vào mỗi giếng (trong điều kiện tối), không bọc giấy bạc, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng cho đến khi dịch trong giếng chuyển màu xanh thì thêm 50 µl stop solution vào mỗi giếng (vẫn trong điều kiện tối). Sau 30 phút, đo mức độ hấp thụ màu OD của mẫu ở bước sóng 450nm.

*** *Đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên mô bệnh học lách và tuyến ức***

Làm tiêu bản mô bệnh học nhuộm HE của lách và tuyến ức tất cả các chuột ở các lô, đánh giá so sánh rút ra tác dụng của bài thuốc.

2.4.2. *Đánh giá tác dụng chống huyết khối*

Sử dụng phương pháp được mô tả bởi Ning Ma và cộng sự (2015) [54]

Chuột nhắt trắng khỏe mạnh, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, cân nặng TB 18-20g, 50 con chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con (n=10):

- **Lô 1 (mô hình):** uống nước cất liều 0,2mL/10g TLCT + tiêm phúc mạc k-carragenan liều 10mg/kg TLCT ngày T7.

- **Lô 2 (chứng aspirin):** uống aspirin liều 25mg/kg TLCT trong 7 ngày + tiêm phúc mạc k-carragenan liều 10mg/kg TLCT ngày T7.

- **Lô 3 (LNSK- L1):** uống LNSK 720 mg/kg/ngày trong 7 ngày + tiêm phúc mạc k-carragenan liều 10mg/kg TLCT ngày T7.

- **Lô 4 (LNSK - L2):** uống LNSK 1440 mg/kg/ngày trong 7 ngày + tiêm phúc mạc k-carragenan liều 10mg/kg TLCT ngày T7.

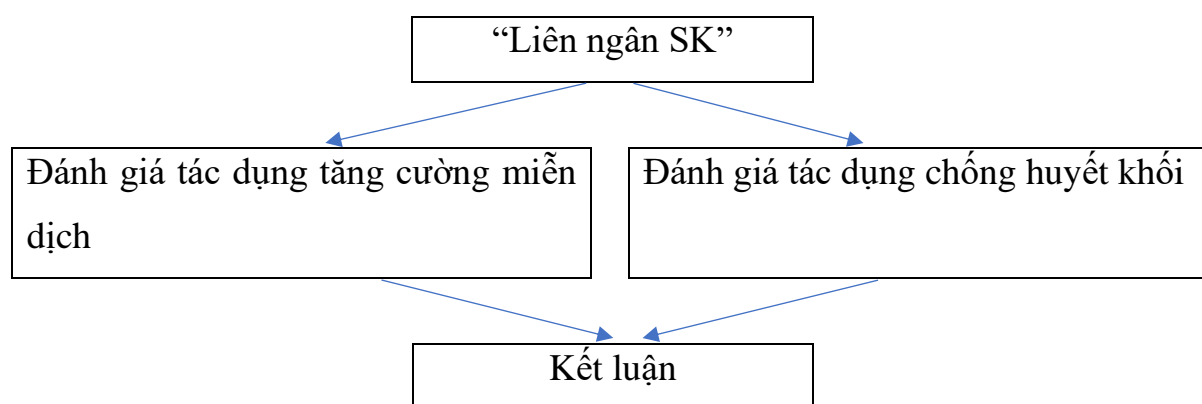
- **Lô 5 (chứng sinh lý):** uống nước cất liều 0,2mL/10g TLCT + tiêm nước muối sinh lý liều 10ml/kg TLCT ngày T7.

Tại ngày thứ 7, sau 1 giờ khi cho chuột uống thuốc liều cuối, chuột được gây huyết khối bằng cách tiêm phúc mạc dung dịch k-carragenan liều 10mg/kg TLCT chuột nhất trắng (riêng lô chứng sinh lý tiêm phúc mạc nước muối sinh lý 10ml/kg TLCT). Quan sát phần trăm huyết khối sau 48 giờ. Phần trăm huyết khối được tính theo công thức:

$$\text{Phần trăm huyết khối (\%)} = \frac{\text{Chiều dài đoạn huyết khối (cm)}}{\text{Chiều dài đuôi (cm)}} \times 100\%$$

Lấy máu chuột xét nghiệm một số chỉ số đông máu: Số lượng tiểu cầu ($*10^3/\mu\text{l}$); Fibrinogen (mg/dl); APTT (giây); PT (giây); TT (giây).

2.5. Sơ đồ nghiên cứu



2.6. Xử lý và phân tích số liệu

Tất cả các số liệu thu được đều được xử lý theo phần mềm excel 2007 và SPSS 20.0, sử dụng thuật toán t-test student và ONE - WAY ANOVA để so sánh giá trị trung bình. Số liệu được trình bày dưới dạng MEAN \pm SD. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.7. 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.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch

3.1.1. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột

Kết quả được trình bày ở bảng 3.1:

Bảng 3.1. Sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột nghiên cứu ($\bar{X} \pm SD$)

Chỉ tiêu đánh giá	n	Lô chuột nghiên cứu				
		Lô chứng	Lô mô hình	Lô β -glucan	LNSK liều 1	LNSK liều 2
Trọng lượng cơ thể ở ngày đầu tiêm CY	10	19,05 $\pm 0,46$	19,08 $\pm 0,42$	19,12 $\pm 0,45$	19,09 $\pm 0,44$	19,15 $\pm 0,47$
Trọng lượng cơ thể ở ngày đầu uống thuốc	10	21,21 $\pm 0,48$	18,14 [▲] $\pm 0,43$	18,15 [▲] $\pm 0,48$	18,20 [▲] $\pm 0,51$	18,18 [▲] $\pm 0,50$
Trọng lượng cơ thể 12h sau uống thuốc lần cuối	10	23,22 $\pm 0,45$	16,91 [▲] $\pm 0,42$	20,36* $\pm 0,44$	20,52* $\pm 0,56$	20,71* $\pm 0,68$
Biến đổi trọng lượng cơ thể trong thời gian tiêm CY	10	2,16 $\pm 0,61$	-0,94 [▲] $\pm 0,68$	-0,97 [▲] $\pm 0,75$	-0,89 [▲] $\pm 0,64$	-0,96 [▲] $\pm 0,69$
Biến đổi trọng lượng cơ thể trong thời gian dùng thuốc	10	2,01 $\pm 0,65$	-1,23 [▲] $\pm 0,68$	2,21* $\pm 0,75$	2,32* $\pm 0,59$	2,63* $\pm 0,62$
Biến đổi trọng lượng cơ thể trong toàn thời gian TN	10	4,17 $\pm 0,32$	-2,17 [▲] $\pm 0,21$	1,24 [▲] * $\pm 0,28$	1,43 [▲] * $\pm 0,36$	1,56 [▲] * $\pm 0,30$

▲: $p < 0,01$ so với lô chứng; *: $p < 0,01$ so với lô mô hình

Nhận xét:

- Trước thí nghiệm, trọng lượng chuột ở các lô là tương đương ($p > 0,05$).
- Biến đổi trọng lượng cơ thể trong thời gian tiêm CY cho thấy: ở các lô tiêm CY trọng lượng chuột giảm rõ rệt so với lô chứng không tiêm CY ($p < 0,01$).

- Biến đổi trọng lượng cơ thể trong thời gian dùng thuốc cũng như biến đổi trọng lượng cơ thể trong toàn thời gian thí nghiệm cho thấy: ở các lô uống thuốc (β -glucan và LNSK cả 2 mức liều), cân nặng cơ thể hồi phục rõ so với lô mô hình không uống thuốc ($p < 0,01$).

- Tác dụng làm hồi phục trọng lượng cơ thể ở lô dùng LNSK liều cao có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng LNSK liều thấp, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Tác dụng làm hồi phục trọng lượng cơ thể ở 2 lô dùng LNSK so với ở lô dùng β -glucan không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.2. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên sự thay đổi trọng lượng lách, tuyến ức

Kết quả được trình bày ở bảng 3.2:

Bảng 3.2. Trọng lượng lách và tuyến ức chuột nghiên cứu ($\bar{X} \pm SD$)

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng tuyệt đối (g)		Trọng lượng tương đối (% so với trọng lượng cơ thể)	
		Lách	Tuyến ức	Lách	Tuyến ức
Lô chứng	10	0,098 $\pm 0,012$	0,042 $\pm 0,006$	0,422 $\pm 0,039$	0,181 $\pm 0,013$
Lô mô hình	10	0,032 [▲] $\pm 0,015$	0,014 [▲] $\pm 0,008$	0,189 [▲] $\pm 0,031$	0,083 [▲] $\pm 0,015$
Lô β -glucan	10	0,042 ^{▲*} $\pm 0,016$	0,025 ^{▲*} $\pm 0,007$	0,206 ^{▲*} $\pm 0,028$	0,123 ^{▲*} $\pm 0,018$
LNSK liều 1	10	0,044 ^{▲*} $\pm 0,015$	0,024 ^{▲*} $\pm 0,006$	0,214 ^{▲*} $\pm 0,025$	0,117 ^{▲*} $\pm 0,012$
LNSK liều 2	10	0,046 ^{▲*} $\pm 0,011$	0,027 ^{▲*} $\pm 0,009$	0,222 ^{▲*} $\pm 0,031$	0,130 ^{▲*} $\pm 0,016$

[▲] : p < 0,01 so với lô chứng; * : p < 0,01 so với lô mô hình

Nhận xét:

- Ở các lô tiêm CY, trọng lượng lách và tuyến ức (cả trọng lượng tuyệt đối và tương đối) đều giảm rõ rệt so với lô chứng không tiêm CY (p < 0,01).

- Trọng lượng lách và tuyến ức (cả trọng lượng tuyệt đối và tương đối) ở các lô uống thuốc (β -glucan và LNSK cả 2 mức liều) hồi phục rõ so với lô mô hình không uống thuốc (p < 0,01).

- Tác dụng làm hồi phục trọng lượng lách và tuyến ức ở lô dùng LNSK liều cao có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng LNSK liều thấp, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

- Tác dụng làm hồi phục trọng lượng lách và tủy ức ở 2 lô dùng LNSK so với ở lô dùng β -glucan không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.3. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên các chỉ số huyết học

3.1.3.1. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên số lượng và công thức bạch cầu chuột nghiên cứu

Kết quả được trình bày ở bảng 3.3:

Bảng 3.3. Kết quả đánh giá số lượng và công thức bạch cầu ($\bar{x} \pm SD$)

Lô nghiên cứu	n	Số lượng bạch cầu (G/L)	Công thức bạch cầu				
			NEU (%)	LYM (%)	MONO (%)	EOS (%)	BASO (%)
Lô chứng	10	7,56 $\pm 0,26$	75,05 $\pm 1,26$	18,61 $\pm 0,80$	5,24 $\pm 0,62$	0,52 $\pm 0,05$	0,58 $\pm 0,17$
Lô mô hình	10	0,48 [▲] $\pm 0,05$	74,83 $\pm 1,10$	18,82 $\pm 0,59$	5,28 $\pm 0,83$	0,51 $\pm 0,02$	0,56 $\pm 0,09$
Lô β -glucan	10	1,35 ^{▲*} $\pm 0,12$	74,81 $\pm 0,74$	18,80 $\pm 0,72$	5,32 $\pm 0,27$	0,54 $\pm 0,04$	0,53 $\pm 0,13$
LNSK liều 1	10	1,32 ^{▲*} $\pm 0,15$	74,36 $\pm 1,70$	19,28 $\pm 1,26$	5,26 $\pm 0,68$	0,56 $\pm 0,07$	0,54 $\pm 0,18$
LNSK liều 2	10	1,41 ^{▲*} $\pm 0,18$	74,24 $\pm 1,38$	19,17 $\pm 1,06$	5,50 $\pm 0,78$	0,57 $\pm 0,09$	0,52 $\pm 0,11$

▲: $p < 0,01$ so với lô chứng; *: $p < 0,01$ so với lô mô hình

Nhận xét:

- Ở các lô tiêm CY, số lượng bạch cầu giảm rõ rệt so với lô chứng không tiêm CY ($p < 0,01$). Công thức bạch cầu không có sự thay đổi nhiều giữa các lô ($p > 0,05$).

- Số lượng bạch cầu ở các lô uống thuốc (β -glucan và LNSK cả 2 mức liều) hồi phục rõ so với lô mô hình không uống thuốc ($p < 0,01$).

- Tác dụng làm hồi phục số lượng bạch cầu ở lô dùng LNSK liều cao có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng LNSK liều thấp, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Tác dụng làm hồi phục số lượng bạch cầu ở 2 lô dùng LNSK so với ở lô dùng β -glucan không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.3.2. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên một số chỉ tiêu huyết học khác

Kết quả được trình bày ở bảng 3.4:

Bảng 3.4. Kết quả đánh giá số một số chỉ tiêu huyết học khác ($\bar{X} \pm SD$)

Lô nghiên cứu	n	Số lượng hồng cầu (T/L)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fl)	Số lượng tiểu cầu (G/L)
Lô chứng	10	8,96 $\pm 0,89$	19,16 $\pm 1,69$	47,72 $\pm 1,97$	51,24 $\pm 2,01$	698,65 $\pm 86,62$
Lô mô hình	10	5,45 [▲] $\pm 0,72$	14,52 [▲] $\pm 1,83$	40,06 [▲] $\pm 1,38$	51,18 \pm 3,15	428,53 [▲] \pm 62,39
Lô β -glucan	10	7,16 ^{▲*} $\pm 0,81$	17,34 ^{▲*} $\pm 1,56$	43,51 ^{▲*} $\pm 1,84$	51,26 $\pm 2,96$	599,64* $\pm 96,8$
LNSK liều 1	10	7,12 ^{▲*} $\pm 0,64$	17,26 ^{▲*} $\pm 1,91$	43,39 ^{▲*} $\pm 2,03$	51,31 $\pm 2,17$	635,75* $\pm 89,56$
LNSK liều 2	10	7,24 ^{▲*} $\pm 0,69$	17,41 ^{▲*} $\pm 1,75$	44,60 ^{▲*} $\pm 2,13$	51,29 $\pm 2,26$	659,91* $\pm 93,17$

▲ : $p < 0,01$ so với lô chứng; *: $p < 0,01$ so với lô mô hình

Nhận xét:

- Ở lô mô hình tiêm CY, số lượng hồng cầu, Hb, Hct và số lượng tiểu cầu giảm rõ rệt so với lô chứng không tiêm CY ($p < 0,01$). Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) không có sự thay đổi nhiều giữa các lô ($p > 0,05$).

- Số lượng hồng cầu, Hb, Hct và số lượng tiểu cầu ở các lô uống thuốc (β -glucan và LNSK cả 2 mức liều) hồi phục rõ so với lô mô hình không uống thuốc ($p < 0,01$).

- Tác dụng làm hồi phục số lượng hồng cầu, Hb, Hct và số lượng tiểu cầu ở lô dùng LNSK liều cao có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng LNSK liều thấp, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Tác dụng làm hồi phục số lượng hồng cầu, Hb, Hct và số lượng tiểu cầu ở 2 lô dùng LNSK so với ở lô dùng β -glucan không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.4. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên các chỉ số cytokine huyết thanh

Kết quả được trình bày ở bảng 3.5:

Bảng 3.5. Kết quả đánh giá nồng độ một số cytokine huyết thanh chuột ($\bar{X} \pm SD$)

Lô nghiên cứu	n	IL-2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Lô chứng	10	102,35 \pm 9,84	264,81 \pm 16,39
Lô mô hình	10	45,98 [▲] \pm 3,96	80,35 [▲] \pm 9,92
Lô β -glucan	10	69,16 ^{▲*} \pm 4,02	163,52 ^{▲*} \pm 14,76
LNSK liều 1	10	65,94 ^{▲*} \pm 5,31	159,86 ^{▲*} \pm 15,64
LNSK liều 2	10	72,49 ^{▲*} \pm 6,15	168,48 ^{▲*} \pm 16,71

▲ : $p < 0,01$ so với lô chứng; *: $p < 0,01$ so với lô mô hình

Nhận xét:

- Ở lô mô hình tiêm CY, nồng độ IL-2 và TNF- α huyết thanh chuột giảm rõ rệt so với lô chứng không tiêm CY ($p < 0,01$).

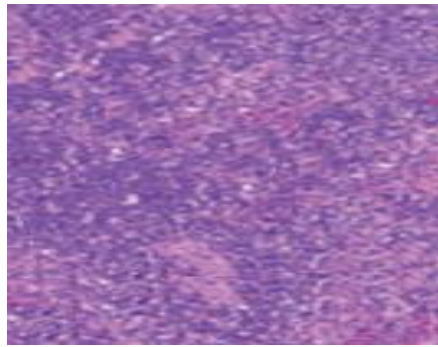
- Nồng độ IL-2 và TNF- α huyết thanh chuột ở các lô uống thuốc (β -glucan và LNSK cả 2 mức liều) hồi phục rõ so với lô mô hình không uống thuốc ($p < 0,01$).

- Tác dụng làm hồi phục nồng độ IL-2 và TNF- α huyết thanh chuột ở lô dùng LNSK liều cao có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng LNSK liều thấp, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

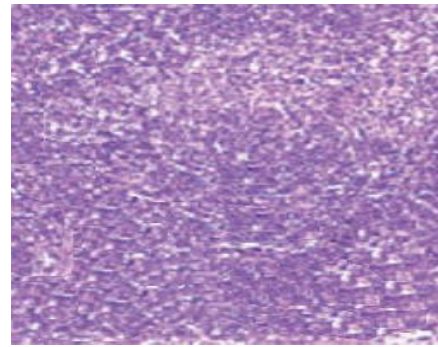
- Tác dụng làm hồi phục nồng độ IL-2 và TNF- α huyết thanh chuột ở 2 lô dùng LNSK đều có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng β -glucan, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.1.5. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên mô bệnh học lách và tuyến ức

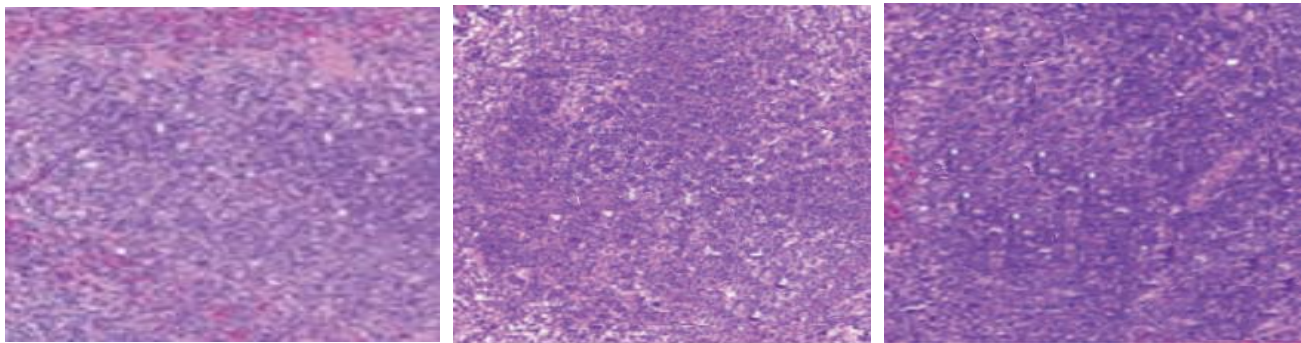
3.1.5.1. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên mô bệnh học lách



Lô chứng



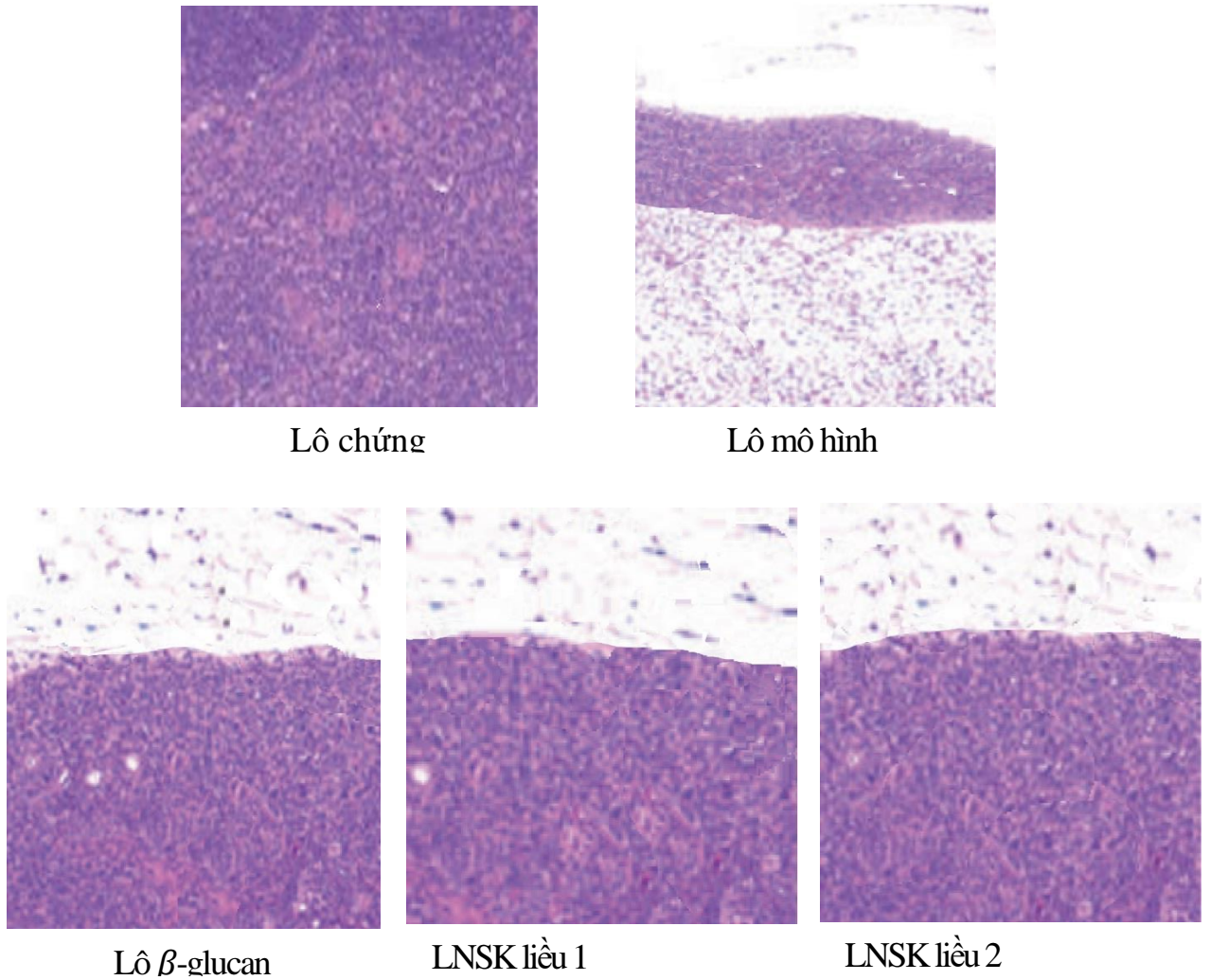
Lô mô hình



Ảnh 3.1. Hình ảnh mô bệnh học lách chuột ở các lô nghiên cứu

Nhận xét: Hình ảnh mô bệnh học lách chuột ở lô mô hình cho thấy giảm đáng kể các tế bào sản sinh bạch cầu vùng tủy trắng của lách. Sự hồi phục nhìn thấy rõ ở các lô dùng Liên ngân SK và lô dùng β -glucan.

3.1.5.2. Kết quả đánh giá tác dụng của Liên ngân SK lên mô bệnh học tuyến ức



Ảnh 3.2. Hình ảnh mô bệnh học tuyến ức của chuột ở các lô nghiên cứu

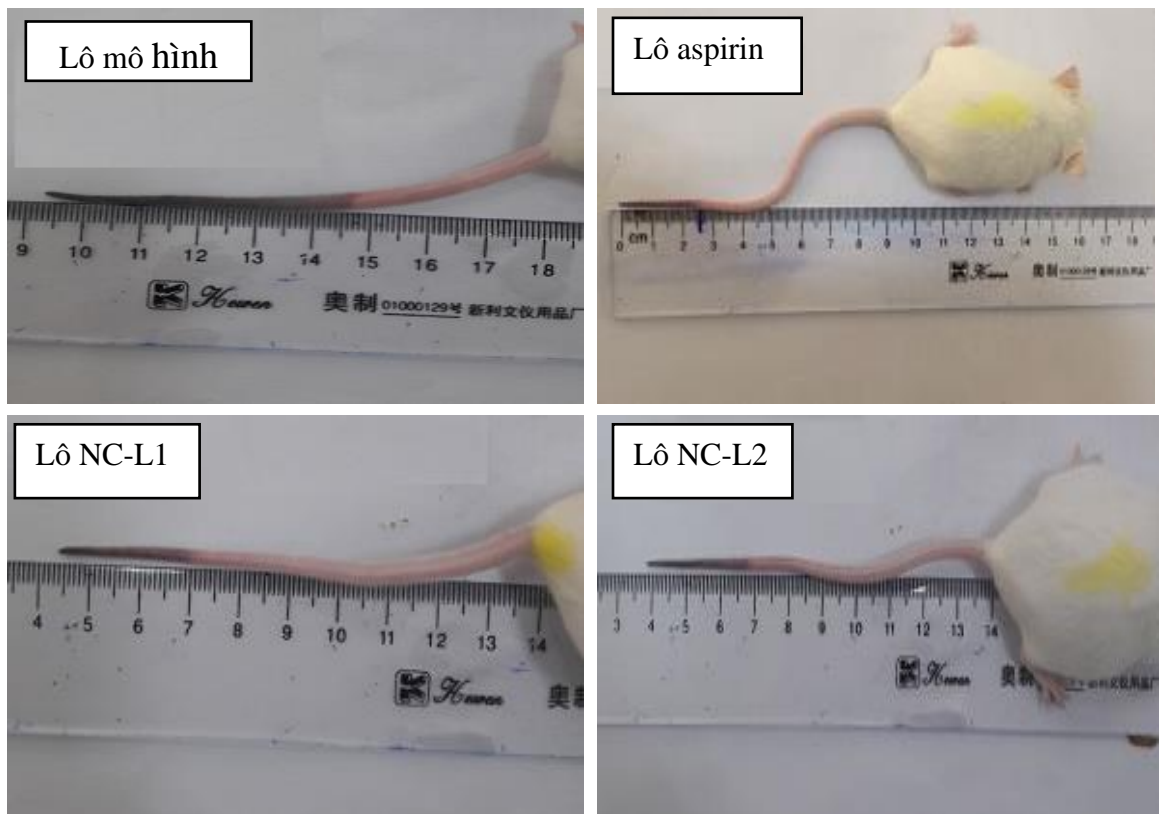
Nhận xét: hình ảnh mô bệnh học tuyến ức chuột ở lô mô hình cho thấy giảm đáng kể các tế bào sản sinh bạch cầu vùng rìa. Sự hồi phục nhìn thấy rõ ở các lô dùng Liên ngân SK và lô dùng β -glucan.

3.2. Kết quả đánh giá tác dụng chống huyết khối

3.2.1. Kết quả hình thành huyết khối đuôi chuột

Sau 24 giờ tiêm phúc mạc dung dịch k-carragenan quan sát đuôi chuột bị sưng và có màu đỏ, tuy nhiên ranh giới chưa rõ ràng. Quan sát thấy các chuột ở lô mô hình có chiều dài phần đuôi chuột sưng, chuyển màu đỏ dài hơn so với ở các lô dùng Liên ngân SK và lô dùng aspirin. Tuy nhiên do ranh giới chưa rõ ràng nên chưa đo chiều dài của đoạn đuôi chuyển màu.

Sau 48 giờ, đuôi chuột có màu đỏ mận, ranh giới rõ ràng, dễ nhận biết (ảnh 3), sau đó một phần đuôi trở nên hoại tử. Chúng tôi có sự hình thành huyết khối ở đuôi chuột. Riêng lô chứng sinh lý không có chuột nào có huyết khối đuôi.



Ảnh 3. Huyết khối đuôi chuột gây bởi κ -carrageenan tiêm phúc mạc

3.2.2. Kết quả đánh giá huyết khối đuôi chuột sau 48h

Kết quả được trình bày ở bảng 3.6:

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của LNSK đến sự hình thành huyết khối

Lô	n	Phần trăm huyết khối sau 48 giờ (%)	Phần trăm giảm so với lô mô hình (%)	p
Mô hình (1)	10	48,89 ± 15,88	-	$p_{3,4-1} < 0,01$ $p_{2-1} < 0,001$; $p_{3,4-2} > 0,05$ $p_{4-3} > 0,05$
Chứng aspirin (2)	10	23,12 ± 10,27	52,71	
LNSK - L1 (3)	10	31,36 ± 10,46	35,85	
LNSK - L2 (4)	10	28,86 ± 10,68	40,98	

Nhận xét:

- So với lô mô hình, phần trăm huyết khối đuôi chuột sau 48 giờ ở các lô dùng aspirin, liên ngân SK liều 1 và liều 2 trên chuột nhất trắng đều giảm rõ (giảm so với lô mô hình là 52,71%; 35,85 %; và 40,98 %, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{2-1} < 0,001$ và $p_{3,4-1} < 0,01$).

- So với lô chứng dùng aspirin, phần trăm huyết khối đuôi chuột ở hai lô dùng liên ngân SK lớn hơn không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh giữa 2 lô dùng liên ngân SK ở 2 mức liều, lô dùng liều cao có phần trăm huyết khối đuôi chuột giảm rõ hơn, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.3. Kết quả đánh giá số lượng tiểu cầu và Fibrinogen trong máu chuột

Kết quả được trình bày ở bảng 3.7 và bảng 3.8:

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của LNSK đến số lượng tiểu cầu (G/L) trong máu chuột

Lô	n	Số lượng tiểu cầu (G/L)	% tăng so với (1)	% giảm so với (5)	p
Mô hình (1)	10	475,64 ± 93,61	-	24,73	$p_{1-5} < 0,05$ $p_{2,3,4-5} < 0,05$ $p_{2,3,4-1} > 0,05$ $p_{3,4-2} > 0,05$ $p_{4-3} > 0,05$
Chứng aspirin (2)	10	456,83 ± 98,92	3,95	27,71	
LNSK - L1 (3)	10	469,75 ± 105,16	1,24	25,66	
LNSK - L2 (4)	10	462,43 ± 112,85	2,78	26,82	
Chứng sinh lý (5)	10	631,92 ± 116,85	-	-	

Nhận xét:

- So với lô chứng sinh lý, số lượng tiểu cầu trong máu chuột ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều giảm. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- So với lô mô hình, số lượng tiểu cầu trong máu chuột ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhất trắng đều giảm không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So với lô chứng dùng aspirin, số lượng tiểu cầu trong máu chuột ở hai lô dùng LNSK khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh giữa 2 lô dùng liên ngân SK ở 2 mức liều, số lượng tiểu cầu trong máu chuột ở 2 lô này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của LNSK đến Fibrinogen (mg/L) trong máu chuột

Lô	n	Fibrinogen (mg/L)	% giảm so với (1)	% tăng so với (5)	p
Mô hình (1)	10	3,41 ± 0,09	-	86,34	p ₁₋₅ < 0,001 p _{2,3,4-5} < 0,01 p _{2,3,4-1} < 0,01 p _{3,4-2} > 0,05 p ₄₋₃ > 0,05
Chứng aspirin (2)	10	2,56 ± 0,05	24,93	39,89	
LNSK - L1 (3)	10	2,81 ± 0,06	17,60	53,55	
LNSK - L2 (4)	10	2,72 ± 0,04	20,23	48,63	
Chứng sinh lý (5)	10	1,83 ± 0,03	-	-	

Nhận xét:

- So với lô chứng sinh lý, Fibrinogen trong máu chuột ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều tăng cao (tăng so với lô chứng sinh lý là 86,34%; 39,89%; 53,55%; và 48,63%, tương ứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{1-5} < 0,001$, $p_{2,3,4-5} < 0,01$).

- So với lô mô hình, Fibrinogen trong máu chuột ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhắt trắng đều giảm rõ (giảm so với lô mô hình là 24,93%; 17,60%; và 20,23%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{2-1} < 0,001$ và $p_{3,4-1} < 0,01$).

- So với lô chứng dùng aspirin, Fibrinogen trong máu chuột ở hai lô dùng LNSK lớn hơn không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh giữa 2 lô dùng liên ngân SK ở 2 mức liều, lô dùng liều cao có phần trăm huyết khối đuôi chuột giảm rõ hơn, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.4. Kết quả đánh giá thời gian đông máu APTT (giây); PT (giây); TT (giây)

Kết quả được trình bày ở bảng 3.9, bảng 3.10 và bảng 3.11:

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của LNSK đến thời gian đông máu APTT (giây)

Lô	n	Thời gian APTT (giây)	% tăng so với (1)	% giảm so với (5)	p
Mô hình (1)	10	30,54 ± 0,36	-	15,12	$p_{1-5} < 0,01$
Chứng aspirin (2)	10	34,52 ± 0,29	13,03	4,06	$p_{2,3,4-5} < 0,05$
LNSK - L1 (3)	10	32,96 ± 0,32	7,92	8,39	$p_{2,3,4-1} < 0,05$
LNSK - L2 (4)	10	33,75 ± 0,35	10,51	6,20	$p_{3,4-2} > 0,05$
Chứng sinh lý (5)	10	35,98 ± 0,37	-	-	$p_{4-3} > 0,05$

Nhận xét:

- So với lô chứng sinh lý, thời gian đông máu APTT ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều giảm (giảm so với lô chứng sinh lý là 15,12%; 4,06%; 8,39%; và 6,20%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{1-5} < 0,01$, $p_{2,3,4-5} < 0,05$).

- So với lô mô hình, thời gian đông máu APTT ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhắt trắng đều tăng (tăng so với lô mô hình là 13,03%; 7,92%; và 10,51%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- So với lô chứng dùng aspirin, thời gian đông máu APTT ở hai lô dùng LNSK nhỏ hơn không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh giữa 2 lô dùng liên ngân SK ở 2 mức liều, lô dùng liều cao có thời gian đông máu APTT kéo dài hơn, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của LNSK đến thời gian đông máu PT (giây)

Lô	n	Thời gian PT (giây)	% tăng so với (1)	% giảm so với (5)	p
Mô hình (1)	10	13,29 ± 0,43	-	23,80	$p_{1-5} < 0,01$
Chứng aspirin (2)	10	16,31 ± 0,36	22,17	6,91	$p_{2,3,4-5} < 0,05$
LNSK - L1 (3)	10	15,16 ± 0,54	13,56	13,47	$p_{2,3,4-1} < 0,05$
LNSK - L2 (4)	10	15,98 ± 0,41	19,70	8,79	$p_{3,4-2} > 0,05$
Chứng sinh lý (5)	10	17,92 ± 0,39	-	-	$p_{4-3} > 0,05$

Nhận xét:

- So với lô chứng sinh lý, thời gian đông máu PT ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều giảm (giảm so với lô chứng sinh lý là 23,80%; 6,91%; 13,47%; và 8,79%, tương ứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{1-5} < 0,01$, $p_{2,3,4-5} < 0,05$).

- So với lô mô hình, thời gian đông máu PT ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhắt trắng đều tăng (tăng so với lô mô hình là 22,17%; 13,56%; và 19,70%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- So với lô chứng dùng aspirin, thời gian đông máu PT ở hai lô dùng LNSK nhỏ hơn không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh giữa 2 lô dùng liên ngân SK ở 2 mức liều, lô dùng liều cao có thời gian đông máu PT kéo dài hơn, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của LNSK đến thời gian đông máu TT (giây)

Lô	n	Thời gian TT (giây)	% tăng so với (1)	% giảm so với (5)	p
Mô hình (1)	10	16,85 ± 0,28	-	21,15	$p_{1-5} < 0,01$
Chúng aspirin (2)	10	19,68 ± 0,52	16,80	7,91	$p_{2,3,4-5} < 0,05$
LNSK - L1 (3)	10	18,91 ± 0,39	12,23	11,51	$p_{2,3,4-1} < 0,05$
LNSK - L2 (4)	10	19,23 ± 0,41	14,12	10,01	$p_{3,4-2} > 0,05$
Chúng sinh lý (5)	10	21,37 ± 0,46	-	-	$p_{4-3} > 0,05$

Nhận xét:

- So với lô chứng sinh lý, thời gian đông máu TT ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều giảm (giảm so với lô chứng sinh lý là 21,15%; 7,91%; 11,51%; và 10,01%, tương ứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{1-5} < 0,01$, $p_{2,3,4-5} < 0,05$).

- So với lô mô hình, thời gian đông máu TT ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhắt trắng đều tăng (tăng so với lô mô hình là 16,80%; 12,23%; và 14,12%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- So với lô chứng dùng aspirin, thời gian đông máu TT ở hai lô dùng LNSK nhỏ hơn không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- So sánh giữa 2 lô dùng liên ngân SK ở 2 mức liều, lô dùng liều cao có thời gian đông máu TT kéo dài hơn, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của viên nang Liên ngân SK trên động vật thực nghiệm

4.1.1. Mô hình gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid

Đa số các chất kích thích miễn dịch thể hiện rõ tác dụng trên hệ thống miễn dịch bị tổn thương hơn là hệ miễn dịch bình thường. Vì vậy, để nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của một chất, người ta thường tiến hành nghiên cứu trên hệ miễn dịch đã bị suy yếu. Hoạt động của hệ miễn dịch chống lại tác nhân gây bệnh bao gồm vai trò của 2 hàng rào: đáp ứng miễn dịch tự nhiên và miễn dịch đặc hiệu (miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào). Sự suy giảm miễn dịch xảy ra khi 2 hàng rào bảo vệ này bị tổn thương [55],[56].

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 [57],[58],[59].

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 [60]. 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 [61],[62]. 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 [57]. 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 5 ngày sau tiêm CY.

Như vậy, mô hình gây tổn thương hệ miễn dịch bằng tiêm màng bụng CY liều 110mg/kg và liều 150mg/kg vào các thời điểm trước khi bắt đầu uống thuốc 1 ngày và 3 ngày (tương ứng) và tiến hành xét nghiệm sau 5 ngày tiêm CY là phù hợp và đã được áp dụng trong nghiên cứu này.

4.1.2. Lựa chọn chứng dương

β -Glucan là chuỗi của các liên phân tử đường D (D-glucose), tạo nên bởi liên kết loại β -glycoside. Vòng 6 D-glucose có thể gắn với phân tử khác theo các vị trí khác nhau của cấu trúc vòng D-glucose. Một vài hợp chất β -Glucan lại có cấu tạo lặp lại của cấu trúc vòng D-glucose gắn tại một vị trí đặc biệt [63],[64].

β -glucan được biết đến như là chất bổ sung sinh học nhờ vào khả năng kích thích hệ thống kháng thể. Các nghiên cứu đã phát hiện ra ảnh hưởng của β -glucan trên các lớp cholesterol LDL, làm lành vết thương, kháng khuẩn và hình thành khối u. β -glucan còn được cho là có công dụng kích thích hệ miễn dịch tự nhiên, tăng cường sức khỏe hô hấp. β -glucan giúp tăng cường hoạt

động của các đại thực bào và kích thích tăng tiết nhiều cytokines (chất hoạt hóa tế bào) nhằm tiêu diệt các mầm bệnh xâm nhập từ bên ngoài, giúp giảm hệ số chuyển đổi thức ăn, kích thích tiêu hóa, phòng các bệnh đường ruột, nhiễm trùng do vi khuẩn, vi rút [63],[64].

Theo các nghiên cứu trước đây, β -glucan, một polysaccharit điều hòa miễn dịch đã được chứng minh rõ ràng, ở liều 250 mg/kg đã được sử dụng làm thuốc tham chiếu [65],[66]. Mười hai giờ sau lần uống cuối cùng (thứ tư) 125, 250 và 500 mg/kg MHFe hoặc 250 mg/kg β -glucan, những thay đổi về trọng lượng cơ thể, tuyến ức, lá lách và hạch bạch huyết dưới hàm (LN), 13 thông số huyết học, nồng độ interferon- (IFN-) γ trong huyết thanh, hoạt động của tế bào giết tự nhiên (NK) phúc mạc và lách, và yếu tố hoại tử khối u lách- (TNF-) α , interleukin- (IL-) 1 β , và nồng độ IL-10 được theo dõi bằng mô bệnh học của các cơ quan bạch huyết.

Trên cơ sở đó, chúng tôi chọn β -glucan liều 250 mg/kg/ngày 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.

4.1.3. Về tác dụng của LNSK lên sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột

Kết quả chúng tôi cho thấy: ở các lô tiêm CY trọng lượng chuột giảm rõ rệt so với lô chứng không tiêm CY ($p < 0,01$). Biến đổi trọng lượng cơ thể trong thời gian dùng thuốc cũng như biến đổi trọng lượng cơ thể trong toàn thời gian thí nghiệm cho thấy: ở các lô uống thuốc (β -glucan và LNSK cả 2 mức liều), cân nặng cơ thể hồi phục rõ so với lô mô hình không uống thuốc ($p < 0,01$). Trong đó, tác dụng làm hồi phục trọng lượng cơ thể ở lô dùng LNSK liều cao có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng LNSK liều thấp, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, Liên ngân SK có tác dụng hồi phục cơ thể.

4.1.4. Về tác dụng của LNSK lên sự thay đổi trọng lượng lách, tuyến ức

Trọng lượng lách, tuyến ức 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 [55],[56].

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

Tuyến ức là cơ quan lympho trung ương, đảm nhiệm chức năng huấn luyện, phân chia và biệt hóa các tế bào lympho T. Tế bào lympho trong tuyến ức là từ tủy xương di cư tới. Tuyến ức đã tạo một vi môi trường thuận lợi để các tế bào lympho này biệt hóa thành dòng tế bào lympho T [55],[56]. 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 các lô tiêm CY, trọng lượng lách và tuyến ức (cả trọng lượng tuyệt đối và tương đối) đều giảm rõ rệt so với lô chứng không tiêm CY ($p < 0,01$). Trọng lượng lách và tuyến ức (cả trọng lượng tuyệt đối và tương đối) ở các lô uống thuốc (β -glucan và LNSK cả 2 mức

liều) hồi phục rõ so với lô mô hình không uống thuốc ($p < 0,01$). Tác dụng làm hồi phục trọng lượng lách và tuyến ức ở lô dùng LNSK liều cao (1440 mg/kg/ngày) có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng LNSK liều thấp (720 mg/kg/ngày), tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tác dụng làm hồi phục trọng lượng lách và tuyến ức ở 2 lô dùng LNSK so với ở lô dùng β -glucan không có sự khác biệt 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 [57],[58],[59]. 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.

Liên ngân SK các liều làm tăng trọng lượng lách và tuyến ức (cả trọng lượng tuyệt đối và tương đối) so với lô mô hình, mức tăng phụ thuộc vào liều: Liên ngân SK liều 1440 mg/kg/ngày làm tăng trọng lượng cơ quan lympho nhiều hơn so với lô Liên ngân SK liều 720 mg/kg/ngày. Sự tăng trọng lượng lách và tuyến ức (cả trọng lượng tuyệt đối và tương đối) ở lô dùng Liên ngân SK cả 2 liều so với lô mô hình là do tăng số lượng của các lympho bào và kích thước của 2 cơ quan này, thể hiện rõ trên kết quả giải phẫu vi thể: (1) Trên cấu trúc vi thể lách, hình ảnh mô bệnh học lách chuột ở lô mô hình cho thấy giảm đáng kể các tế bào sản sinh bạch cầu vùng tủy trắng của lách. Sự hồi phục nhìn thấy rõ ở các lô dùng Liên ngân SK và lô dùng β -glucan (ảnh 3.1); (2) Trên cấu trúc vi thể tuyến ức, hình ảnh mô bệnh học tuyến ức chuột ở lô mô hình cho thấy giảm đáng kể các tế bào sản sinh bạch cầu vùng rìa. Sự hồi phục nhìn thấy rõ ở các lô dùng Liên ngân SK và lô dùng β -glucan (ảnh 3.2). Như vậy, Liên ngân SK làm tăng trọng lượng các cơ quan lympho (lách và tuyến ức) ở chuột nhất trắng bị gây suy giảm miễn dịch bằng CY do làm tăng số lượng lympho bào và kích thước của các tổ chức này.

4.1.5. Về tác dụng của LNSK lên các chỉ số huyết học

* 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 [57].

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 [57],[59]. 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 ($p < 0,01$). Trong đó, lô mô hình (chỉ tiêm CY), số lượng bạch cầu chung giảm mạnh nhất. Ở lô uống β -glucan, Liên ngân SK 2 liều (1440 mg/kg/ngày và 720 mg/kg/ngày), số lượng bạch cầu chung trong máu ngoại vi tăng có ý nghĩa so với lô mô hình ($p < 0,01$). Tác dụng làm hồi phục số lượng bạch cầu ở lô dùng Liên ngân SK liều cao có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng Liên ngân SK liều thấp, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả này chỉ ra tác dụng kích thích miễn dịch của β -glucan và Liên ngân SK trên tế bào gốc tạo máu trong tủy xương, từ đó làm cải thiện số lượng bạch cầu chung trong máu ngoại vi.

* 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 [55],[56],[57]. 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 phân 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, ... [55],[56].

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, công thức bạch cầu không có sự thay đổi nhiều giữa các lô ($p > 0,05$). Các loại bạch cầu lympho, bạch cầu ưa axit (EOS) và bạch cầu mono tăng so với lô mô hình ($p > 0,05$). Kết quả này cho thấy Liên ngân SK có tác dụng kích thích miễn dịch, đặc biệt trên đáp ứng miễn dịch đặc hiệu (gồm có 2 loại là đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào).

** Một số chỉ tiêu huyết học khác*

Kết quả của chúng tôi thấy ở lô mô hình tiêm CY, số lượng hồng cầu, Hb, Hct và số lượng tiểu cầu giảm rõ rệt so với lô chứng không tiêm CY ($p < 0,01$). Thê

tích trung bình hồng cầu (MCV) không có sự thay đổi nhiều giữa các lô ($p > 0,05$). Số lượng hồng cầu, Hb, Hct và số lượng tiểu cầu ở các lô uống thuốc (β -glucan và LNSK cả 2 mức liều) hồi phục rõ so với lô mô hình không uống thuốc ($p < 0,01$). Tác dụng làm hồi phục số lượng hồng cầu, Hb, Hct và số lượng tiểu cầu ở lô dùng LNSK liều cao có xu hướng cao hơn so với ở lô dùng LNSK liều thấp, tuy nhiên khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

4.1.6. Về tác dụng của LNSK lên các chỉ số cytokine huyết thanh

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 [55].

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, ... [56]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn định lượng cytokin trong máu để đánh giá đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, và 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...[55].

Kết quả nghiên cứu cho thấy CY có xu hướng làm giảm nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi so với lô chứng sinh học. Đồng thời, CY làm giảm rõ rệt nồng độ TNF- α , nguyên nhân có thể là do CY tăng cường quá trình chết theo chu trình của tế bào nội mô chuột nhất, mà TNF- α có vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa quá trình này [67]. Liên ngân SK ở cả 2 liều có tác dụng làm tăng nồng độ IL-2 và làm tăng TNF- α so với lô mô hình. Như vậy, Liên ngân SK ở cả 2 liều có tác dụng kích thích đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua làm tăng IL-2 và làm tăng TNF- α .

4.1.7. Ảnh hưởng của Liên ngân SK trên các chỉ số miễn dịch theo YHCT

Theo quan điểm của YHCT, hệ thống miễn dịch của cơ thể liên quan chặt chẽ với chính khí của cơ thể. Chính khí của cơ thể bao gồm khí, huyết, âm, dương [68],[69]. Khi chính khí bất túc, Khí huyết âm dương hư suy thì hệ thống miễn dịch của cơ thể sẽ bị ảnh hưởng.

Vì vậy, Liên ngân SK với công dụng bổ khí dưỡng huyết bổ thận sinh tinh có tác dụng nâng cao chính khí; nên Liên ngân SK sẽ có tác dụng tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Liên ngân SK có tác dụng trên các chỉ số miễn dịch làm tăng rõ rệt trọng lượng cơ thể

chuột, trọng lượng lách và tuyến ức, các chỉ số huyết học (bạch cầu, hồng cầu, hemoglobin, hematocrit), các cytokine huyết thanh (IL-2 và TNF-alpha) so với lô mô hình ($p < 0,01$).

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

Nhân sâm được biết đến từ lâu với vai trò là một chất điều biến miễn dịch. Rễ, thân và lá của Nhân sâm và chiết xuất của chúng đã được chứng minh có vai trò kích thích cả hệ miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu. Các polysaccharid cô lập từ Nhân sâm giúp tăng tiết TNF- α và cải thiện chức năng của các tế bào NK. Chiết xuất từ Nhân sâm làm tăng tăng tiết kháng thể lưu hành trong máu như IgM, IgG và IgA khi có sự xâm nhập của kháng nguyên gây bệnh [70]. Đặng Kim Thoa (2017) nghiên cứu Đinh lăng có hoạt tính chống oxy hóa của rễ cây Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) trồng tại An Giang cho thấy phân đoạn ethyl acetat (có chứa Alkaloid, flavonoid, anthocyanoid, proanthocyanidin, saponin, acid hữu cơ, chất khử) có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất trong các phân đoạn khác trong rễ Đinh lăng [71]. Trong thành phần Sâm đại hành có sự hiện diện của flavonoid, anthraquinone/glycoside tim, saponin, tannin và phytosterol (Khandelwal; 2003). Sâm đại hành có tác dụng chống oxy hóa nghiên cứu trên mô hình Chống oxy hóa in-vitro [72].

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

4.2. Đánh giá tác dụng chống huyết khối của viên nang Liên ngân SK trên động vật thực nghiệm

Sự hoạt hóa tiểu cầu đóng một vai trò chủ chốt trong bệnh sinh vữa xơ động mạch, bệnh tim mạch và trong quá trình hình thành huyết khối, và sự

kết hợp tiểu cầu được gây bởi các chất chủ vận bao gồm adenosin diphosphat, collagen, thrombin và thromboxan A_2 (TXA₂). Sự kích thích với collagen dẫn đến sản sinh acid arachidonic và thromboxan A_2 từ các phospholipid thông qua phospholipase A_2 và thromboxan A_2 synthase, tương ứng [73].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp tiêm phúc mạc chuột dung dịch k-carragenan 10mg/kg trọng lượng cơ thể để gây mô hình đông máu, là phương pháp có độ tin cậy cao, thường được dùng để gây ra đông máu rải rác trong lòng mạch. K-carrageenan có nguồn gốc từ rong biển đỏ. Nó là một polysacarit tuyến tính anion tự nhiên bao gồm các đơn vị galactose và anhydrogalactose (kDa, và nó hòa tan trong nước. Do quá trình thủy phân, độ nhớt và khả năng tạo gel của CG có thể giảm ở pH thấp và nhiệt độ cao. Dựa trên mức độ ghép của nhóm hydroxyl tự do, nói chung CG có thể được chia thành sáu loại: Iota (τ)-, Lambda (λ)-, Kappa (κ)-, Theta (θ)-, Nu (Và kappa (κ), iota (Các loại CG τ) và lambda (λ) thường được sử dụng trong công nghiệp dược phẩm. Do có nhiều hoạt tính sinh học nên CG có thể được sử dụng làm chất chống đông máu, kháng vi-rút và chống huyết khối, chữa lành vết thương và kỹ thuật mô ..., điều hòa miễn dịch, chống ung thư. Hơn nữa, với khả năng tương thích sinh học tốt, khả năng phân hủy sinh học, khả năng giữ nước và độ bền của gel, CG đã được phát triển rộng rãi để vận chuyển thuốc [74].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn aspirin là thuốc chứng dương, Aspirin tạo ra các tác dụng chống huyết khối chính của nó thông qua việc ức chế PGH-synthase/COX bằng cách acetyl hóa không thể đảo ngược một nửa serine cụ thể (serine 530 của COX-1 và serine 516 của COX-2) và mạnh hơn ≈ 170 lần trong việc ức chế COX-1 so với COX-2. Với sự có mặt của aspirin, COX-1 bị bất hoạt hoàn toàn, trong khi COX-2 chuyển axit arachidonic không phải thành PGH₂ mà thành axit 15-R-hydroxyeicosatetraenoic (15-R-HETE). Kết quả là giảm sản xuất prostaglandin và TXA₂ [75].

Khởi động cho cơ chế đông máu là sự hình thành phức hợp prothrombinase theo hai cơ chế ngoại sinh và nội sinh. Cơ chế ngoại sinh xuất hiện nếu có chấn thương thành mạch hoặc các mô kế cận. Cơ chế nội sinh xuất hiện nếu có chấn thương máu hoặc máu lảy ra ngoài cơ thể từ lòng mạch. Trong cả hai cơ chế nội sinh và ngoại sinh có một loạt protein huyết tương (đặc biệt là α_2 -globulin) đóng vai trò rất quan trọng. Đó là các yếu tố gây đông máu của huyết tương. Hầu hết các yếu tố này là các enzym ở dạng không hoạt động. Khi chuyển thành hoạt động, chúng gây ra các phản ứng hoá sinh liên tiếp nhau của quá trình đông máu. Tiếp đó, Khi phức hợp prothrombinase hình thành nó sẽ chuyển prothrombin thành thrombin. Thrombin sau khi được hình thành sẽ chuyển fibrinogen thành fibrin đơn phân. Các fibrin đơn phân tự trùng hợp thành fibrin ở dạng sợi. Một mạng lưới fibrin đã hình thành và được ổn định nhờ yếu tố XIII. Giai đoạn này cũng có sự tham gia của các ion Ca^{++} . Các tế bào máu được giữ lại trên lưới fibrin và tạo nên cục máu đông. Chính mạng lưới này dính vào vị trí tổn thương của thành mạch để ngăn cản sự chảy máu. Cuối cùng, tiểu cầu có tác dụng gắn các sợi fibrin lại với nhau và ổn định vững chắc fibrin. Tiểu cầu bám trên lưới fibrin, khi co rút nó làm cho lưới fibrin co theo, đồng thời với sự giải phóng yếu tố 8 của tiểu cầu làm cho cục máu đông co càng mạnh hơn. Vì vậy, có thể dùng xét nghiệm định lượng tiểu cầu, nồng độ fibrinogen, thời gian thromboplastin từng phần hoạt hóa (APTT), thời gian prothrombin (PT) và thời gian thrombin (TT), là các xét nghiệm kinh điển để đánh giá hiệu quả chống đông máu của Liên ngân SK trên chuột.

Kết quả ở các bảng từ 3.6 đến 3.11 cho thấy:

* *Kết quả hình thành huyết khối đuôi chuột*: So với lô mô hình, phần trăm huyết khối đuôi chuột sau 48 giờ ở các lô dùng aspirin, liên ngân SK liều 1 và liều 2 trên chuột nhất trắng đều giảm rõ (giảm so với lô mô hình là

52,71%; 35,85 %; và 40,98 %, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{2-1} < 0,001$ và $p_{3,4-1} < 0,01$).

** Kết quả đánh giá số lượng tiểu cầu và Fibrinogen trong máu chuột:*

- *Số lượng tiểu cầu trong máu chuột:* So với lô chứng sinh lý, số lượng tiểu cầu trong máu chuột ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều giảm. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. So với lô mô hình, số lượng tiểu cầu trong máu chuột ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhất trắng đều giảm không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- *Số lượng Fibrinogen trong máu chuột:* So với lô chứng sinh lý, Fibrinogen trong máu chuột ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều tăng cao (tăng so với lô chứng sinh lý là 86,34%; 39,89%; 53,55%; và 48,63%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{1-5} < 0,001$, $p_{2,3,4-5} < 0,01$). So với lô mô hình, Fibrinogen trong máu chuột ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhất trắng đều giảm rõ (giảm so với lô mô hình là 24,93%; 17,60%; và 20,23%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{2-1} < 0,001$ và $p_{3,4-1} < 0,01$).

** Kết quả đánh giá thời gian đông máu APTT(giây); PT(giây); TT (giây):*

- *Thời gian đông máu APTT (giây):* So với lô chứng sinh lý, thời gian đông máu APTT ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều giảm (giảm so với lô chứng sinh lý là 15,12%; 4,06%; 8,39%; và 6,20%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{1-5} < 0,01$, $p_{2,3,4-5} < 0,05$). So với lô mô hình, thời gian đông máu APTT ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhất trắng đều tăng (tăng so với lô mô hình là 13,03%; 7,92%; và 10,51%, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- *Thời gian đông máu PT(giây):* So với lô chứng sinh lý, thời gian đông máu PT ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều

giảm (giảm so với lô chứng sinh lý là 23,80 %; 6,91 %; 13,47 %; và 8,79, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{1-5} < 0,01$, $p_{2,3,4-5} < 0,05$). So với lô mô hình, thời gian đông máu PT ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhất trắng đều tăng (tăng so với lô mô hình là 22,17 %; 13,56 %; và 19,70 %, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- *Thời gian đông máu TT(giây)*: So với lô chứng sinh lý, thời gian đông máu TT ở lô mô hình, lô dùng aspirin và các lô dùng LNSK liều 1, liều 2 đều giảm (giảm so với lô chứng sinh lý là 21,15 %; 7,91 %; 11,51 %; và 10,01, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_{1-5} < 0,01$, $p_{2,3,4-5} < 0,05$). So với lô mô hình, thời gian đông máu TT ở các lô dùng aspirin, LNSK liều 1 và liều 2 trên chuột nhất trắng đều tăng (tăng so với lô mô hình là 16,80 %; 12,23 %; và 14,12 %, tương ứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Điều này có nghĩa là lipopolysaccharid đã gây các cục máu đông rải rác trong nội mạch, gây nên các hiện tượng:

- Gây kết tập tiểu cầu và giảm lượng tiểu cầu tự do trong máu chuột.
- Tỷ lệ % Prothrombin giảm do được prothrombinase chuyển thành thrombin.
- Nồng độ Fibrinogen giảm do được thrombin chuyển thành fibrin đơn phân.
- APTT kéo dài, PT tăng, TT kéo dài do rối loạn đông máu làm tiêu thụ các yếu tố đông máu hoạt động theo đường ngoại sinh. So sánh với kết quả nghiên cứu Hideaki Matsuda và Wang B thực hiện trên mô hình gây đông máu bằng lipopolysaccharid đều cho kết quả tương tự [76],[77].

Theo YHCT, trong bài có một số vị thuốc như Đinh lăng có tác dụng bổ khí, tiêu viêm; Sâm đại hành có tác dụng tư âm dưỡng huyết, chỉ huyết, tiêu độc; Nhân sâm đại bổ nguyên khí... khi kết hợp lại sẽ có tác dụng thông kinh lạc, tán ứ huyết, tương ứng với tác dụng chống đông của YHHĐ.

Tóm lại, kết quả của nghiên cứu của chúng tôi cho thấy: Viên nang cứng Liên ngân SK liều 720 mg/kg/ngày và 1440 mg/kg/ngày thể hiện tác dụng chống huyết khối trên chuột nhất trắng gây huyết khối đuôi chuột bằng k-

carragenan. Ở hai mức liều dùng có tác dụng tương đương nhau và tương đương so với aspirin liều 25mg/kg/ngày ($p > 0,05$).

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch và tác dụng chống huyết khối của viên nang cứng Liên ngân SK trên động vật thực nghiệm, chúng tôi kết luận.

1. Tác dụng tăng cường miễn dịch

Viên nang cứng Liên ngân SK liều 720 mg/kg/ngày và 1440 mg/kg/ngày thể hiện tác dụng tăng cường miễn dịch thông qua khả năng làm ức chế các biểu hiện suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng bị gây suy giảm miễn dịch bằng Cyclophosphamide.

Viên nang cứng Liên ngân SK ở hai mức liều dùng có tác dụng tương đương nhau và tương đương so với β -glucan liều 250 mg/kg/ngày ($p > 0,05$).

2. Tác dụng chống huyết khối

Viên nang cứng Liên ngân SK liều 720 mg/kg/ngày và 1440 mg/kg/ngày thể hiện tác dụng chống huyết khối trên chuột nhắt trắng gây huyết khối đuôi chuột bằng k-carragenan.

Viên nang cứng Liên ngân SK ở hai mức liều dùng có tác dụng tương đương nhau và tương đương so với aspirin liều 25mg/kg/ngày ($p > 0,05$).

KIẾN NGHỊ

Với kết quả nghiên cứu bước đầu của Liên ngân SK trên thực nghiệm cho thấy Liên ngân SK có tác dụng tăng cường miễn dịch và chống huyết khối trên thực nghiệm, chúng tôi đề nghị:

- 1. Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn để đánh giá cơ chế tác dụng tăng cường miễn dịch của Liên ngân SK.*
- 2. Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn để đánh giá cơ chế tác dụng chống huyết khối của Liên ngân SK.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1 Bộ môn Miễn dịch – Sinh lý bệnh (2011), *Sinh lý bệnh và miễn dịch*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản y học, Hà Nội.
- 2 De Tommasi et al (2000). *Miễn dịch thiết yếu, Bản dịch của Roitt I.M*, Trường Đại học Y Hà Nội.
- 3 Đào Văn Chinh, Nguyễn Quốc Tuấn, Phạm Văn Thúc (2002). *Miễn dịch học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học.
- 4 Bộ môn Dược lý (2013). *Dược lý học*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
- 5 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.
- 6 Bộ môn Huyết học – Truyền máu (2006). Bài giảng Huyết học – Truyền máu sau đại học. *Nhà xuất bản y học*. Hà Nội, tr.247.
- 7 Bộ Y tế (2018). *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- 8 Bộ môn miễn dịch- sinh lý bệnh (2014), *Miễn dịch học*, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
- 9 Phan Thị Phi Phi (2015), *Miễn dịch học đại cương*, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam.
- 10 Mai Văn Điền (2009), *Miễn dịch học*. Nhà xuất bản Y học.
- 11 Nguyễn Thị Bay, Vai trò của thuốc Y học cổ truyền và hoạt động hệ miễn dịch của cơ thể, *Tạp chí sức khỏe*, nguồn: <http://www.tcsuckhoe.com/vai-tro-cua-thuoc-yhct-hoat-dong-mien-dich-cua-co-the/>
- 12 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.
- 13 Xiaojuan He, Xuyan Niu, Jian Li, Shaohua Xu, Aiping Lu (2012), Immunomodulatory activities of five clinically used Chinese herbal polysaccharides. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 2(1):15-27
 - 14 Lee EJ, Ko E, Lee J, Rho S, Ko S, Shin MK, Min BI, Hong MC, Kim SY, Bae Hm (2004), Ginsenoside Rg1 enhances CD4(+) T-cell activities and modulates Th1/Th2 differentiation, *Int Immunopharmacol*, 4:235-244.
 - 15 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.
 - 16 Sien-Hung Yang, Chia-li Yu, Yi-Han Yang, Yi-Hsun Yang (2016), The immune-modulatory effects of a mixed herbal formula on dendritic cells and CD4+T lymphocytes in the treatment of dust mite allergy asthma and perennial allergic rhinitis, *Journal of Asthma*, Volume 53, Issue 4, 446-451.
 - 17 Hong-Di Ma, Yan-Ru Deng, Zhigang Tian, Zhe-Xiong Lian (2013), Traditional Chinese Medicine and Immune Regulation, *Clinic Rev Allerg Immunol*, 44:229-241.
 - 18 Hứa Kế Bình, Cầu Duy Diễm (1988). Nghiên cứu thời gian sống thêm trên bệnh nhân ung thư phổi giai đoạn giữa và cuối của pháp ích khí dưỡng âm so sánh với hóa trị liệu, *Tạp chí Trung y Giang Tô*, 12, 37.
 - 19 Phan Mẫn Cầu, Lê Nguyệt Hằng, Lưu Tịnh An (1990). Đánh giá tác dụng điều trị của bài thuốc Phế phụ phương kết hợp với hóa trị liệu trong điều trị 80 bệnh nhân ung thư phế quản tế bào vảy giai đoạn III và IV, *Tạp chí Trung y dược Trung Quốc*, 5 (3), 19.
 - 20 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.
- 21 Nguyễn Xuân Phách, Lê Bảo Toàn, Lê Văn Thảo (1993), “Thăm dò tác dụng của tảo *Spirullina* trên bệnh nhân ung thư được điều trị bằng tia xạ”, *Tạp chí y học Việt Nam*, số 7, tr. 144-147.
 - 22 Kuo Y.H and Kuo L.M. (1997). Antitumour and anti – AIDS triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry*, 44(7), 1275 – 1281.
 - 23 Toh D-F, Patel D, Chan E et.at. (2011). Anti – proliferative effects of raw and steamed extracts of *Panax notogingseng* and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells. *Chin Med*, 6(1),4.
 - 24 Hồng Đông Mai (2015). Quan sát hiệu quả điều trị nhồi máu não bằng dịch truyền Đan sâm kết hợp huyết tắc thông. *Tạp chí Y học Cát Lâm, Giang Tô, Trung Quốc*, 2016 (2), 393.
 - 25 Dương Lập Vân (2015). Nghiên cứu hiệu quả điều trị 75 bệnh nhân nhồi máu não trên lâm sàng bằng Y học hiện đại và Y học cổ truyền. *Tạp chí thuốc Đông y và Con người, tỉnh Liêu Ninh, Trung Quốc*, 2015 (1), 248-249.
 - 26 Trần Ngọc Minh (2015). Phân tích hiệu quả kết hợp Y học hiện đại với Y học cổ truyền trong điều trị bệnh nhân nhồi máu não. *Tạp chí Y học phương Bắc, tỉnh Sơn Đông, Trung Quốc*, 2015 (9), 154-155.92.
 - 27 Lâm Anh Kiệt, Hồ Kim Minh (2016). Đánh giá hiệu quả Y học cổ truyền kết hợp Y học hiện đại trong điều trị di chứng Thất ngôn sau tai biến mạch não, *Tạp chí Ứng dụng thuốc Đông y, Quảng Đông, Trung Quốc*, 2016(2), 139-140.
 - 28 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.
 - 29 Phạm Huy Quyền (1996). *Tác dụng kích thích miễn dịch của dịch chiết rễ cây nhàu trên súc vật thí nghiệm*. Trường Đại học Y Hà Nội.

- 30 Nguyễn Gia Chấn, Bùi Thị Bằng, Lê Nguyệt Nga cùng cộng sự (1998). Tác dụng phục hồi miễn dịch của polysaccarid chiết từ rễ củ cây đương quy Nhật Bản: thông báo số 1. *Tạp chí dược liệu*, 2, 47-49.
- 31 Đỗ Quốc Việt (2000). *Nghiên cứu các hợp chất anthraquinon trong cây nhàu Việt Nam*. Viện hóa học Hà Nội
- 32 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.
- 33 Nguyễn Thị Mỹ Nương và cộng sự (2017). Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của bài thuốc Nam địa long trên chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphomide, *Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ*, chuyên san khoa học tự nhiên, tập 1, số 6 năm 2017.
- 34 Lê Thị Tâm (2017), “Nghiên cứu tác dụng chống ngưng tập tiểu cầu của các phân đoạn dịch chiết sâm vũ điệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) và tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T. Tsai et K. M. Feng) in vitro”, Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ Đại học, Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội.
- 35 Nguyễn Thị Tuyết Trinh (2017), “Nghiên cứu tác dụng chống đông máu của các phân đoạn dịch chiết sâm vũ điệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.) và tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T. Tsai et K. M. Feng) in vitro”, Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ Đại học, Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội.
- 36 Phạm Thị Vân Anh (2009), “Suy giảm miễn dịch ở người và phương pháp nghiên cứu suy giảm miễn dịch thực nghiệm”, Chuyên đề tiên sỹ, Trường đại học Y Hà Nội, tr.48.
- 37 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

- ngiên cứu khoa học, Đại học Y Hà Nội, (5), tr. 16-17.
- 38 Phan Sĩ An (1995), “Tương tác của bức xạ ion với vật chất và tác dụng của bức xạ ion hóa”, Tài liệu tập huấn Quốc gia an toàn phóng xạ trong y tế, Bộ khoa học công nghệ và môi trường và Bộ Y tế phối hợp tổ chức.
 - 39 Bộ môn Y học hạt nhân (2000), Bài giảng y học hạt nhân, Trường đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
 - 40 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.
 - 41 WANG Biao, WU Shu-ming, et al (2012). Pre-treatment with bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits systemic intravascular coagulation and attenuates organ dysfunction in lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation rat model. *Chinese Medical Journal*;125(10):1753-1759.
 - 42 Asakura, H., Sano, Y., Yoshida, T., Omote, M., Ontachi, Y., Mizutani, T., ... & Nakao, S. (2004). Beneficial effect of low-molecular-weight heparin against lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rats is abolished by coadministration of tranexamic acid. *Intensive care medicine*, 30, 1950-1955.
 - 43 Wu, L. C., Lin, X., & Sun, H. (2012). Tanshinone IIA protects rabbits against LPS-induced disseminated intravascular coagulation (DIC). *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(10), 1254-1259.
 - 44 Yu, P. X., Zhou, Q. J., Zhu, W. W., Wu, Y. H., Wu, L. C., Lin, X., ... & Qiu, B. T. (2013). Effects of quercetin on LPS-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits. *Thrombosis research*, 131(6), e270-e273.
 - 45 MARGARETTEN, W., ZUNKER, H. O., & MCKAY, D. G. (1964). Production of the generalized Shwartzman reaction in pregnant rats by

- intravenous infusion of thrombin. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 19(6), 952-954.
- 46 Wiene, W., Stassen, J. M., Priepke, H., Ries, U. J., & Huel, N. (2007). Effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate, on thrombus formation and bleeding time in rats. *Thrombosis and haemostasis*, 98(08), 333-338.
- 47 Hagimori, M., Kamiya, S., Yamaguchi, Y., & Arakawa, M. (2009). Improving frequency of thrombosis by altering blood flow in the carrageenan-induced rat tail thrombosis model. *Pharmacological research*, 60(4), 320-323.
- 48 Wakefield, T. W., Wroblewski, S. K., Sarpa, M. S., Taylor Jr, F. B., Esmon, C. T., Cheng, A., & Greenfield, L. J. (1991). Deep venous thrombosis in the baboon: An experimental model. *Journal of vascular surgery*, 14(5), 588-598.
- 49 Li, W., Nieman, M., & Gupta, A. S. (2016). Ferric chloride-induced murine thrombosis models. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (115), e54479.
- 50 Bộ Y tế (2017), Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 1132-1133, 1168-1169, 1221-1222, 1279-1281, 1380-1381.
- 51 Bộ Y tế, Dược liệu học, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 243-250, 256, 297-300, 401-404.
- 52 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.
- 53 Kim, J. W., Choi, J. S., Seol, D. J., Choung, J. J., & Ku, S. K. (2018). Immunomodulatory effects of kuseonwangdого-based mixed herbal formula extracts on a cyclophosphamide-induced immunosuppression

- mouse model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- 54 Ma, N., Liu, X. W., Yang, Y. J., Li, J. Y., Mohamed, I., Liu, G. R., & Zhang, J. Y. (2015). Preventive effect of aspirin eugenol ester on thrombosis in κ -carrageenan-induced rat tail thrombosis model. *PLoS One*, 10(7), e0133125.
- 55 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.
- 56 Vũ Triệu An (2001), Miễn dịch học, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- 57 Goodman and Gilman (2010), The pharmacological basis of therapeutics, twelfth edition, McGraw-Hill Companies, Inc.
- 58 Bộ Y tế (2015), Dược thư quốc gia, Hội đồng Dược điển Việt Nam, Nhà Xuất bản Y học, Hà Nội.
- 59 Rang, R., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2015). *Rang & dale farmacologia*. Elsevier Brasil.
- 60 Hussain, A., Shadma, W., Maksood, A., & Ansari, S. H. (2013). Protective effects of Picrorhiza kurroa on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Pharmacognosy research*, 5(1), 30.
- 61 Zhao, X., Zhang, Y., Song, X., Yin, Z., Jia, R., Zhao, X., ... & Shi, F. (2015). Effect of Chuanminshen violaceum polysaccharides and its sulfated derivatives on immunosuppression induced by cyclophosphamide in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 558.
- 62 Gong, Y., Wu, J., & Li, S. T. (2015). Immuno-enhancement effects of Lycium ruthenicum Murr. polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20631.
- 63 Goodridge, H. S., Wolf, A. J., & Underhill, D. M. (2009). β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunological reviews*, 230(1), 38-50.

- 64 Zhang, Y., Liu, X., Zhao, J., Wang, J., Song, Q., & Zhao, C. (2022). The phagocytic receptors of β -glucan. *International journal of biological macromolecules*.
- 65 Yoon, H. S., Kim, J. W., Cho, H. R., Moon, S. B., Shin, H. D., Yang, K. J., ... & Ku, S. K. (2010). Immunomodulatory effects of Aureobasidium pullulans SM-2001 exopolymers on cyclophosphamide-treated mice. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(2), 438-445.
- 66 Lee, J. N., Lee, D. Y., Ji, I. H., Kim, G. E., Kim, H. N., SoHN, J., ... & KIM, C. W. (2001). Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(4), 837-841.
- 67 Ohtani T, Nakamura T, Toda K, et al (2006). Cyclophosphamide enhances TNF- α -induced apoptotic cell death in murine vascular endothelial cell. *FEBS Lett*, 580(6), 1597-600.
- 68 Bộ môn Y học dân tộc, Trường Đại học Y Hà Nội (2001). *Kim quỳ yếu lược*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội, tr 83.
- 69 Khoa Y học cổ truyền, Trường Đại học Y Hà Nội (2006). *Nội kinh*, Nhà xuất bản Y học, tr. 150.
- 70 Kang S. and Min, H. (2012). Ginseng, the 'Immunity Boost': The Effects of Panax ginseng on Immune System. *Journal of ginseng research*, 36(4), 354–368.
- 71 Đặng, K. T. (2017). *Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của rễ cây Đinh lăng (Polyscias fruticosa (L.) Harms) trồng tại An Giang* (Doctoral dissertation, Trường Đại học Tây Đô)
- 72 Onkar, P., Bangar, J., & Karodi, R. (2012). Evaluation of Antioxidant activity of traditional formulation Giloy satva and hydroalcoholic extract of the Curculigo orchoides Gaertn. *Journal of Applied Pharmaceutical*

Science, 2(7), 209-213.

- 73 Viện dược liệu (2006), Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, Hà Nội, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, tr.115.
- 74 Loureiro, R. R., Cornish, M. L., & Neish, I. C. (2017). Applications of carrageenan: with special reference to iota and kappa forms as derived from the eucheumatoid seaweeds. *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities: Focus on Kappaphycus and Eucheuma of Commerce*, 165-171.
- 75 Awtry, E. H., & Loscalzo, J. (2000). Aspirin. *Circulation*, 101(10), 1206-1218.
- 76 Wang B, Wu SM, Wang T et al (2012). Pre-treatment with bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits systemic intravascular coagulation and attenuates organ dysfunction in lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation rat model. *Chinese Medical Journal*, 125(10), 1753 – 4759.
- 77 Hideaki Matsuda, Kensuke Namba, Seiya Fukuda et al (1986). Pharmacological study of Panax ginseng C. A. Meyer. IV. Effect of Red Ginseng on experimental disseminated intravascular coagulation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34(5), 2100.

Viên nang Liên ngân SK

