

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



HOÀNG THÁI HOA CƯỜNG

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ TÁC
DỤNG CHỐNG VIÊM GAN, XƠ GAN
CỦA QUẢ DỨA DẠI
(*Pandanus odoratissimus* L.f.)
TRÊN THỰC NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



HOÀNG THÁI HOA CƯỜNG

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ TÁC
DỤNG CHỐNG VIÊM GAN, XƠ GAN
CỦA QUẢ DỨA ĐẠI**

(*Pandanus odoratissimus* L.f.)

TRÊN THỰC NGHIỆM

Chuyên ngành : Dược lý và độc chất

Mã số: 62720120

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS Vũ Thị Ngọc Thanh

2. PGS.TS Nguyễn Duy Thuần

HÀ NỘI - 2021

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập nghiên cứu và hoàn thành luận án này, ngoài sự nỗ lực phấn đấu của bản thân, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ tận tình của các thầy, các cô và các bạn đồng nghiệp.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Đảng ủy, Ban giám hiệu, phòng Đào tạo sau đại học Trường Đại học Y Hà Nội. Đảng ủy, Ban giám hiệu Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên đã tạo điều kiện cho tôi được tham gia học tập nghiên cứu trong suốt thời gian qua.

Xin trân trọng cảm ơn các Thầy Cô giáo, các anh chị em kỹ thuật viên Bộ môn Dược lý Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án này.

Xin trân trọng cảm ơn PGS TS Nguyễn Trọng Thông, PGS TS Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, PGS TS Phạm Thị Vân Anh đã tận tình hướng dẫn và chỉ bảo cho tôi trong suốt quá trình học tập tại Bộ môn.

Đặc biệt tôi xin dành sự biết ơn sâu sắc tới PGS TS Vũ Thị Ngọc Thanh và PGS TS Nguyễn Duy Thuần, hai Thầy Cô hướng dẫn đã tận tình chỉ bảo trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu giúp tôi hoàn thành được luận án này.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã giúp đỡ, động viên cả về vật chất và tinh thần trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Hoàng Thái Hoa Cường

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Hoàng Thái Hoa Cương, nghiên cứu sinh khóa 32 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Dược lý và độc chất xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Vũ Thị Ngọc Thanh và PGS.TS Nguyễn Duy Thuận.

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

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

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

Hà Nội, ngày 25 tháng 4 năm 2021

Người viết cam đoan

Hoàng Thái Hoa Cương

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
LỜI CAM ĐOAN	ii
DANH MỤC BẢNG	vi
DANH MỤC HÌNH	ix
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	xiii
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Bệnh lý viêm gan, xơ gan.....	3
1.1.1. <i>Khái niệm</i>	3
1.1.2. <i>Nguyên nhân</i>	3
1.1.3. <i>Cơ chế bệnh sinh</i>	5
1.1.4. <i>Chẩn đoán viêm gan mạn, xơ gan</i>	10
1.1.5. <i>Điều trị viêm gan mạn, xơ gan</i>	15
1.2. Mô hình nghiên cứu thuốc có tác dụng chống viêm gan cấp, xơ gan trên thực nghiệm	20
1.2.1. <i>Mô hình nghiên cứu thuốc có tác dụng chống viêm gan cấp</i>	20
1.2.2. <i>Mô hình nghiên cứu thuốc có tác dụng chống xơ gan</i>	26
1.3. Một số cây thuốc và bài thuốc y học cổ truyền đã được nghiên cứu để điều trị viêm gan.....	28
1.4. Tổng quan về cây Dứa dại	30
1.4.1. <i>Phân loại thực vật và phân bố của cây Dứa dại</i>	30
1.4.2. <i>Thành phần hóa học của Dứa dại</i>	31
1.4.3. <i>Công dụng của cây Dứa dại</i>	32
1.4.4. <i>Một số bài thuốc có Dứa dại</i>	33
1.4.5. <i>Nghiên cứu tác dụng sinh học</i>	34
CHƯƠNG 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.1. Nguyên liệu nghiên cứu	38
2.2. Thuốc, hóa chất, máy và thiết bị phục vụ nghiên cứu	39

2.2.1. Thuốc và hóa chất phục vụ nghiên cứu.....	39
2.2.2. Máy và thiết bị phục vụ nghiên cứu.....	40
2.3. Động vật thực nghiệm.....	41
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	41
2.4.1. Nghiên cứu độc tính	42
2.4.2. Nghiên cứu tác dụng chống viêm gan, xơ gan của quả Dứa dại	43
2.4.3. Nghiên cứu một số tác dụng dược lý liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ gan	46
2.5. Xử lý số liệu	52
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	53
3.1. Nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn	53
3.1.1. Độc tính cấp	53
3.1.2. Độc tính bán trường diễn của PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại	53
3.2. Đánh giá tác dụng chống viêm gan, xơ gan của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại.....	69
3.2.1. Tác dụng chống viêm gan cấp trên mô hình gây viêm gan bằng PAR liều cao ..	69
3.2.2. Tác dụng chống xơ gan của CTP và PĐE	81
3.3. Kết quả một số tác dụng dược lý liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ gan của quả Dứa dại	91
3.3.1. Kết quả nghiên cứu tác dụng lợi mật của quả Dứa dại	91
3.3.2. Đánh giá tác dụng chống viêm cấp của CTP và PĐE	93
3.3.3. Tác dụng chống viêm mạn của CTP và PĐE trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng amiant	96
3.3.4. Tác dụng chống oxy hóa in vitro của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại	97
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	99
4.1. Độc tính của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại	100
4.1.1. Độc tính cấp của CTP và PĐE	100
4.1.2. Độc tính bán trường diễn của PĐE	102
4.2. Tác dụng chống viêm gan cấp của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại.....	111
4.2.1. Bàn luận về mô hình nghiên cứu.....	111

4.2.2. Tác dụng bảo vệ gan	114
4.2.3. Tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan	116
4.3. Tác dụng chống xơ gan trên mô hình gây xơ gan bằng CCl_4	118
4.3.1. Bàn luận về mô hình nghiên cứu.....	118
4.3.2. Tác dụng chống xơ gan trên mô hình gây xơ gan bằng CCl_4 của CTP và PDE.....	119
4.4. Một số tác dụng dược lý liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ hóa gan của quả Dứa dại	125
4.4.1. Tác dụng lợi mật của CTP và PDE.....	125
4.4.2. Tác dụng chống viêm cấp của CTP và PDE.....	129
4.4.3. Tác dụng chống viêm mạn của CTP và PDE.....	133
4.4.4. Tác dụng chống oxy hóa in vitro.....	135
KẾT LUẬN	141
KIẾN NGHỊ	143
TÀI LIỆU THAM KHẢO	144
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	162
PHỤ LỤC	163

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Hệ thống điểm của Knodell - Ishak trong viêm gan mạn.....	11
Bảng 1.2. Phân độ viêm gan theo HAI	12
Bảng 1.3. Phân loại xơ gan theo Child-Pugh.....	15
Bảng 1.4. Các chất độc với gan được dùng để gây tổn thương gan thực nghiệm ở chuột cống trắng.	22
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của PĐE đến thể trọng chuột.....	54
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của PĐE đến số lượng hồng cầu trong máu chuột	55
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của PĐE đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột	56
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của PĐE đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột	56
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của PĐE đến số lượng bạch cầu trong máu chuột.....	57
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của PĐE đến công thức bạch cầu trong máu chuột	58
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của PĐE đến số lượng tiểu cầu trong máu chuột	59
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của PĐE đến hoạt độ AST (GOT) trong máu chuột.....	60
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của PĐE đến hoạt độ ALT (GPT) trong máu chuột....	60
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của PĐE đến nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột	61
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của PĐE đến nồng độ cholesterol trong máu chuột ..	62
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của PĐE đến nồng độ creatinin trong máu chuột.....	63
Bảng 3.14. Hình thái vi thể gan chuột sau 8 tuần uống mẫu thử.....	64
Bảng 3.15. Hình thái vi thể thận chuột sau 8 tuần uống mẫu thử.....	66
Bảng 3.16. Hình thái vi thể gan chuột sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử.....	67
Bảng 3.17. Hình thái vi thể thận chuột sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử.....	68
Bảng 3.18: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng PAR	69
Bảng 3.19: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hình ảnh mô bệnh học của gan chuột bị gây độc bằng PAR	70

Bảng 3.20: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh chuột sau gây độc bằng PAR 2 ngày	74
Bảng 3.21: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hình ảnh mô bệnh học của gan chuột sau gây độc bằng PAR 2 ngày	75
Bảng 3.22: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh chuột sau gây độc bằng PAR 4 ngày	78
Bảng 3.23: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hình ảnh mô bệnh học của gan chuột sau gây độc bằng PAR 4 ngày	79
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng tương đối của gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	81
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến hoạt độ ALT trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	82
Bảng 3.26. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến hoạt độ AST trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	83
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến nồng độ albumin trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	83
Bảng 3.28. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến nồng độ cholesterol toàn phần trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄ . 84	
Bảng 3.29. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	85
Bảng 3.30. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến số lượng bạch cầu trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	85
Bảng 3.31. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	86
Bảng 3.32. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến hàm lượng hydroxyprolin (Hyp) trong gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	87

Bảng 3.33. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến lượng collagen type IV trong gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	87
Bảng 3.34: Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến mô bệnh học gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl ₄	88
Bảng 3.35. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng dịch mật trong túi mật của chuột sau gây độc 2 ngày	91
Bảng 3.36. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng dịch mật trong túi mật của chuột sau gây độc 4 ngày	92
Bảng 3.37. Độ tăng thể tích chân chuột sau khi gây viêm.....	93
Bảng 3.38. Mức độ ức chế phản ứng phù của CTP và PĐE Dứa dại	94
Bảng 3.39. Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu và hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm	95
Bảng 3.40. Trọng lượng trung bình u hạt thực nghiệm	96
Bảng 3.41. Khả năng dọn gốc tự do DPPH của CTP và PĐE	97
Bảng 3.42. Kết quả dọn gốc tự do anion superoxid của của CTP và PĐE	97

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1	Cây, hoa và quả Dứa dại.	32
Hình 2.1	Quy trình chiết CTP từ quả Dứa dại	39
Hình 2.2	Quy trình chiết PDE từ quả Dứa dại	40
Hình 2.3	Sơ đồ nghiên cứu	42
Ảnh 3.1	Hình thái vi thể gan chuột lô chứng (chuột số 23) (HE x 400)	67
Ảnh 3.2	Hình thái vi thể gan chuột lô chứng (chuột số 18) (HE x 400)	67
Ảnh 3.3	Hình thái vi thể gan chuột lô trị 1 sau 8 tuần uống thuốc thử (chuột số 38) (HE x 400)	68
Ảnh 3.4	Hình thái vi thể gan chuột lô trị 1 sau 8 tuần uống thuốc thử (chuột số 39) (HE x 400)	68
Ảnh 3.5	Hình thái vi thể gan chuột lô trị 2 sau 8 tuần uống thuốc thử (chuột số 32) (HE x 400)	68
Ảnh 3.6	Hình thái vi thể gan chuột lô trị 2 sau 8 tuần uống thuốc thử (chuột số 26) (HE x 400)	68
Ảnh 3.7	Hình thái vi thể thận chuột lô chứng (chuột số 22) (HE x 400)	69
Ảnh 3.8	Hình thái vi thể thận chuột lô trị 1 sau 8 tuần uống thuốc thử (chuột số 43) (HE x 400)	70
Ảnh 3.9	Hình thái vi thể thận chuột lô trị 2 sau 8 tuần uống thuốc thử (chuột số 34) (HE x 400)	70
Ảnh 3.10	Hình thái vi thể thận chuột lô trị 1 sau 2 tuần ngừng thuốc thử (chuột số 207) (HE x 400)	71
Ảnh 3.11	Hình thái vi thể gan chuột lô chứng (chuột số 72) (HE x 400) gan bình thường	74
Ảnh 3.12	Hình thái vi thể gan chuột lô chứng (chuột số 77) (HE x 400) gan thoái hóa nhẹ	74

Ảnh 3.13	Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 148) (HE x 400) gan thoái hóa nặng	75
Ảnh 3.14	Hình thái vi thể gan chuột lô uống silymarin (chuột số 136) (HE x 400) gan thoái hóa vừa	75
Ảnh 3.15	Hình thái vi thể gan chuột lô CTP liều 1 (chuột số 47) (HE x 400) gan thoái hóa vừa	75
Ảnh 3.16	Hình thái vi thể gan chuột lô CTP liều 2 (chuột số 29) (HE x 400) gan thoái hóa vừa	75
Ảnh 3.17	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE liều 1 (HE x 400) gan thoái hóa nhẹ (chuột số 170)	76
Ảnh 3.18	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE liều 1 (HE x 400) gan thoái hóa vừa (chuột số 167)	76
Ảnh 3.19	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE liều 1 (HE x 400) gan thoái hóa nặng (chuột số 165)	76
Ảnh 3.20	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE liều 2 (chuột số 159) (HE x 400)	76
Ảnh 3.21	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE liều 2 (chuột số 153) (HE x 400)	76
Ảnh 3.22	Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 9) (HE x 400)	79
Ảnh 3.23	Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 12) (HE x 400)	79
Ảnh 3.24	Hình thái vi thể gan chuột lô uống silymarin (chuột số 29) (HE x 400)	79
Ảnh 3.25	Hình thái vi thể gan chuột lô uống CTP (chuột số 44) (HE x 400)	79
Ảnh 3.26	Hình thái vi thể gan chuột lô uống CTP (chuột số 42) (HE x 400)	80
Ảnh 3.27	Hình thái vi thể gan chuột lô uống CTP (chuột số 34) (HE x 400)	80

Ảnh 3.28	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE (chuột số 46) (HE x 400)	80
Ảnh 3.29	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE (chuột số 51) (HE x 400)	80
Ảnh 3.30	Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 69) (HE x 400)	83
Ảnh 3.31	Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 71) (HE x 400)	83
Ảnh 3.32	Hình thái vi thể gan chuột lô uống CTP (chuột số 95) (HE x 400)	83
Ảnh 3.33	Hình thái vi thể gan chuột lô uống CTP (chuột số 102) (HE x 400)	83
Ảnh 3.34	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE (chuột số 109) (HE x 400)	84
Ảnh 3.35	Hình thái vi thể gan chuột lô chứng (chuột số 01) (HE x 400)	92
Ảnh 3.36	Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 17) (HE x 400)	92
Ảnh 3.37	Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 19) (HE x 400)	92
Ảnh 3.38	Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 21) (HE x 400)	92
Ảnh 3.39	Hình thái vi thể gan chuột lô uống silymarin (chuột số 24) (HE x 400)	93
Ảnh 3.40	Hình thái vi thể gan chuột lô uống silymarin (chuột số 28) (HE x 400)	93
Ảnh 3.41	Hình thái vi thể gan chuột lô uống CTP (chuột số 63) (HE x 400)	93

Ảnh 3.42	Hình thái vi thể gan chuột lô uống CTP (chuột số 75) (HE x 400)	93
Ảnh 3.43	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE (chuột số 78) (HE x 400)	94
Ảnh 3.44	Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE (chuột số 89) (HE x 400)	94

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ADH	Alcohol dehydrogenase
ALDH2	Acetaldehyde dehydrogenase 2
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
CCl ₃ OO*	Trichloromethylperoxy
CCl ₄	Carbon tetrachloride
CTP	Cao toàn phần
CYP P450	Cytochrome P450
DDPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
DILI	Drug-induced liver injury (Tổn thương gan do thuốc)
HSC	Hepatic Stellate Cell (Tế bào hình sao gan)
Hyp	Hydroxyproline
IC ₅₀	IC ₅₀ (Inhibitory Concentration 50%): nồng độ ức chế 50%
IL	Interleukin
IP	Intraperitoneal injection (Tiêm màng bụng)
IV	Intravenous injection (Tiêm tĩnh mạch)
MEOS	Microsomal Ethanol Oxidizing System (Hệ thống oxy hóa rượu ở microsomal)
NAPQI	N-Acetyl-p-benzoquinoneimine
PAR	Paracetamol
PDE	Phân đoạn ethyl acetate
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu)
PO	Pandanus odoratissimus

ROS	Reactive Oxygen Species (Các dạng oxy phản ứng/ Các gốc oxy tự do hoạt động)
TGF	Transforming Growth Factor (Yếu tố tăng trưởng chuyển dạng)
TNF	Tumor Necrosis Factors (Yếu tố hoại tử khối u)
VG	Viêm gan
VGVR	Viêm gan virus
YHCT	Y học cổ truyền

ĐẶT VẤN ĐỀ

Gan là tạng lớn của cơ thể, đảm nhiệm nhiều chức năng quan trọng và phức tạp, đóng vai trò quan trọng trong quá trình khử độc và chuyển hoá các chất. Gan là cơ quan chính biến đổi các chất độc nội hoặc ngoại sinh thành các chất không độc để đào thải ra ngoài [1]. Vì vậy khi gan bị tổn thương, bệnh lý của gan thường nặng và ảnh hưởng đến hoạt động chức năng của nhiều cơ quan trong cơ thể [2].

Các nguyên nhân gây ra bệnh lý tại gan như vi khuẩn, virus, kí sinh trùng, rượu, thuốc hoặc hoá chất độc khi xâm nhập vào gan có thể gây viêm gan cấp, viêm gan mạn, có thể tiến triển tới xơ gan hoặc ung thư gan [3].

Việt Nam nằm trong vùng dịch tễ của viêm gan B và viêm gan C, tỷ lệ người nhiễm virus viêm gan B chiếm khoảng 12% dân số với xấp xỉ 10 triệu người mắc viêm gan B mạn tính và có khoảng 2,8% dân số nhiễm virus viêm gan C [4]. Với mức độ tiêu thụ đồ uống có cồn cao nhất châu Á (tỷ lệ nam giới sử dụng trên 5 đơn vị rượu/ ngày là 17,3% và 31,4% ở 2 địa điểm nghiên cứu tại Việt Nam, cao nhất trong 9 địa điểm nghiên cứu tại châu Á) [5], vì vậy bệnh gan do rượu (ALD: Alcoholic liver disease) chiếm tỷ lệ lớn trong các bệnh lý về gan ở Việt Nam. Ngoài ra viêm gan do nhiễm độc thuốc hoặc hoá chất cũng thường gặp, đặc biệt viêm gan do dùng thuốc chống lao và paracetamol (PAR) có xu hướng ngày càng gia tăng. Tất cả các nguyên nhân trên đang làm tăng cả số lượng và mức độ nặng của các bệnh nhân mắc các bệnh lý về gan. Hiện nay, ung thư gan là nguyên nhân gây tử vong do ung thư cao nhất ở Việt Nam (chiếm tỷ lệ 31,04% ở nam và 19,91% ở nữ trên tổng số các ca tử vong do ung thư) [6].

Trong điều trị bệnh viêm gan cấp và mạn tính, ngoài các biện pháp điều trị đặc hiệu, các thuốc có tác dụng hỗ trợ điều trị đã được chứng minh có vai trò quan trọng. Hiện nay trên thị trường có một số thuốc điều trị bệnh gan tương đối tốt, được sử dụng nhiều trên lâm sàng như silymarin (Legalon), Eganin (arginin tidiacicat)... nhưng chủ yếu là các sản phẩm nhập ngoại. Trong dân gian có rất nhiều vị thuốc, nhất là những vị thuốc thảo dược có tác

dụng nhuận gan, lợi mật đã được sử dụng từ lâu. Với mục tiêu tăng cường sử dụng các thuốc có nguồn gốc trong nước trong điều trị cho bệnh nhân nói chung và các bệnh lý gan mật nói riêng, việc sưu tầm, nghiên cứu các bài thuốc từ nguồn dược liệu trong nước để sản xuất thuốc có tác dụng điều trị bệnh gan an toàn, hiệu quả, phù hợp với điều kiện kinh tế của đa số người bệnh luôn là vấn đề cấp thiết hiện nay.

Cây Dứa dại mọc hoang ở nhiều nơi. Do dễ trồng và lá có nhiều gai nên được trồng làm hàng rào xung quanh vườn nhà. Nhưng đặc điểm nổi bật nhất là khả năng làm thuốc chữa bệnh của Dứa dại. Trong dân gian thường dùng rễ Dứa dại làm thuốc lợi tiểu chữa phù thũng, đái buốt, đái rắt, đái ra sỏi. Dùng ngoài giã đắp chữa gãy xương, lòi dom. Đọt non dứa dại chữa sỏi thận, kinh phong trẻ em [7]. Rễ và quả Dứa dại có thể dùng để điều trị viêm gan, xơ gan [8].

Hiện nay trên thị trường quả Dứa dại được bán và dùng khá phổ biến. Theo kinh nghiệm dân gian, quả Dứa dại thái phơi khô, mỗi ngày 20 – 30 gam sắc nước uống để điều trị các bệnh về gan. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu về Dứa dại, nhưng ở trong nước cho đến nay chưa có nghiên cứu nào đánh giá về tác dụng và độc tính của quả Dứa dại trồng ở Việt Nam. Để chứng minh cơ sở khoa học của việc sử dụng quả Dứa dại để điều trị các bệnh về gan theo kinh nghiệm dân gian, hướng tới khả năng có thể sử dụng rộng rãi nguồn dược liệu dồi dào, sẵn có, rẻ tiền này để điều trị viêm gan, xơ gan trên lâm sàng, chúng tôi thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu độc tính và tác dụng chống viêm gan, xơ gan của quả Dứa dại (*Pandanus odoratissimus* L.f.) trên thực nghiệm”** với 2 mục tiêu:

1. *Nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của quả Dứa dại trên động vật thực nghiệm.*
2. *Nghiên cứu tác dụng chống tổn thương gan cấp, xơ gan và một số tác dụng liên quan của quả Dứa dại trên thực nghiệm.*

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Bệnh lý viêm gan, xơ gan

1.1.1. Khái niệm

Từ “viêm gan” dùng để chỉ mọi trường hợp bệnh lý gây nên tổn thương thoái hóa, hoại tử tế bào gan và những tổn thương của mô đệm trong gan do phản ứng viêm gây nên [9].

Viêm gan mạn tính là bệnh gan có tổn thương hoại tử và viêm, có hoặc không có kèm theo xơ hoá, diễn ra trong thời gian trên 6 tháng. Thể nhẹ là thể không tiến triển hoặc tiến triển rất chậm và không đưa đến xơ hoặc ung thư gan; thể nặng là thể viêm hoại tử dồn dập hoặc nhiều đợt tiến triển tấn công vào tế bào gan, cuối cùng dẫn đến xơ gan và ung thư hóa [10].

1.1.2. Nguyên nhân

1.1.2.1. Nguyên nhân gây viêm gan: Có nhiều nguyên nhân gây ra viêm gan, ta có thể xếp loại nguyên nhân như sau:

- Do virus: Virus viêm gan A, B, C, D, E;
- Do vi khuẩn hoặc ký sinh trùng: *Leptospirose*, thương hàn, sốt Q, bệnh amip, bệnh *Samonella*;
- Viêm gan do nhiễm độc thuốc, hóa chất;
- Viêm gan do rượu;
- Viêm gan do thiếu oxy: Thắt động mạch gan, hội chứng Budd Chiari, suy tuần hoàn gan (do suy tim);
- Viêm gan do chuyển hóa: Viêm gan ở người có thai, bệnh Wilson, hemo-chromatose.

Trong các nhóm nguyên nhân trên thì viêm gan do virus, do rượu và viêm gan do ngộ độc thuốc – hóa chất (đặc biệt là viêm gan do PAR) là nhóm nguyên nhân hay gặp nhất [9].

1.1.2.2. Nguyên nhân gây xơ gan

* Viêm gan mạn do virus viêm gan B, C và D.

* Viêm gan mạn do rượu.

Viêm gan do virus và rượu là những nguyên nhân chính gây ra xơ gan, hai nhóm nguyên nhân này chiếm trên 90% các trường hợp xơ gan.

* Các nguyên nhân khác:

- Nhiễm khuẩn, virus, ký sinh trùng:

+ Sán máng (Schistosomiasis).

+ Giang mai.

+ HIV gây viêm đường mật xơ hóa.

- Các bệnh chuyển hóa, bệnh di truyền:

+ Viêm gan do thoái hóa mô không do rượu.

+ Bệnh Wilson.

+ Hemochromatosis.

+ Thiếu hụt α_1 – antitrypsin.

+ Bệnh gan ứ đọng glycogen.

+ Bệnh gan xơ hóa dạng nang.

+ Tăng tyrosin, tăng galactose máu.

+ Không dung nạp fructose.

+ Tăng abetalipoprotein máu.

+ Mucopolysaccharidosis

+ Porphirin niệu.

- Do bệnh đường mật: tắc mật trong và ngoài gan.

- Do bệnh tự miễn:

+ Viêm gan tự miễn

+ Xơ gan mật tiên phát.

+ Viêm đường mật xơ hóa tiên phát.

- Bệnh mạch máu:

+ Hội chứng Budd – Chiari.

- + Suy tim.
- Do thuốc và nhiễm độc: methotrexat, diclofenac, izoniazid, halouracil, aflatoxin. ...
- Suy dinh dưỡng.
- Sarcoidosis.
- Thiếu máu [9].

1.1.3. Cơ chế bệnh sinh

1.1.3.1. Cơ chế bệnh sinh của viêm gan

* *Cơ chế bệnh sinh của viêm gan do rượu*: Trong cơ thể, gan là cơ quan chuyển hóa rượu quan trọng nhất. Trên 90% lượng rượu hấp thu vào cơ thể sẽ được chuyển hóa tại gan. Phần còn lại sẽ được thải ra ngoài qua phổi và thận [11]. Phần lớn rượu được chuyển hóa tại gan theo hai giai đoạn:

Giai đoạn 1: Chuyển hóa rượu thành acetaldehyd được thực hiện bởi ba hệ thống enzym: (1) Alcohol dehydrogenase (ADH) có sự tham gia của coenzym NAD nằm trong bào tương; (2) hệ thống oxy hóa rượu ở microsome (Microsomal Ethanol Oxidating System – MEOS) và (3) các men catalase.

Giai đoạn 2: Acetaldehyd được hình thành là một chất độc, sẽ nhanh chóng được enzym acetaldehyd dehydrogenase 2 (ALDH2) chuyển thành acetat. Như vậy ethanol được chuyển hoá chủ yếu nhờ enzym alcohol dehydrogenase (ADH) và enzym acetaldehyd dehydrogenase 2 (ALDH2). Khả năng chuyển hóa của giai đoạn này chỉ có giới hạn, nếu lượng acetaldehyd được sản sinh với một mức quá lớn sẽ không được chuyển hóa hết gây giãn mạch và gắn vào màng tế bào gây tổn thương tế bào thông qua các cơ chế gây độc, viêm và miễn dịch [11],[12].

Ở những người uống một lượng lớn rượu thì đầu tiên khi nồng độ cồn trong máu cao, hệ thống MEOS sẽ hoạt động. Hệ thống enzym này được tìm thấy ở màng của mạng lưới nội bào tương. Enzym quan trọng nhất của hệ thống này là cytochrom P450 bởi enzym này không chỉ có vai trò trung tâm trong chuyển hóa rượu mà còn tham gia vào việc giáng hóa rất nhiều chất của chính cơ thể cũng như chất lạ từ bên ngoài vào. Cytochrom P450 2E1 (CYP

2E1), một dưới typ của cytochrom P450, có vai trò quan trọng nhất trong chuyển hóa alcohol thành acetaldehyd. Trong 50 năm kể từ khi được tác giả Charles Lieber (1968) phát hiện, các nhà khoa học đã chứng minh rằng việc sử dụng thường xuyên thức uống có cồn sẽ gây cảm ứng làm tăng hoạt độ hệ thống enzym này lên 10 lần. Một đặc điểm cực kỳ quan trọng là phản ứng giáng hóa này sẽ giải phóng ra các gốc oxy tự do hoạt động (ROS) và gây ra stress oxy hóa dẫn đến tổn thương tế bào gan [13].

Việc thường xuyên sử dụng một lượng lớn alcohol sẽ làm tăng hoạt động của hai enzym khác nữa tham gia vào quá trình chuyển acetaldehyd thành acetate. Đó là các enzym xanthinoxidase và aldehydoxidase. Thông qua hoạt động của hai enzym này, thêm một lượng lớn các gốc tự do gây độc được giải phóng, góp phần tạo nên những tổn thương gan do rượu [13].

** Cơ chế bệnh sinh của viêm gan do thuốc và hóa chất:* Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về tổn thương gan do thuốc nhưng cơ chế của hầu hết các loại thuốc vẫn chưa được biết rõ [14]. Một loại thuốc có thể có nhiều cơ chế khác nhau gây tổn thương gan. Nhìn chung, tổn thương gan do thuốc được chia chủ yếu theo 2 cơ chế chính sau:

- *Tổn thương gan do phản ứng đặc ứng (dị ứng đặc biệt ở từng bệnh nhân):* Trong đó thuốc gây ra một đáp ứng miễn dịch chống lại gan [14]. Các đặc điểm chính của loại tổn thương này bao gồm: phản ứng không phụ thuộc liều, phản ứng liên quan đến các biểu hiện quá mẫn (sốt, ớn lạnh, phát ban da, tăng bạch cầu ưa acid), phản ứng có thời gian tiềm tàng (khoảng thời gian từ khi bắt đầu dùng thuốc đến khi khởi phát tổn thương gan), thời gian tiềm tàng khi tái sử dụng thuốc ngắn hơn khi sử dụng thuốc lần đầu và thỉnh thoảng có sự xuất hiện của các kháng thể tự miễn trong huyết thanh [14],[15]. Các kháng thể tự miễn đã được tìm thấy trong các trường hợp viêm gan gây ra bởi halothan, acid tienilic, dihydralazin, thuốc chống co giật, papaverin và nitrofurantoin [14],[15].

Quá trình một thuốc gây tổn thương gan đặc ứng trải qua 3 giai đoạn:

Giai đoạn 1: Thuốc được chuyển hóa lần đầu thành một chất chuyển hóa có hoạt tính, liên kết với các enzym tạo ra nó.

Giai đoạn 2: Quá trình liên kết sẽ tạo ra một neoantigen (kháng nguyên tân tạo), trình diện tới hệ thống miễn dịch để từ đó kích hoạt một phản ứng miễn dịch đặc trưng bởi việc sản xuất các kháng thể nhận diện protein ban đầu và/hoặc protein biến đổi.

Giai đoạn 3: Tái sử dụng thuốc dẫn đến tăng sản xuất neoantigen, khi đó sẽ xuất hiện các kháng thể, dẫn đến ly giải tế bào gan [14],[15].

- Tổn thương gan do quá liều: một số thuốc được biết chắc là khi dùng liều cao, kéo dài hoặc khi sử dụng chung với một số thuốc khác sẽ gây tương tác thuốc do các thuốc này làm ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa, giải độc của gan như thuốc giảm đau hạ sốt (paracetamol), thuốc kháng lao...[14].

Các hình thức gây tổn thương tế bào gan: Ít nhất 6 hình thức gây tổn thương gan đã được nhận diện:

1. Thay đổi nội môi calci trong tế bào dẫn tới tách rời hoạt động của các sợi actin trên bề mặt tế bào gan, màng tế bào bị vỡ dẫn tới hiện tượng tiêu tế bào;

2. Sự gãy vỡ sợi actin có thể xuất hiện ở gần các kênh (canaliculus), phần đặc biệt của tế bào gan đảm trách bài tiết mật. Mất quá trình tạo nhung mao và ngừng bơm vận chuyển như MRP3 (multidrug-resistance-associated protein-3) giúp ngăn ngừa bài tiết bilirubin và các phức hợp hữu cơ khác;

3. Nhiều phản ứng của tế bào gan kéo theo hệ cytochrom P-450 chứa hem, sản sinh phản ứng năng lượng cao dẫn tới gắn đồng hóa trị thuốc với enzym, tạo nên các phức hợp mới không có chức năng;

4. Các phức hợp thuốc - enzym di trú lên bề mặt tế bào trong các bọc nhỏ tác động giống như kháng nguyên đích của tế bào T đến tấn công ly giải, kích thích nhiều dạng đáp ứng miễn dịch (tế bào T và các cytokin);

5. Hoạt hóa con đường chết theo chương trình thông qua receptor TNF- α hoặc Fas dẫn tới chết tế bào theo chương trình;

6. Một số thuốc ức chế chức năng ty thể bằng tác động kép lên quá trình p-oxy hóa (tác động sản sinh năng lượng bằng ức chế tổng hợp NAD và FAD, gây giảm sản sinh ATP) và các enzym trong chuỗi hô hấp tế bào. Các acid béo tự do không được chuyển hóa và thiếu hô hấp yếm khí dẫn tới tích tụ lactat và các gốc tự do. Các gốc ROS có thể làm đứt gãy các DNA của ty thể. Kiểu tổn thương này là đặc trưng của nhiều tác nhân khác nhau bao gồm cả các chất ức chế sao chép ngược nucleosid (nucleoside reverse-transcriptase inhibitors) - gắn trực tiếp vào DNA của ty thể như acid valproic, tetracyclin và aspirin [16].

** Vai trò của các gốc tự do trong cơ chế bệnh sinh của tổn thương gan:*

- Hầu hết cơ chế bệnh sinh bệnh gan do các nguyên nhân khác nhau đều liên quan đến sự phát sinh của các gốc tự do độc hại trong cơ thể. Gốc tự do độc hại đã được chứng minh có vai trò trong một loạt các bệnh lý của các cơ quan trong cơ thể [17],[18],[19].

- Gốc tự do có thể là nguyên tử, phân tử, các ion (anion và cation) mà lớp điện tử ngoài cùng có chứa điện tử không cặp đôi (điện tử cô độc hoặc hóa trị tự do). Số lượng điện tử không cặp đôi có thể là một hoặc nhiều. Gốc tự do có thể là nguyên tử ($\text{Cl} \cdot$, $\text{O}_2 \cdot^-$), là nhóm nguyên tử (CH_3 , OH), là phân tử (NO_2 , NO) [20],[21].

- Hầu như tất cả các trạng thái bệnh lý quan trọng đều do ROS gây ra, bao gồm gốc hydroxyl, gốc superoxid anion, hydro peroxid, hypochlorit, oxy đơn bội, gốc oxid nitric và gốc peroxyinitrit [21].

- Các gốc tự do có thể có nguồn gốc nội sinh hoặc ngoại sinh. Trong cơ thể luôn có sự cân bằng nội môi giữa ROS và các chất chống oxy hóa. Khi cơ thể nhiễm chất độc, stress tâm lý, viêm, nhiễm khuẩn... làm tăng cao số lượng các ROS trong cơ thể dẫn đến sự mất cân bằng giữa các chất chống oxy hóa với các ROS gọi là stress oxy hóa [22],[23].

- Các gốc tự do này có thể tác động tới màng hoặc nhân tế bào, gây ra các phản ứng sinh học có hại cho phân tử DNA, protein, carbohydrat và lipid

[24]. Các gốc tự do tấn công các đại phân tử quan trọng dẫn đến tổn thương tế bào và phá vỡ cân bằng nội môi gây ra chết tế bào [25].

1.1.3.2. Cơ chế bệnh sinh của xơ gan

Biến đổi chính trong cơ chế gây xơ gan là tình trạng hóa sợi tiến triển lan tỏa toàn bộ gan và sự tái tổ chức hệ thống vi tuần hoàn trong gan. Ở gan bình thường, các sợi collagen typ I và III tập trung trong khoảng cửa và xung quanh tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy, các bề mặt tế bào gan thì được nâng đỡ bởi một khung lưới sợi collagen typ IV nằm trong khoảng Disse. Trong xơ gan, có sự tăng tổng hợp các sợi collagen typ I và III, tạo thành các vách sợi. Các mạch máu tân sinh trong vách sợi sẽ kết nối với các mạch máu trong khoảng cửa và tĩnh mạch trên gan, hình thành một lối đi vòng cho máu (bypass) không qua nhu mô gan. Sự tăng tổng hợp các sợi collagen trong khoảng Disse sẽ làm bít các "cửa sổ" tế bào nội mô của mao mạch dạng xoang, gây cản trở cho sự trao đổi chất giữa tế bào gan và huyết tương, làm suy yếu chức năng tổng hợp các protein quan trọng của tế bào gan (albumin, yếu tố đông máu, lipoprotein...), và làm tăng kháng lực mạch trong nhu mô gan (dẫn đến tăng áp lực tĩnh mạch cửa, cổ trướng, trĩ, . . .) [26].

Các sợi collagen trong xơ gan được tạo ra chủ yếu bởi các tế bào hình sao (HSC: hepatic stellate cell) nằm trong khoảng Disse. Bình thường tế bào này có chức năng dự trữ vitamin A cho cơ thể. Trong quá trình phát triển xơ gan, dưới tác động của các chất trung gian hóa học (PDGF, TNF, TNF β) tiết ra bởi các tế bào viêm mạn tính và các tế bào của nhu mô gan bị tổn thương (như tế bào gan, tế bào Kuffer, tế bào nội mô, tế bào biểu mô ống mật..), các tế bào hình sao sẽ được hoạt hóa, tăng sinh và biến đổi thành các nguyên bào sợi cơ (myofibroblast) có khả năng sản xuất các sợi collagen [27].

Bên cạnh hoạt động tạo sợi, các tế bào gan còn sống sót sẽ tăng cường hoạt động tăng sinh tạo ra các nốt tái tạo bao quanh bởi các mô sợi. Kết cuộc gan trở thành một mô sợi chứa các nốt tế bào gan, hệ thống vi tuần hoàn cung cấp máu cho tế bào gan cũng như khả năng sản xuất các protein của tế bào

gan bị tổn hại trầm trọng. Mặt khác mô sợi cũng phá hủy các ống mật trong khoảng cửa dẫn đến tình trạng ứ mật; các tế bào biểu mô ống mật còn sống sót sẽ tăng sinh phản ứng, tạo ra các ống mật mới với cấu trúc khá thô sơ (còn gọi là ống mật giả) [26],[27],[28].

1.1.4. Chẩn đoán viêm gan mạn, xơ gan

1.1.4.1. Chẩn đoán viêm gan mạn

Dựa vào các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng.

*** Triệu chứng lâm sàng:**

- Triệu chứng khởi đầu có thể biểu hiện những đợt rầm rộ như trong viêm gan cấp (1/3 trường hợp), phần còn lại thường âm thầm làm phần lớn bệnh nhân không nhận biết được, thường chỉ biểu hiện bởi triệu chứng cơ năng chung là mệt mỏi, cảm giác nặng tức vùng hạ sườn phải, nhiều lúc có đau cơ, đau khớp hoặc nhiều lúc chỉ có cảm giác nhức mỏi chung chung [10].

- Trong những đợt tiến triển, các triệu chứng thường phong phú và rầm rộ hơn với sốt, vàng da vàng mắt, nước tiểu vàng hoặc sẫm màu, đau cơ và đau khớp và nhất là đau tức vùng gan và ngứa. Khám thấy gan lớn vừa, căng chắc ấn đau tức, vàng da vàng mắt, lòng bàn tay son và giãn mạch hình sao. Có thể có lách to nhất là khi đã có tăng áp cửa, kèm thêm có dịch cổ trướng, hạch lớn thường là hạch nách và hạch cổ [10].

- Các biểu hiện ngoài gan có thể gặp: ban da, viêm tuyến giáp tự miễn Hashimoto, viêm mạch, viêm cầu thận, hội chứng Sjogren, viêm đại trực tràng loét chảy máu, thiếu máu, chảy máu do giảm tiểu cầu.

*** Triệu chứng cận lâm sàng:**

- Công thức máu: Bạch cầu và hồng cầu thường giảm, có thể giảm luôn cả tiểu cầu và tốc độ máu lắng thường tăng cao [29].

- Chức năng gan: thay đổi nhiều.

+ Bilirubin tăng cả trực tiếp và gián tiếp;

+ Men transaminase thường tăng gấp > 5 lần bình thường;

+ Gammaglobulin tăng nhưng albumin giảm, tỉ lệ A/G rất thấp;

+ Tỷ lệ prothrombin giảm, yếu tố V giảm;

+ Phosphatase kiềm tăng [29].

- Xét nghiệm huyết thanh (trong viêm gan mạn do virus):

+ HbsAg (+), HBV DNA và HbeAg (+) trong viêm gan mạn hoạt động B;

+ Anti HCV và HCV- RNA (+) trong viêm gan mạn virus C [29].

- Sinh thiết gan: là một xét nghiệm cần thiết giúp chẩn đoán nguyên nhân và giai đoạn, độ trầm trọng của viêm gan mạn cho hình ảnh viêm hoại tử xâm nhập tiểu thùy gan với hoại tử mối găm, hoại tử cầu nối, hoại tử mảng xen lẫn với tổ chức xơ phát triển nhiều ở khoảng cửa xâm nhập tiểu thùy và các nốt tân tạo trong giai đoạn sau [9]. Nhiều hệ thống cho điểm mức độ hoại tử này, nhưng phổ biến nhất hiện nay là bảng chỉ số đánh giá hoạt tính mô học (HAI: Histologic activity index) dựa trên công trình nghiên cứu của Knodell và Ishak [30].

Bảng 1.1. Hệ thống điểm của Knodell - Ishak trong viêm gan mạn [30].

Hình ảnh mô bệnh học	Mức độ	Điểm
1. Hoại tử quanh khoảng cửa (mối găm, cầu nối)	- Không có	0
	- Hoại tử kiểu mối găm nhẹ	1
	- Mối găm vừa	3
	- Mối găm nặng	4
	- Mối găm vừa + hoại tử kiểu cầu nối	5
	- Hoại tử nhiều tiểu thùy	10
2. Hoại tử tiểu thùy, hoại tử khối	- Không có	0
	- Nhẹ (dưới 1/3 số tiểu thùy bị tổn thương)	1
	- Vừa (dưới 2/3 số tiểu thùy bị tổn thương)	3
	- Nặng (trên 2/3 số tiểu thùy bị tổn thương)	4
3. Viêm khoảng cửa	- Không có	0
	- Nhẹ (tế bào viêm ở 1/3 số khoảng cửa)	1
	- Vừa (tế bào viêm dưới 2/3 số khoảng cửa)	3

Hình ảnh mô bệnh học	Mức độ	Điểm
	- Nặng (tế bào viêm trên 2/3 số khoảng cửa)	4
4. Xơ	- Không có	0
	- Xơ khoảng cửa lan tỏa	1
	- Xơ khoảng cửa bắc cầu hoặc xơ khoảng cửa có vách ngăn	3
	- Xơ làm đảo lộn cấu trúc bè tế bào gan	4
Số điểm tối đa	22	

Căn cứ vào HAI người ta có thể chia viêm gan mạn ra các mức độ sau:

Bảng 1.2. Phân độ viêm gan theo HAI [30]

HAI	Mức độ	Thuật ngữ đang dùng
1 – 3	Viêm gan mạn rất nhẹ	Viêm gan phản ứng không đặc hiệu, viêm gan mạn tiểu thủy, viêm gan mạn tồn tại.
4 – 8	Viêm gan mạn nhẹ	Viêm gan mạn tiểu thủy, viêm gan mạn tồn tại, viêm gan mạn hoạt động.
9 - 12	Viêm gan mạn vừa	Viêm gan mạn hoạt động vừa.
13- 18	Viêm gan mạn nặng	Viêm gan mạn hoạt động nặng có hoại tử cầu nối.

1.1.4.2. *Chẩn đoán xơ gan: Dựa vào triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng*

* *Triệu chứng lâm sàng:* Bệnh cảnh lâm sàng của xơ gan rất biến thiên, thay đổi tùy giai đoạn.

- *Giai đoạn còn bù:*

+ Triệu chứng cơ năng: Ăn kém ngon, khó tiêu, nặng tức vùng thượng vị;

+ Triệu chứng thực thể: Gan lớn bờ sắc mặt nhẵn chắc không đau, lách lớn, không có cổ trướng, nốt giãn mạch hình sao, lòng bàn tay son [30].

- *Giai đoạn mất bù:* Bệnh biểu hiện qua 2 hội chứng:

+ Hội chứng suy gan:

- Bệnh nhân chán ăn, ăn chậm tiêu, đầy bụng, rối loạn kinh nguyệt, liệt dương, vú lớn;

- Chảy máu chân răng, chảy máu cam, chảy máu dưới da, lông tóc dễ rụng, móng tay khum mặt kính đồng hồ, ngón tay dùi trống gập trong xơ gan mật;

- Mặt, ngực và chi trên gầy, 2 chân phù mềm, da vàng nhẹ, thiếu máu;

- Có nốt giãn mạch hình sao ở ngực và lưng, hồng ban lòng bàn tay, môi đỏ, lưỡi bóng đỏ, vú lớn, teo tinh hoàn, viêm thần kinh ngoại biên, gan nhỏ lại [10].

+ Hội chứng tăng áp lực tĩnh mạch cửa: Khởi đầu là bụng trướng hơi, đi ngoài phân sệt hoặc đi ngoài ra máu, nôn ra máu.

- Tuần hoàn bàng hệ kiểu cửa chủ ở vùng thượng vị và 2 bên mạn sườn, vùng hạ vị và 2 bên hố chậu, hoặc quanh rốn (hình đầu sứa) hoặc có khi là những nối tắt giữa hệ cửa và chủ bên trong. Trong trường hợp cổ trướng lớn chèn ép tĩnh mạch chủ dưới sẽ có thêm tuần hoàn bàng hệ kiểu chủ chủ phối hợp;

- Lách to: lúc đầu mềm, về sau xơ hóa trở nên chắc hoặc cứng;

- Cổ trướng: thể tự do. Nguyên nhân chính là do tăng áp tĩnh mạch cửa, ngoài ra còn do các yếu tố khác như giảm áp lực keo, giảm sức bền thành mạch, yếu tố giữ muối và nước [30].

** Triệu chứng cận lâm sàng:*

- *Giai đoạn còn bù:* Nội soi, siêu âm, chụp cắt lớp vi tính, đo độ đàn hồi gan. Nếu không rõ có thể sinh thiết gan [30].

- *Giai đoạn mất bù*

+ Hội chứng tăng áp lực tĩnh mạch cửa: Đo đường kính tĩnh mạch cửa, tĩnh mạch lách bằng siêu âm: Bình thường 8-11mm, khi có tăng áp cửa thì đường kính lớn hơn 13 mm, đường kính tĩnh mạch lách lớn hơn 11 mm [30].

+ Các xét nghiệm đánh giá chức năng gan [29]:

- Protid máu giảm, nhất là albumin, gama- globulin tăng, A/G đảo ngược;

- Tỷ lệ prothrombin: Giảm, đây là 1 yếu tố tiên lượng nặng;

- Cholesterol máu: Giảm, nhất là loại ester hóa;

- Các xét nghiệm chức năng gan đặc hiệu: Nghiệm pháp Galactose niệu (+), thanh thải caffein (+);

- Rối loạn điện giải: Natri máu tăng hoặc giảm, kali máu giảm, natri niệu giảm (natri niệu < 25 mEq/ 24 giờ), NH_3 máu tăng.

- + Hội chứng hủy hoại tế bào gan: Biểu hiện khi có viêm trong xơ gan tiến triển với tăng AST, ALT;

- + Hội chứng thiếu máu: Đắng sắc, hoặc giảm 3 dòng tế bào máu khi có cường lách.

- + Các xét nghiệm ghi hình:

- Siêu âm gan: gan nhỏ, bờ không đều, tĩnh mạch cửa, tĩnh mạch lách giãn, tái lập tĩnh mạch rốn, thuyên tắc tĩnh mạch cửa;

- Chụp cắt lớp tỷ trọng: cho hình ảnh tương tự [30].

- + Giải phẫu bệnh: Là xét nghiệm quyết định trong chẩn đoán xơ gan, góp phần chẩn đoán nguyên nhân và phân loại xơ gan.

- Đại thể: Gan thay đổi kích thước, mật độ và màu sắc, gan có thể to và nặng hơn bình thường, do xâm nhập mỡ và các thành phần khác.

Đa số các trường hợp gan bị teo nhỏ, nhẹ hơn gan thường do tế bào gan bị chết dần và teo nhỏ, đồng thời bị mô xơ co kéo, bóp chặt. Thường gan trái bị teo nặng hơn gan phải. Người ta cho rằng gan trái nhận máu của tĩnh mạch mạc treo tràng dưới nên kém dinh dưỡng hơn gan phải. Trên mặt gan thường có những nodule tái tạo, vây quanh có những dải xơ nổi lên như những đầu đinh. Kích thước những hạt đầu đinh thay đổi tùy từng trường hợp, đường kính có thể từ 1 - 2 mm đến 3 cm hoặc lớn hơn [9],[26].

- Vi thể:

Tổn thương mô liên kết: Thành phần mô liên kết bao gồm những mô bào, những tế bào sợi, những sợi liên võng, những sợi tạo keo và những huyết quản. Chúng không những phát triển mạnh ở những khoảng cửa và vách các tiểu thùy mà còn từ đó xâm lấn vào các tiểu thùy hoặc từ những ổ xơ sẹo trong tiểu thùy lan ra vùng chu vi tiểu thùy. Chúng còn phát triển quanh

những hạt gan mới tái tạo. Như vậy sự tăng sinh xơ đã tạo nên những dải xơ rộng vây quanh những hạt nhu mô gan (còn gọi là cục nhu mô gan).

Tổn thương nhu mô: Có thể gặp mọi loại tổn thương tế bào gan từ sung độc, thoái hoá hạt, thoái hoá hốc, thoái hoá kính đến teo chết và hoại tử. Tế bào bị tổn thương hoặc nằm riêng lẻ giữa những bè gan lành hoặc tạo thành những đám nhỏ hoặc to. Những tổn thương này không những gặp trong các tiểu thùy gan mà cả trong các đám tế bào gan tái tạo [9],[26].

Bảng 1.3. Phân loại xơ gan theo Child-Pugh [31]

Nội dung	Điểm số		
	1	2	3
Bilirubin toàn phần mg/dL (mmol/L)	< 2 (< 34)	2 - 3 (34 - 50)	> 3 (> 50)
Albumin huyết thanh g/L (mmol/L)	> 35 (> 507)	28 - 35 (406 - 507)	< 28 (< 406)
INR hoặc Thời gian Prothrombine (giây: s)	< 1,7 < 4	1,71- 2,30 4 - 6	> 2,30 > 6
Cổ trướng	Không	Nhẹ/trung bình (đáp ứng với lợi tiểu)	Nặng (không đáp ứng với thuốc lợi tiểu)
Hội chứng não gan	Không	Mức độ I-II (hoặc có thể kiểm soát với thuốc)	Mức độ III-IV (hoặc không phục hồi)

Phân loại: Mức độ A: 5-6 điểm, mức độ B: 7-9 điểm; Mức độ C: 10-15 điểm

Xơ gan mất bù: Child Pugh B hoặc C

1.1.5. Điều trị viêm gan mạn, xơ gan

1.1.5.1. Điều trị viêm gan mạn

* Điều trị viêm gan do rượu:

- Ngừng rượu: Là phương pháp điều trị chính và quyết định thành công của các liệu pháp điều trị.

- Chế độ dinh dưỡng: Cung cấp chế độ ăn giàu calo, giàu vitamin.

Thường xuyên đánh giá bilan dinh dưỡng để tránh đưa thừa dinh dưỡng có thể làm tăng nguy cơ hội chứng não gan, tránh đưa thiếu dinh dưỡng làm tăng quá trình dị hóa dẫn đến suy dinh dưỡng [30].

- Liệu pháp corticoid: Viêm gan do rượu có điểm Maddrey > 32 có hoặc không có hội chứng não gan, hay chỉ số MELD > 18 có chỉ định điều trị corticoid [30].

- Liệu pháp anticytokin: Bệnh căn của viêm gan do rượu là dựa trên cơ chế miễn dịch. Việc điều trị nhằm cắt đứt đáp ứng miễn dịch. Cơ chế miễn dịch được nhấn mạnh nhất là đại thực bào giải phóng ra các chemokin và cytokin, TNF- α , IL1, IL6, IL8. Pentoxifylin là chất ức chế tổng hợp TNF, liều điều trị 400mg uống 3 lần/ngày trong 4 tuần [30].

- Điều trị lọc máu: Các phương pháp điều trị bằng pentoxifylin trong vòng 2 tháng mà triệu chứng không cải thiện cần chỉ định lọc máu với albumin, hoặc các trường hợp viêm gan do rượu nặng có tăng bilirubin máu nhiều [30].

- Ghép gan: Viêm gan do rượu có điểm Maddrey > 32 không đáp ứng với liệu pháp điều trị corticoid và có kèm hoặc không kèm theo chỉ số MELD > 18 [30].

** Điều trị viêm gan do thuốc:*

- Ngừng thuốc nghi ngờ.

- Chủ yếu điều trị triệu chứng và điều trị hỗ trợ gan: Nghỉ ngơi, ăn mềm, dễ tiêu, bổ sung glucose, acid amin, các vitamin nhóm B, vitamin C đường uống. Nuôi dưỡng đường tĩnh mạch hỗ trợ khi bệnh nhân ăn kém hay không ăn được (truyền đường ưu trương 20%, morihepamin,...). Bổ sung vitamin K khi tỷ lệ prothrombin thấp.

- Điều trị đặc hiệu: giới hạn đối với nhiễm độc gan, nhiễm độc PAR dùng N - acetylcystein; nhiễm độc valproat dùng L-carnitin.

- Corticoid khi thuốc gây phản ứng quá mẫn và phản ứng dị ứng như ban đỏ, tăng bạch cầu ái toan.

- Ghép gan: Khi có chỉ định [32].

** Điều trị viêm gan do virus:*

- Điều trị chung:

+ Nghỉ ngơi, hạn chế hoạt động thể lực, kiêng bia rượu.

+ Các thuốc hỗ trợ tế bào gan:

▪ Acid amin chuỗi nhánh (morihepamin, aminoleban....).

▪ Silymarin: viên 70 mg, 6 viên/ ngày chia 3 lần.

- Điều trị đặc hiệu viêm gan virus B: Theo hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh viêm gan virus B của Bộ Y Tế năm 2019 [33].

Các thuốc điều trị đặc hiệu:

+ Nhóm đồng đẳng nucleoside/nucleotide (NAs)

▪ Tenofovir disoproxil fumarate (TDF): Liều dùng: người lớn: 300 mg/ngày, trẻ em ≥ 12 tuổi và cân nặng ≥ 35 kg liều lượng như người lớn.

▪ Entecavir (ETV): Liều dùng: người lớn: 0,5 mg/ngày (1 mg/ngày nếu người bệnh từng sử dụng lamivudine hoặc có xơ gan mất bù), Trẻ ≥ 2 tuổi: tính liều theo cân nặng [10-11 kg: 0,15 mg (3 mL); > 11-14 kg: 0,2 mg (4 mL); > 14-17 kg: 0,25 mg (5 mL); > 17-20 kg: 0,3 mg (6 mL); > 20-23 kg: 0,35 mg (7 mL); > 23-26 kg: 0,4 mg (8 mL); > 26-30 kg: 0,45 mg (9 mL); > 30kg: 0,5 mg (10 mL dung dịch uống hoặc 1 viên 0,5 mg)].

▪ Tenofovir alafenamid (TAF): Liều dùng: người lớn: 25 mg/ngày, trẻ em ≥ 12 tuổi liều lượng như người lớn.

▪ Thời gian điều trị với thuốc NAs kéo dài, có thể suốt đời.

+ Nhóm thuốc điều hòa miễn dịch: tác dụng ức chế sự tổng hợp protein của virus. Có thể xem xét chỉ định cho người bệnh muốn điều trị trong thời gian ngắn hạn; người bệnh đồng nhiễm HDV; hoặc người bệnh có tải lượng virus thấp và ALT tăng cao, không muốn điều trị dài hạn bằng nhóm đồng đẳng nucleoside/nucleotide.

▪ Peg-IFN- α -2a: Người lớn liều dùng 180 μ g/tuần. Thời gian điều trị 48 tuần

▪ IFN- α -2b: Trẻ ≥ 1 tuổi: 6 triệu đơn vị/m² x 3 lần/tuần. Thời gian điều trị nhóm HbeAg (+) 16 – 24 tuần.

- Điều trị đặc hiệu viêm gan virus C: Theo hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh viêm gan virus C của Bộ Y Tế năm 2016 [31].

+ Các thuốc điều trị đặc hiệu:

- Peg-IFN- α -2a: liều dùng 180 mg/lần/tuần, tiêm dưới da bụng, 12-24 tuần (giảm liều nếu có tác dụng bất lợi).

- Peg-IFN- α -2b: liều dùng 1,5 mg/kg/lần/tuần, tiêm dưới da bụng, 12-24 tuần (giảm liều nếu có tác dụng bất lợi).

- Ribavirin (RBV): viên nang 200, viên nén 400 và 500 mg. Liều dùng: 1000 mg cho người dưới 75kg; 1200 mg cho người trên 75kg; uống hàng ngày trong 12, 24 tuần tùy phác đồ (giảm liều nếu có tác dụng bất lợi).

- Sofosbuvir (SOF): viên nén 400 mg. Liều dùng: 1 viên/ngày, uống buổi sáng (không sử dụng cho người bệnh có mức lọc cầu thận <30 ml/phút/1,73 m²).

- Daclatasvir (DCV): viên nén 30 mg, 60 mg. Liều dùng: 1 viên/ngày, uống buổi sáng.

- Sofosbuvir/ Ledipasvir (LDV): viên nén chứa 400 mg SOF /90 mg LDV. Liều dùng: 1 viên/ngày, uống buổi sáng, tránh các thuốc kháng acid.

- Sofosbuvir/ Velpatasvir (VEL): viên nén chứa 400 mg SOF /100 mg VEL. Liều dùng: 1 viên/ngày, uống buổi sáng.

- Paritaprevir (PTV)/Ombitasvir (OBV)/Ritonavir: Viên nén chứa: 75 mg PTV/12,5 mg OBV/ 50 mg ritonavir. Liều dùng: 2 viên/ngày, uống buổi sáng, uống trong bữa ăn.

- Dasabuvir (DSV): viên nén 250 mg. Liều dùng: 2 viên/ngày, uống 1 viên buổi sáng, 1 viên buổi chiều, uống trong bữa ăn.

- Simeprevir (SMV): viên nang 150 mg. Liều dùng: 1 viên/ngày, uống trong bữa ăn.

- Grazoprevir (GZR)/ Elbasvir (EBR): viên nén chứa Grazoprevir 100 mg /elbasvir 50 mg. Liều dùng: 1 viên/ngày.

+ Phác đồ điều trị: Theo phác đồ điều trị viêm gan vi rút C mạn trên người bệnh không xơ gan (theo kiểu gen) của Bộ Y tế năm 2016 [31].

1.1.5.2. Điều trị xơ gan

* Chế độ ăn uống sinh hoạt:

- Giai đoạn còn bù: có thể làm việc và sinh hoạt bình thường nhưng tránh vận động mạnh, nên ăn nhạt và kiêng bia rượu. Giai đoạn mất bù nên nghỉ ngơi hoàn toàn;

- Không sử dụng thuốc an thần và paracetamol;

- Đảm bảo cung cấp đủ năng lượng 35 – 40 kcal và 1,2 – 1,5 g protein/kg cân nặng [30].

* Điều trị nguyên nhân:

- Xơ gan do virus viêm gan B: Dùng thuốc ức chế virus như lamivudin, entecavir, tenofovir [33].

- Xơ gan do virus viêm gan C: Điều trị theo phác đồ điều trị viêm gan vi rút C mạn trên người bệnh xơ gan còn bù (Child Pugh A) và phác đồ điều trị viêm gan vi rút C mạn trên người bệnh có xơ gan mất bù (bao gồm suy gan vừa và nặng, Child Pugh B hoặc C) của Bộ Y tế năm 2016 [31].

- Xơ gan do rượu: bệnh nhân phải ngừng sử dụng rượu, có thể xem xét dùng corticoid;

- Xơ gan mật tiên phát: dùng acid ursodeoxycholic [30].

* Điều trị biến chứng:

- Cổ trướng: chế độ ăn hạn chế muối kết hợp với lợi tiểu kháng aldosteron và furosemid. Nếu nặng có thể nối thông hệ thống tĩnh mạch cửa và tĩnh mạch trên gan (TIPS: Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt);

- Bệnh lý não gan: chế độ ăn hạn chế protein, ưu tiên cung cấp acid amin phân nhánh, làm sạch ruột (uống hoặc thụt lactulose), kháng sinh [30];

- Giảm vỡ tĩnh mạch thực quản: cầm máu qua nội soi, các thuốc tác động đến vận mạch (somatostatin, octreotid, terlipressin) hoặc có thể làm thông giữa hai hệ thống tĩnh mạch cửa và chủ;

- Nhiễm trùng dịch cổ trướng: sử dụng kháng sinh;
- Hội chứng gan thận: Ngừng lợi tiểu, dùng human albumin, terlipressin 1mg tiêm tĩnh mạch 2 -4 lần/ngày [30].

** Điều trị dự phòng:*

- Giãn vỡ tĩnh mạch thực quản: Thắt búi giãn qua nội soi, sử dụng thuốc ức chế β giao cảm;
- Nhiễm trùng dịch cổ trướng: Ciprofloxacin, cephalosporin thế hệ 3;
- Bệnh lý não gan: lactulose uống hoặc thụt [30].

** Ghép gan:* Cho những trường hợp có chỉ định [30].

1.2. Mô hình nghiên cứu thuốc có tác dụng chống viêm gan cấp, xơ gan trên thực nghiệm

1.2.1. Mô hình nghiên cứu thuốc có tác dụng chống viêm gan cấp

1.2.1.1. Đặc điểm chung của mô hình nghiên cứu đánh giá tác dụng dược lý của thuốc chống viêm gan cấp thực nghiệm

- Gan đảm nhiệm nhiều chức năng khác nhau nhưng khi mắc bệnh viêm gan thì không phải tất cả các chức năng này đều có sự biến đổi như nhau, do đó cần phải có nhiều thí nghiệm khác nhau khi đánh giá tác dụng của một thuốc trên gan. Các chức năng gan có thể là nội tiết như tạo ra các enzym làm nhiệm vụ tổng hợp và thoái giáng glycogen, cholesterol, prothrombin; có thể là ngoại tiết như tạo thành mật, muối mật, acid mật; có thể là chức năng chuyển hóa như khử độc thuốc, miễn dịch [22].

- Để đánh giá tác dụng chống viêm gan cấp của thuốc một cách toàn diện, hiện nay thường dùng ít nhất 1 trong các loại nghiệm pháp sau [22].

- + Đối kháng với tác dụng gây tổn thương do các chất độc trên gan;
- + Tác dụng lợi mật và chống ứ mật;
- + Tác dụng điều hòa miễn dịch;
- + Tác dụng trên virus viêm gan.

- Mỗi một chất độc với gan có thể ảnh hưởng đến một số nhất định các chức năng khác nhau của cơ quan dưới tế bào gan, do đó nhiều khi cần phải thử thuốc trên nhiều chất độc đối với gan. Ngoài ra, có rất nhiều thông số hóa sinh khác nhau cần nghiên cứu để đánh giá sự tổn thương và phục hồi chức

năng của các bào quan trong tế bào gan như ty thể, lysosom, hoặc bào tương. Các nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng nhiều chất độc gan khác nhau để gây độc gan và thông qua nhiều thông số để đánh giá kết quả nghiên cứu [22].

- Việc nghiên cứu có thể tiến hành *in vivo* hoặc *in vitro*. Ngoài đánh giá các thông số sinh hóa cần đánh giá cả các thông số mô bệnh học. Cuối cùng là nghiên cứu trên sự tái sinh gan ở con vật bị cắt gan một phần [22],[34].

- Các nghiên cứu thuốc có tác dụng trên gan trong và ngoài nước hiện nay chủ yếu thường áp dụng mô hình nghiên cứu đối kháng với tác dụng gây tổn thương do các chất độc trên gan. Ngoài ra có thể tiến hành thêm một số nghiên cứu tác dụng dược lý liên quan như tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, lợi mật... góp phần minh chứng cho cơ chế tác dụng về khả năng bảo vệ gan và tăng phục hồi tổn thương gan của thuốc [22],[35].

- Nghiên cứu thuốc có tác dụng chống viêm gan cấp thực nghiệm trên mô hình đối kháng với tác dụng gây tổn thương do các chất độc trên gan có thể tiến hành theo hai hướng: tác dụng bảo vệ gan (gây độc gan sau khi dùng thuốc thử nghiệm) và tác dụng tăng phục hồi tổn thương gan (gây độc gan trước khi dùng thuốc thử nghiệm). Tất cả các mô hình thực nghiệm đều được tiến hành theo quy trình: Gây độc động vật thực nghiệm bằng các chất đã được chứng minh có độc tính cấp với gan, sử dụng thuốc nghiên cứu và thuốc đối chứng cho các nhóm động vật nghiên cứu và cuối cùng là đánh giá tác dụng trên gan của thuốc nghiên cứu thông qua các chỉ số đánh giá khác nhau, so sánh với thuốc đối chứng.

- Động vật sử dụng trong nghiên cứu có thể là động vật lớn như chó, lợn... với ưu điểm ngoài việc đánh giá các thông số chức năng gan còn có thể đánh giá được các thông số sinh lý bổ sung như: Áp lực nội sọ, cung lượng tim, sức cản mạch máu toàn thân và mức độ methaemoglobin huyết [36],[37]. Tuy nhiên các động vật nghiên cứu nhỏ như chuột nhắt, chuột cống... được sử dụng rộng rãi hơn do giá thành rẻ, có thể sử dụng số lượng mẫu nghiên cứu lớn hơn, cơ chế tổn thương gan rõ [36].

- Trong các nghiên cứu đã được thực hiện, nghiên cứu đối kháng với tác dụng gây tổn thương do các chất độc trên gan là nghiên cứu được tiến hành rộng rãi do đánh giá được trực tiếp kết quả điều trị của thuốc thử nghiệm và phù hợp với thực tiễn lâm sàng. Hiện nay có một số chất được dùng để gây tổn thương gan trong nghiên cứu thực nghiệm như cacbon tetracolorid, paracetamol, D-galactosamin, aflatoxin B, concanavalin A, rượu.....[34],[38], nhưng chất hay được sử dụng nhất là PAR và CCl_4 do đặc điểm tổn thương điển hình, khả năng gây độc gan trên thực nghiệm đã được chứng minh và dễ tiến hành, tần suất gặp tổn thương trên thực tế là rất lớn, nhất là với PAR [39].

Bảng 1.4. Các chất độc với gan được dùng để gây tổn thương gan thực nghiệm ở chuột cống trắng [22].

Các chất độc với gan	Liều dùng/kg	Đường dùng	Giết chuột sau (ngày)
Aflatoxin B	7 mg	uống	4
Amanita phaloides	50 mg	uống	10
Cacbon tetracolorid	0,7ml x 6 lần	ip	2
D-Galactosamin	8 mg	ip	1
Lanthanum	4 mg	iv	4
Monocrotalin	120 mg	uống	12
Paracetamol	2g	uống	2
Thioacetamid	100mg	sc	2

- Việc đánh giá tác dụng của thuốc thử nghiệm được tiến hành thông qua việc so sánh sự thay đổi các chỉ số sinh hóa, huyết học, mô bệnh học giữa các lô dùng thuốc thử nghiệm, thuốc chứng, lô chứng sinh học và lô gây độc không dùng thuốc.

1.2.1.2. Mô hình nghiên cứu sử dụng paracetamol gây độc gan

* *Cơ chế gây độc gan của PAR*: Hầu hết PAR chuyển hóa tại gan (90%) gắn kết với sulfat và glucuronid rồi thải ra nước tiểu. Phần còn lại 1 nửa thải ra nước tiểu dưới dạng nguyên vẹn, 1 nửa được oxy hóa thành N-acetyl-p-benzoquinoneimin (NAPQI) qua cytochrome P450 ở gan (CYP2E1, CYP1A2,

CYP3A4). NAPQI là chất độc với gan. Với liều PAR thích hợp, tạo ra lượng nhỏ NAPQI và nhanh chóng kết hợp với glutathion tại gan để tạo thành cystein và acid mercapturic không độc và được đào thải qua nước tiểu. Tuy nhiên với liều gây độc, con đường gắn kết với sulfat và glucuronid bị bão hòa nên nhiều PAR chuyển thành NAPQI qua CYT P450. Khi dự trữ glutathion giảm hơn 70%, NAPQI bắt đầu phản ứng với cấu trúc tế bào gan gây tổn thương tế bào gan [40],[41]. Đầu tiên NAPQI đã được chứng minh là liên kết với các protein ty thể và gây ra rối loạn chức năng ty thể [42], rối loạn chức năng ty thể có vai trò trong nhiễm độc gan ở cả chuột [43], và con người [44]. NAPQI liên kết với các nhóm sulfhydryl của protein tế bào bao gồm protein ty thể dẫn tới hình thành sản phẩm cộng của protein và PAR (PAR – protein adducts) [45]. Điều này ức chế chuỗi vận chuyển điện tử và dẫn đến stress oxy hóa ty thể và hình thành peroxynitrit [46]. Stress oxy hóa sớm kích hoạt sự hoạt hóa của protein kinase được hoạt hóa bằng mitogen (MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase) cuối cùng gây ra hoạt hóa kinase đầu cuối c-Jun (p-JNK). JNK (c-jun N-terminal Kinase) có thể kích hoạt một loạt các tăng tín hiệu thông qua quá trình phosphoryl hóa [47] không chỉ các yếu tố phiên mã như c-jun, p53, ATF-2 mà còn kích hoạt họ protein Bcl 2 [48]. Họ protein Bcl 2 được coi là tác nhân điều hòa cơ chế gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis), những protein này nằm ở lớp màng ngoài bán thấm của ty thể, một vài thành viên trong số chúng có vai trò kích thích quá trình chết tế bào theo chương trình (Bax, BAD, Bak và Bok), một số lại có vai trò ức chế quá trình này (Bcl-xL và Bcl-w). JNK sau đó chuyển dịch tới ty thể để làm trầm trọng thêm tình trạng stress oxy hóa của ty thể [47],[49]. Stress oxy hóa thúc đẩy quá trình mở lỗ thấm của ty thể (MPT: Mitochondrial permeability transition), dẫn đến sự sụp đổ của điện thế màng và ngừng tổng hợp adenosine triphosphat (ATP) [50]. Sự hình thành sớm của lỗ thấm dựa trên sự kích hoạt protein Bax ở màng ngoài ty thể sau đó là sự sưng phồng của gian bào cùng với tổn thương vỡ màng ngoài ty thể dẫn đến giải phóng các protein liên màng như endonuclease G và nhân tố

kích thích gây ra chết tế bào theo chương trình (AIF: apoptosis-inducing factor), endonuclease G và AIF chuyển dịch vào trong nhân tế bào gây ra sự phân mảnh đối với hạt nhân DNA [51],[52]. Sự rối loạn nặng nề chức năng ty thể, thiếu hụt do ngừng tổng hợp ATP và tổn thương DNA nhân là nguyên nhân chính gây chết tế bào [38],[44].

** Sử dụng paracetamol gây độc gan trong nghiên cứu thực nghiệm:*

- PAR là chất gây độc gan phụ thuộc vào liều lượng, trên chuột nhắt trắng ở liều 150 mg/kg đường uống chưa có độc tính rõ, với liều 500 mg/kg đường uống đã thể hiện rõ độc tính [53]. Sử dụng PAR liều 600 mg/kg đường uống gây chết 80% chuột và liều 1 g/kg gây chết 100% chuột [54]. Hiện nay hầu hết các nghiên cứu đều sử dụng PAR gây độc trên chuột nhắt bằng đường uống với liều 400 mg/kg vì có một số ưu điểm như tỷ lệ chuột chết thấp, đảm bảo mức độ tổn thương gan vừa phải, đường uống PAR phù hợp với thực tiễn lâm sàng [55],[56].

- Phương pháp sử dụng mô hình gây độc bằng PAR trên các chủng chuột nhắt trắng đã được rất nhiều tác giả áp dụng trong các nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan của thuốc từ dược thảo trên thực nghiệm [34],[35].

1.2.1.3. Mô hình nghiên cứu sử dụng CCl_4 gây độc gan

Mô hình gây độc gan cấp bằng CCl_4 là một trong những mô hình được sử dụng phổ biến nhất trong nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan của thuốc [57] vì có tính tương đồng về tổn thương gan gây ra bởi CCl_4 trên nhiều loài như chuột nhắt, chuột cống, thỏ so với tổn thương gan người [58].

** Cơ chế gây độc gan của CCl_4 :*

Trong cơ thể, CCl_4 được chuyển hóa phần lớn qua CYP2E1 và một phần nhỏ qua CYP2B1, CYP2B2, CYP3A4 thành gốc tự do trichloromethyl (CCl_3^*) [59]. Gốc tự do CCl_3^* gây tổn thương gan thông qua hai con đường chính là haloalkyl hóa và peroxy hóa lipid, tương ứng với hai con đường này

là hai cơ chế: liên kết cộng hóa trị trực tiếp vào các phân tử quan trọng và peroxy hóa lipid [60],[61]. Cả hai cơ chế này đều gây tổn thương tế bào gan và cuối cùng dẫn đến chết tế bào.

- Cơ chế peroxy hóa lipid: Với sự có mặt của oxy, gốc tự do CCl_3^* phản ứng với oxy tạo ra gốc tự do trichloromethylperoxy (CCl_3OO^*), CCl_3OO^* có khả năng phản ứng cao hơn nhưng kém bền vững hơn CCl_3^* [62]. CCl_3OO^* khơi mào phản ứng dây chuyền của peroxy hóa lipid dẫn đến tấn công và phá hủy các acid béo chưa bão hòa, đặc biệt là những acid béo liên quan đến phospholipid màng tế bào. Quá trình này làm thay đổi tính thấm của ty thể, lưới nội chất và màng tế bào, hậu quả là gây mất cân bằng Ca^{2+} nội môi và tổn thương tế bào. Ngoài ra, sản phẩm thoái hóa của các acid béo là các aldehyd hoạt động, đặc biệt là 4-hydroxynonenal, có thể liên kết với các nhóm chức năng của protein dẫn đến ức chế hoạt động của các enzym quan trọng như Ca^{2+} - ATPase, Na^+ , K^+ -ATPase, phosphatase, protein kinase [60],[63],[64] dẫn đến tổn thương tế bào.

- Cơ chế liên kết cộng hóa trị: Gốc tự do CCl_3^* có thể liên kết cộng hóa trị với các phân tử (như acid nucleic, protein, lipid) làm rối loạn chuyển hóa lipid và dẫn đến thoái hóa mỡ. Sản phẩm hình thành giữa CCl_3^* và ADN (acid deoxyribonucleic) được xem như tác nhân khơi mào ung thư gan. Ngoài ra, độc tính của CCl_4 còn liên quan đến giảm methyl hóa các thành phần của tế bào như giảm methyl hóa ARN làm giảm tổng hợp protein, giảm methyl hóa phospholipid dẫn đến giảm tiết lipoprotein [60]. Ở cấp độ phân tử, CCl_4 hoạt hóa yếu tố hoại tử khối u ($\text{TNF}\alpha$), nitric oxyd (NO), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng (TGF) α và β trong tế bào. $\text{TNF}\alpha$ thúc đẩy quá trình chết tế bào theo chương trình, trong khi đó các TGF β hướng tới gây xơ hóa gan [60].

** Sử dụng CCl_4 gây độc gan trong nghiên cứu thực nghiệm:*

- Cho đến nay, mô hình gây độc gan bằng CCl_4 đã được tiến hành trên nhiều động vật thí nghiệm như thỏ [65], chuột nhắt [66], chuột cống [67]. Trong đó, động vật thí nghiệm thường được sử dụng là chuột cống và chuột nhắt;

- Có nhiều đường dùng để gây tổn thương gan như đường tiêm màng bụng, tiêm dưới da hoặc đường uống với nhiều mức liều rất khác nhau từ 0,02 ml/kg - 2 ml/kg, có thể dùng đơn liều hoặc đa liều. Trong đó, tiêm màng bụng là đường dùng phổ biến nhất, đường dùng này có ưu điểm là gây tổn thương gan ổn định hơn so với tiêm dưới da [65].

1.2.2. Mô hình nghiên cứu thuốc có tác dụng chống xơ gan

- Để nghiên cứu tác dụng chống xơ gan của thuốc, vấn đề đầu tiên là gây được mô hình xơ gan trên thực nghiệm. Hiện nay, các tác giả trên thế giới đã áp dụng nhiều phương pháp khác nhau để gây mô hình xơ gan thực nghiệm như: gây mô hình xơ gan thực nghiệm bằng ethanol, carbon tetrachlorid, thiocetamid, dimethylnitrosamin và diethylnitrosamin, chế độ ăn thiếu methionin cholin, chế độ ăn giàu chất béo, thắt ống dẫn mật, gây mô hình xơ hóa gan bằng virus viêm gan [58]... Trong đó mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4 hiện nay được sử dụng nhiều nhất do tính tương đồng của xơ hóa gan so với nhiễm độc gan mạn tính gây ra xơ gan ở người [58].

- Chuột cống trắng và chuột nhắt trắng là 2 loài động vật thường được sử dụng trong nghiên cứu, trong đó nghiên cứu trên chuột nhắt trắng được lựa chọn bởi nhiều tác giả vì mức trao đổi chất của CCl_4 ở chuột nhắt trắng cao hơn so với chuột cống trắng [68] và chi phí thấp nên có thể có cỡ mẫu lớn hơn trong nghiên cứu [69]. Tính nhạy cảm với CCl_4 gây ra xơ gan phụ thuộc vào giống chuột nhắt trắng, các nghiên cứu đã chứng minh chuột BALB/c biểu hiện xơ hóa gan nhiều hơn khi gây độc bằng CCl_4 so với các giống khác như C57BL/6 và DBA/2 [70].

- Về đường dùng CCl_4 gây mô hình xơ gan trên thực nghiệm: Có thể dùng đường tiêm dưới da, đường uống, đường tiêm màng bụng. Đường tiêm màng bụng là đường dùng được lựa chọn nhiều hơn cả do những lợi điểm như: tỷ lệ chuột chết thấp, khả năng gây xơ gan rõ [71].

- Về liều và thời gian sử dụng CCl_4 gây mô hình xơ gan trên thực nghiệm:

+ Các tác giả trên thế giới thường sử dụng CCl_4 với liều 1 μl /1g thể trọng pha trong dầu olive với tỷ lệ 1 CCl_4 / 7 dầu olive, tiêm màng bụng 2 lần/ tuần

trong 8 đến 12 tuần để gây xơ gan trên chuột nhắt trắng thực nghiệm, hoặc có thể dùng CCl_4 với mức liều trong khoảng từ 300 – 1000 $\mu\text{l/kg}$ thể trọng chuột tiêm màng bụng 2 – 3 lần/tuần trong 4 – 6 tuần [69]. Một nghiên cứu cho thấy, với giống chuột C57BL/6 mức liều gây xơ gan bằng CCl_4 tiêm màng bụng ở trong khoảng 0,5 – 0,7 $\mu\text{l/g}$ thể trọng, tiêm 2 – 3 lần/tuần trong thời gian từ 4 – 6 tuần [69].

+ Tại Việt Nam, năm 2014 nhóm tác giả Trương Hải Nhung và cộng sự đã tiến hành gây mô hình xơ gan trên chuột nhắt trắng chủng Swiss bằng CCl_4 . Trong nghiên cứu này, các tác giả đã dùng CCl_4 đường uống với mức liều 1000 $\mu\text{l/kg}$ thể trọng chuột, 3 lần/ tuần trong 11 tuần và cho kết quả chuột có xơ gan rõ [72].

- Khi nghiên cứu tác dụng của thuốc trên xơ gan, có thể đánh giá kết quả thông qua xác định các thông số như:

+ Các thông số đánh giá sự hủy hoại tế bào gan và suy giảm chức năng gan trong huyết thanh: ALT, AST, ALP, bilirubin, protein, albumin, cholesterol...;

+ Các chất chống oxy hóa: SOD, MDA, GSH;

+ Xét nghiệm mô bệnh học gan: Nhuộm hematoxylin- eosin (HE), nhuộm Massive trichrome (nguyên bào sợi);

+ Các xét nghiệm xác định xơ hóa gan: hydroxyprolin, procollagen, intergrin, TGF- α , fibronectin, collagen type1- α 1, collagen type3- α 1 (RT-PCR), collagen type IV.

- Khi nghiên cứu tác dụng trên xơ gan của thuốc, việc đánh giá tác dụng ức chế tạo xơ và tiêu xơ thông qua các thông số xét nghiệm là rất quan trọng.

+ Để đánh giá tác dụng ức chế tạo xơ người ta thường thông qua định lượng collagen trong mô gan, có thể định lượng trực tiếp bằng phương pháp ước tính tỷ lệ diện tích collagen trong sinh thiết gan thu được từ phân tích hình ảnh kỹ thuật số hoặc định lượng gián tiếp thông qua đo nồng độ hydroxyprolin (một acid amin có trong phân tử protein collagen) trong gan;

+ Để đánh giá tác dụng tiêu xơ, ngoài đánh giá thông số hàm lượng collagen trong gan còn phải đánh giá thông số hàm lượng hydroxyprolin trong nước tiểu [22].

1.3. Một số cây thuốc và bài thuốc y học cổ truyền đã được nghiên cứu để điều trị viêm gan

- **Cây kế sữa, cúc gai (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)**: có tác dụng bảo vệ tế bào gan và gần như không có độc tính, đã được biết đến như một dược phẩm điều trị viêm gan ở châu Âu từ thế kỷ 16 với tên thường được nhắc đến là silymarin. Silymarin có tác dụng bảo vệ gan thông qua các cơ chế:

- + Bảo vệ màng tế bào, ổn định màng, ngăn cản sự tấn công của một số chất độc vào gan;
- + Ức chế quá trình peroxy hoá lipid, dọn sạch gốc tự do, giảm sử dụng glutathion của tế bào gan;
- + Ức chế quá trình xơ hoá theo cơ chế trực tiếp và gián tiếp;
- + Kích thích sự tổng hợp protein, làm nhanh chóng phục hồi hệ enzym trong tế bào, phục hồi màng tế bào bị tổn thương, làm tăng quá trình phân bào, kích thích tái tạo tế bào gan [73].

- **Nhân trần (*Adenosma caeruleum* R.Br)**: là vị thuốc thường được dùng để chữa bệnh vàng da, bệnh về đường mật, có tác dụng làm tăng tiết mật, tăng giải độc gan, thanh nhiệt, trừ thấp, chống viêm, kháng khuẩn, chữa các chứng hoàng đản nhiễm trùng, chữa cảm mạo do phong nhiệt [74].

Nghiên cứu của Trần Thuý, Trương Việt Bình, Hồ Hải Nam (1997) dùng bài thuốc "nhân trần cao thang" gồm: nhân trần, đại hoàng, chi tử, thảo quyết minh, uất kim, chế dạng cao lỏng cho các bệnh nhân viêm gan mạn thấy thuốc có tác dụng cải thiện triệu chứng lâm sàng tốt, giảm transaminase trong huyết thanh [75].

- **Ngũ vị tử (*Schizandra chinensis* Baill)**: Ngũ vị tử có nguồn gốc khu vực Đông Nam Á và quả ngũ vị tử khô của loài này được dùng trong y học để trị nhiều bệnh trong đó có tác dụng bảo vệ tế bào gan, làm giảm enzym gan [7].

Nguyễn Nhượng Kim, Mai Thị Kim Loan (1999) dùng bài thuốc "Nghiệm phương" YHCT để điều trị bệnh viêm gan mạn và xơ gan giai đoạn còn bù, thấy thuốc có tác dụng cải thiện các triệu chứng lâm sàng, giảm enzym gan và bilirubin toàn phần hiệu quả tương tự như Fortex [76].

- **Diệp hạ châu đắng** (*Phyllanthus amarus* Schum.): được cho rằng có khả năng ức chế DNA polymerase của virus gây viêm gan B.

Phạm Đức Dương (2001) đánh giá tác dụng của VG99 trong thành phần có diệp hạ châu đắng, ngũ vị tử... trên bệnh nhân viêm gan mạn tính thấy qua 2 tháng điều trị, các triệu chứng lâm sàng đều giảm và hết, enzym gan trở về bình thường 60% [77].

- **Nghệ** (*Curcuma longa* L.): Có tác dụng kích thích các tế bào gan bài tiết ra mật là do chất paratolyl methyl cacbinol và tác dụng thông mật của hoạt chất curcumin được chiết xuất từ nghệ [74]. Curcuminoid đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan cấp trên thực nghiệm [78].

- **Chàm tía** (*Strobilanthes cusia* Nees.): có tác dụng thanh nhiệt, tán uất, lương huyết, giải độc, trị nhiệt độc, sưng lở [7]. Đặng Thị Kim Thanh và cộng sự (2000) đã nghiên cứu cho thấy chàm tía có tác dụng cải thiện nhanh các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng trên bệnh nhân viêm gan virus cấp [79].

Phạm Thị Cẩm Yên (2006) dùng bài thuốc AH trong thành phần có chàm tía, nhân trần, bạch truật.... để nghiên cứu trên thực nghiệm tác dụng bảo vệ gan thấy thuốc có tác dụng bảo vệ gan trên cả hai mô hình gây tổn thương gan cấp bằng CCl₄ và PAR liều cao [80].

- **Tam thất** (*Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen): Dương Thị Ly Hương (2004) đã nghiên cứu dạng cao lỏng toàn phần với liều 5 g/kg có tác dụng bảo vệ gan rõ trên mô hình gây viêm gan thực nghiệm và có tác dụng phục hồi tổn thương gan mức độ trung bình với cơ chế chống oxy hoá do làm tăng lượng GSH [81].

- **Cây Sói Nhật**: có tên khoa học *Chloranthus japonicus* Sieb., họ Hoa sói – *Chloranthaceae*. Sói Nhật có vị cay đắng, tính ôn, có độc, có tác dụng tán hàn, khu phong, hoạt huyết, hành ứ, giải độc. Sói Nhật thường dùng trị kiết lý, đau lưng đau mình, ứ huyết sưng đau do ngã hoặc bị đánh... [7].

Đỗ Thị Oanh và cộng sự (2014) qua nghiên cứu tác dụng của cao chiết phần trên mặt đất của cây Sói Nhật liều 4 g và 12 g được liệu /kg thể trọng chuột đã kết luận: cao chiết Sói Nhật có tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan bằng PAR liều 400 mg/kg ở chuột nhắt trắng. Tác dụng bảo vệ gan của cao Sói Nhật trên mô hình gây độc bằng PAR ở chuột nhắt tương đương với silymarin liều 70 mg/kg [56].

Ngoài ra còn có nhiều thuốc y học cổ truyền khác đã được nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan như: cà gai leo, xáo tam phân, lá mơ leo... .

1.4. Tổng quan về cây Dứa dại

1.4.1. Phân loại thực vật và phân bố của cây Dứa dại

1.4.1.1. Phân loại thực vật và phân bố của cây Dứa dại trên thế giới

- Phân loại thực vật: Tên khoa học: *Pandanus tectorius* Parkincon ex Du Roi (*Pandanus odoratissimus* L.f.). Còn gọi là dứa gai, dứa gỗ. Thuộc họ Dứa dại Pandanaceae [74].

- Phân bố: Dứa dại thuộc chi *Pandanus* Parkins, thuộc họ Dứa dại Pandanaceae có khoảng 70 loài đã được chấp nhận tên trên thế giới, phân bố khắp vùng nhiệt đới trừ châu Mỹ. Ở Ấn Độ có 36 loài, trong đó loài Dứa dại *Pandanus odoratissimus* L.f. phân bố rộng trên các bờ biển của Ấn độ, Xrilanca, Myanma, Thái lan, Campuchia, Lào, Trung quốc, Nam quần đảo Ryu Kyu, Malaysia và Philippin [82],[83].

1.4.1.2. Phân loại thực vật và phân bố của cây Dứa dại ở Việt Nam

- Chi *Pandanus* Parkins ở Việt Nam có 20 loài, trong số đó có khoảng 5 loài được sử dụng làm thuốc và hương liệu. Dứa dại *Pandanus tectorius* Parkincon ex Du Roi có tên gọi khác là Dứa gai, Dứa gỗ là loài đặc hữu ở Việt Nam, phân bố ở các tỉnh miền núi hoặc trung du phía Bắc, trên các bãi ẩm có cát, trong các bụi ven biển, dọc bờ ngòi nước mặn, rừng ngập mặn; cũng phân bố trong đất liền ở vĩ độ thấp, dọc theo các sông từ Hòa Bình, Quảng Ninh, Hà Nam tới Quảng Nam, Đà Nẵng, Khánh Hòa, Bình Thuận, Đồng Nai, Kiên Giang [82],[83].

- Dứa dại là cây ưa ẩm và có thể hơi chịu bóng, thường mọc ven rừng ẩm, dọc theo các bờ khe suối, ở độ cao dưới 500m. Cây còn được trồng làm bờ rào ở nương rẫy. Dứa dại có khả năng đẻ nhánh khỏe, sau khi trồng được một hai năm cây đã thành bụi lớn. Cây ra hoa quả hàng năm, nhưng chỉ thấy trên những thân cây lớn không bị chặt phá [82].

- Đặc điểm: Cây nhỏ, phân nhánh ở ngọn, cao 2 – 4 m, với rất nhiều rễ phụ trong không khí thông xuống đất. Lá ở ngọn các nhánh hình dải dài 1 - 2 m, trên gân chính và hai bên mép có gai nhọn. Bông mo đực ở ngọn cây thông xuống với những mo màu trắng rời nhau. Hoa rất thơm bông mo cái đơn độc gồm rất nhiều lá noãn. Cụm quả tạo thành một khối hình trứng dài 16 - 22 cm có cuống màu da cam gồm những quả hạch có góc xẻ thành nhiều ô. Mùa hoa quả: tháng 2 – 5 [74],[83].

- Bộ phận dùng: Rễ, quả, hạt và lá. Rễ thu hái quanh năm: thu các rễ chưa bám đất tốt hơn là rễ ở dưới đất, đem về thái mỏng, phơi hay sấy khô dùng dần [83].



Hình 1.1. Cây, hoa và quả Dứa dại.

(Hình ảnh do Viện Nghiên cứu Y Dược cổ truyền cung cấp)

1.4.2. Thành phần hóa học của Dứa dại

- Hạt phần hoa và lá bắc rất thơm, khi chưng cất, người ta thu được nước thơm và hương liệu. Các phần ngoài của hoa (lá bắc) chứa tinh dầu mà 70% là methyl ether của *b*-phenylethyl alcohol. Hoa nở chứa 0,1 - 0,3% tinh dầu chứa

benzyl benzoat, benzyl salicylat, benzyl acetat, benzyl alcohol, geraniol, linalool, linalyl acetat, bromostyren, guaiacol, phenylethylalcohol và aldehyd [83].

- Từ quả Dứa dại đã chiết, phân lập và xác định cấu trúc được 15 hợp chất gồm 10 chất phenolic và 5 hợp chất flavonoid [84]: Vanilin, *trans*-ethyl caffeate, *cis*-ethyl caffeate, ethyl coumarat, sinapaldehyd, *trans*-3, 4-dihydroxycinnamaldehyd, dihydroconiferyl aldehyd, coniferyl alcohol, 3-hydroxy-1-4 (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propal-1-on, salicylaldehyd, tangeretin, sakuranetin, chrysin, narigenin, 5,8-dihydroxy-7-methoxy-flavon. Trong đó các chất đáng quan tâm là: Vanilin có hoạt tính chống oxy hoá ; *trans*-ethyl caffeate có tác dụng kháng viêm; tangeretin là một flavonoid làm giảm cholesterol, chống khối u, ức chế enzym aromatase; narigenin có tác dụng chống virus và hạ cholesterol [84].

- Tác giả Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự (2015) đã công bố kết quả phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của bốn hợp chất phenolic gồm: vanillin(1) và ba hợp chất dạng lignans là (+)-pinoresinol (2), (+)-syringaresinol (3), (+)-medioresinol (4) được tách chiết từ quả của cây Dứa dại *Pandanus odoratissimus* L.f. thu hái tại Việt Nam [85].

1.4.3. Công dụng của cây Dứa dại

** Trên thế giới:*

- Ở Ấn Độ người ta dùng lá và tinh dầu từ lá bắc để sát trùng, lá còn được dùng trị bệnh phong, giang mai, ghẻ và bệnh bạch bì. Tinh dầu lá dùng trị bệnh đau đầu và thấp khớp;

- Ở Thái Lan, rễ cây được dùng để hạ nhiệt, long đờm, lợi tiểu; còn cụm hoa đực là thuốc trợ tim. Hạt có thể ăn được, cùi quả nếu nấu kỹ để loại bỏ những tinh thể oxalat canxi có thể dùng để ăn. Hương liệu từ hoa và lá bắc nếu thêm dầu dừa (hoặc sáp ong và dầu cây Uoi) dùng làm mỹ phẩm bôi môi. Ngoài ra người ta còn dùng chồi non ở ngọn làm rau ăn như nộm dừa, phần gốc trắng và mềm của lá cũng ăn được [83];

- Quả Dứa dại được dùng làm thực phẩm tại một số nước, trung bình 100g bột từ quả Dứa dại cung cấp 321 kilocalo, 2,2 g protein, 134 mg calci, 108 mg phospho, 5,7 mg sắt, 0,04 mg thiamin, 5 mg vitamin C [86].

* *Tại Việt Nam:* Các bộ phận của cây Dứa dại đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị.

- Đọt non Dứa dại chữa sỏi thận, kinh phong trẻ em [7];
- Rễ Dứa dại dùng điều trị cảm mạo phát sốt, viêm thận, nhiễm trùng đường tiết niệu, viêm gan, xơ gan cổ trướng, viêm kết mạc mắt. Liều dùng: 15 – 30 g, dạng thuốc sắc;
- Hạt dùng trị viêm tinh hoàn, trĩ. Dùng 30 – 60g, dạng thuốc sắc;
- Dứa dại có vị ngọt và nhạt, tính mát, có tác dụng làm ra mồ hôi, giải nhiệt, tiêu viêm, lợi tiểu;
- Quả trị ỉa và ho [83].
- Rễ và quả dứa dại có tác dụng điều trị viêm gan, xơ gan [8]. Theo kinh nghiệm dân gian quả dứa dại thái mỏng, phơi khô dùng 20 – 30 gam sắc nước uống mỗi ngày để điều trị các bệnh về gan.

1.4.4. Một số bài thuốc có Dứa dại

1.4.4.1. *Chữa phù thũng:* Rễ Dứa dại 8 g (nướng), rễ cau non 4 g, vỏ cây đai 8 g (sao vàng), hương nhu 8 g, hoắc hương 8 g, tía tô 8 g, hậu phác 12 g, rễ si 8 g. Tất cả thái nhỏ, sắc với 400 ml nước còn 100 ml, uống làm 2 lần trong ngày [7].

1.4.4.2. *Chữa gãy xương:* Rễ Dứa dại, lá xoan non, ngải cứu, dây tơ hồng, vỏ cây gạo, củ nghệ. Mỗi thứ một nắm nhỏ, giã nát trộn với lòng trắng trứng gà, đắp bó [7].

1.4.4.3. *Chữa đái dầm, đái ít nước, nước tiểu đục:* Rễ Dứa dại 400 g, râu ngô 300 g, củ sả 100 g, nõn tre 50 g, cam thảo dây 20 g. Tất cả nấu với 2 lít nước, đun sôi kỹ trong 30 phút sau đó lọc bỏ bã thêm đường. Người lớn uống mỗi ngày 200 – 300 ml, ngày 2 lần. Trẻ em uống 100 – 150 ml. Một đợt điều trị là 5 ngày, sau đó nghỉ 3 ngày rồi uống tiếp cho đến khi khỏi hẳn [7].

1.4.4.4. *Chữa sỏi thận, đái buốt, đái dắt có máu*: Đọt non Dứa dại 120 g giã nhỏ với ngải cứu 20 g, cò bọ 30 g, phèn đen 10 g. Thêm nước, gạn uống [7].

1.4.4.5. *Chữa kinh phong trẻ em*: Đọt non Dứa dại 12 g, lá nhọ nồi, lá chua me, lá xương xông, búp mít mật mỗi thứ 8 g, nhân hạt đào 5 cái. Tất cả giã nhỏ hòa vào một cốc nước đun sôi để nguội, gạn lấy nước trong, thêm đường uống 2 giờ một lần. Liều lượng: Cứ mỗi tuổi uống một thìa cà phê [7].

1.4.5. *Nghiên cứu tác dụng sinh học*

Một số tác dụng sinh học của Dứa dại đã được các tác giả nghiên cứu:

1.4.5.1. *Tác dụng chống viêm*

Trên mô hình viêm cấp gây phù chân chuột bằng carrageenin và mô hình viêm mạn gây phù chân chuột bằng formalin, cao chiết từ lá *Pandanus odoratissimus* L.f. trong methanol với liều 100 mg/kg đã thể hiện tác dụng chống viêm rõ rệt: tỉ lệ giảm mức độ phù bàn chân chuột là 67% trong mô hình gây viêm cấp bằng carrageenin (tại thời điểm 3h sau khi gây viêm) và 64,2% trong mô hình gây viêm mạn bằng formalin [87].

1.4.5.2. *Tác dụng chống oxy hóa*

* *Tác dụng chống oxy hóa invitro*:

- Phương pháp đánh giá khả năng thu dọn gốc superoxyd: Cao chiết methanol của lá Dứa dại đã ức chế 74,12% gốc superoxyd [88];

- Phương pháp đánh giá khả năng bắt nitric oxid: Cao chiết methanol của lá Dứa dại đã ức chế 73,55% nitric oxid [88];

- Phương pháp đánh giá khả năng bắt gốc hydroxyl: Cao chiết methanol của lá Dứa dại đã ức chế 78,14% gốc hydroxyl [88];

- Phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH: Cao chiết ethyl acetat từ quả Dứa dại có tác dụng chống oxy hóa do có khả năng dọn gốc tự do DPPH với $IC_{50} < 2$ mg/ml [89]. Cao chiết methanol từ rễ Dứa dại có khả năng dọn gốc tự do DPPH với giá trị EC_{50} là 48,3 μ g/ml [90];

- Tác giả Nguyễn Công Thùy Trâm và cộng sự (2017) đã nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của một số phân đoạn chiết và hợp chất phân

lập từ quả cây Dứa dại thu hái tại Việt nam theo phương pháp loại gốc tự do DPPH. Phân đoạn chiết ethyl acetat cho kết quả giá trị SC_{50} 19,30 $\mu\text{g/ml}$, so với chất đối chứng dương acid ascorbic 5,93 $\mu\text{g/ml}$ [91].

** Tác dụng chống oxy hóa in vivo:*

Trên động vật thực nghiệm là chuột Wistar, tiến hành gây tổn thương gan bằng CCl_4 , cao chiết methanol lá Dứa dại liều 50 và 100 mg/kg đã giảm có ý nghĩa ($p < 0,05$) transaminase (AST, ALT), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin, uric acid, lipid peroxidation (LPO) và tăng có ý nghĩa superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) và vitamin E [92].

1.4.5.3. Tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan

- Trên mô hình gây độc gan chuột lang bằng PAR với liều 3 g/kg, đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao chiết methanol từ cụm hoa *Pandanus odoratissimus* cho kết quả: Cao chiết methanol từ cuống hoa có tác dụng bảo vệ gan do làm giảm các chỉ số AST, ALT, ALP, bilirubin toàn phần có ý nghĩa ($p < 0,05$), cùng với sự khác biệt về tổn thương trên giải phẫu bệnh giữa lô dùng thuốc thử và lô mô hình [93].

- Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của chiết xuất ethanol từ rễ *Pandanus odoratissimus* L.f. trên mô hình gây độc gan chuột bằng PAR cho thấy với mức liều 200 mg/kg và 400 mg/kg có tác dụng bảo vệ gan rõ thông qua việc đánh giá hoạt độ các enzym gan và giải phẫu mô bệnh học, tác dụng này phụ thuộc vào liều lượng [94].

- Đánh giá tác dụng phục hồi tổn thương gan từ thuốc sắc của rễ *Pandanus odoratissimus* L.f. cho thấy có tác dụng phục hồi tổn thương gan trên mô hình gây độc gan chuột cống trắng bằng CCl_4 [95].

1.4.5.4. Tác dụng chống tăng lipid máu

Nghiên cứu tác dụng chống tăng lipid máu của phân đoạn *n* – butanol của chiết xuất methanol từ quả cây Dứa dại *Pandanus tectorius* (PTF-b) trên chuột được cho ăn chế độ ăn giàu chất béo cho thấy: Sau 4 tuần sử dụng PTF-b có hiệu quả giảm rõ rệt nồng độ cholesterol toàn phần (TC), triglycerid (TG) và cholesterol tỷ trọng thấp (LDL-c) trong máu và TC, TG trong gan [96].

1.4.5.5. Tác dụng kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng cách xác định đường kính vòng vô khuẩn, sử dụng phương pháp đĩa thạch. Tác giả Dinesh Kumar và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu tác dụng của cao chiết lá Dứa dại (*Pandanus odoratissimus* L.f.) bao gồm chiết xuất trong cồn, chloroform và ether trên hai vi khuẩn gram dương (*Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis*), hai vi khuẩn gram âm (*Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa*) và một loại nấm men (*Candida albicans*). Về tác dụng kháng khuẩn, cả ba chiết xuất đều thể hiện vùng ức chế hiệu quả chống lại các chủng vi khuẩn gram dương. Tuy nhiên, chúng không hiệu quả đối với vi khuẩn gram âm và nấm men. Nồng độ ức chế tối thiểu của chiết xuất cồn, chloroform và ether được tìm thấy lần lượt là 25, 50 và 50 mg /ml chống lại vi khuẩn gram dương [97].

1.4.5.6. Tác dụng an thần gây ngủ

Tác dụng an thần gây ngủ, giải lo âu của cao chiết lá Dứa dại (*Pandanus odoratissimus* L.f.) đã được nghiên cứu trên chuột nhắt trắng sử dụng một số mô hình nghiên cứu dược lý thần kinh: mô hình đo hoạt động tự nhiên, trụ quay rotarod, kéo dài thời gian ngủ của pentobarbital. Kết quả cho thấy cao chiết lá trong methanol liều 50, 100, 200 mg/kg đã làm giảm hoạt động vận động tự phát, vận động kết hợp và kéo dài thời gian ngủ của pentobarbital [98].

1.4.5.7. Tác dụng hạ đường huyết

Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao chiết ethanol từ rễ Dứa dại trên chuột đực chủng Wistar của Sama Venkatesh và cộng sự cho thấy:

- Trên nồng độ glucose huyết của chuột bình thường: Nồng độ glucose huyết của chuột ở cả 3 lô dùng chế phẩm cao chiết ethanol từ rễ Dứa dại với mức liều 75, 150 và 300 mg/kg đều giảm so với lô chứng sinh học. Trong đó với mức liều 300 mg/ kg có glucose huyết tương giảm nhiều nhất là 13,09% sau 3 giờ dùng thuốc [99].

- Trên mô hình gây tăng đường huyết thực nghiệm do glucose ngoại sinh: Sau khi uống glucose với liều 2 g/kg, nồng độ glucose huyết tương của các lô dùng chế phẩm cao chiết ethanol từ rễ Dứa dại với mức liều 75, 150 và 300 mg/kg đều giảm so với lô chứng sinh học. Mức giảm tại thời điểm sau

uống glucose 1 giờ là 24,77%, 41,66% và 54,31% tương ứng với mức liều 75, 150 và 300 mg/kg [99].

- Trên mô hình gây tăng đường huyết thực nghiệm bằng tiêm màng bụng alloxan monohydrat liều 120 mg/kg: Tại thời điểm 3 giờ sau tiêm màng bụng alloxan monohydrat liều 120 mg/kg, mức giảm glucose huyết của mức liều 150 và 300 mg/kg cao chiết ethanol từ rễ Dứa dại so với lô chứng sinh học là 29,64 và 38,71 %. Tại thời điểm 5 giờ mức giảm tương ứng là 37,81 và 51,44% [99].

1.4.5.8. Nghiên cứu độc tính cấp

Sama Raju và cộng sự (2011) đã tiến hành nghiên cứu độc tính cấp của chiết xuất methanol lá Dứa dại trên chuột nhắt trắng theo hướng dẫn của OECD 2011. Kết quả cho thấy với liều 2 g/kg căn khô cao chiết lá Dứa dại trong methanol không thể hiện độc tính cấp trên chuột nhắt trắng theo đường uống [98].

Đến nay, chúng tôi chưa thấy có tài liệu nào nghiên cứu về độc tính của quả Dứa dại trồng ở Việt Nam được công bố.

CHƯƠNG 2

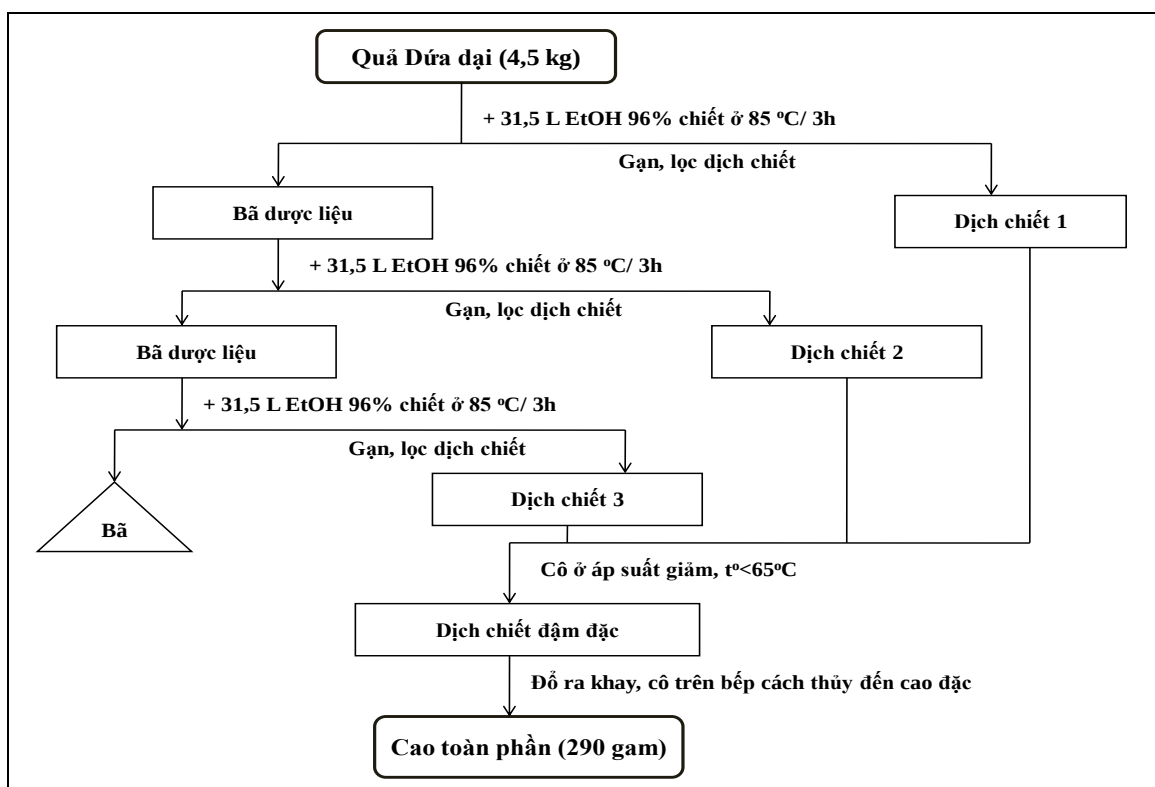
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

- Mẫu quả Dứa dại dùng trong nghiên cứu được thu hái tại khu vực vùng đồi núi ven biển, vùng phụ cận vườn quốc gia Bạch Mã thuộc thôn Hải Bình, xã Lộc Bình, huyện Phú Lộc tỉnh Thừa Thiên Huế (có giấy chứng nhận mẫu nghiên cứu kèm theo tại phụ lục 1)

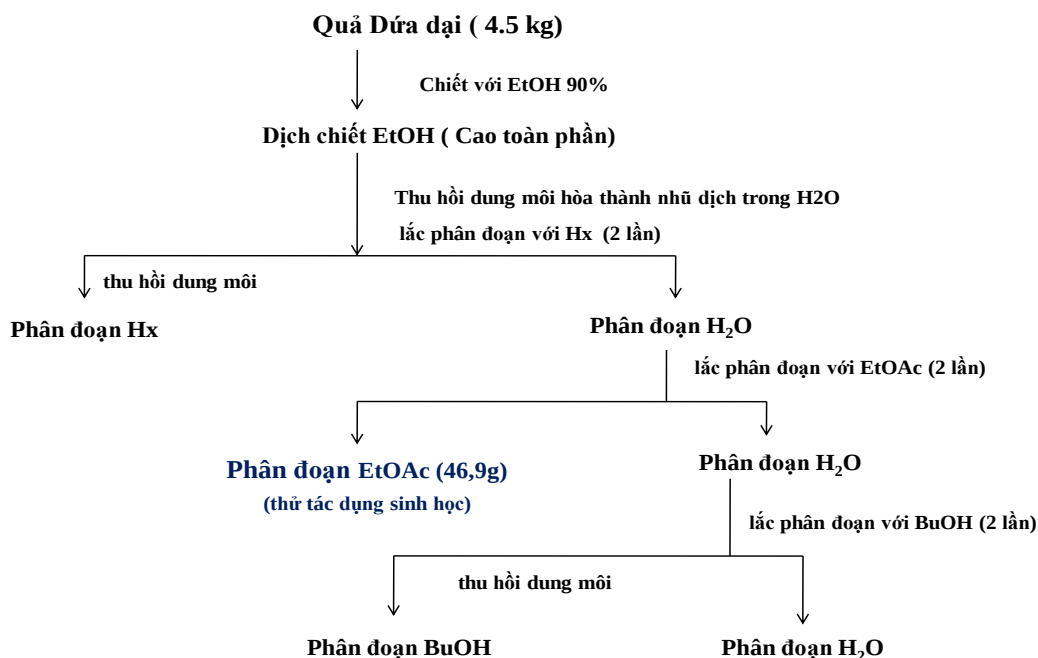
- Thuốc nghiên cứu: Cao chiết toàn phần (CTP) và phân đoạn chiết giàu hoạt chất (phân đoạn ethylacetat: PĐE) chiết xuất từ quả Dứa dại (*Pandanus odoratissimus* L.f.) do PGS.TS Nguyễn Duy Thuần - Viện Nghiên cứu Y - Dược cổ truyền Tuệ Tĩnh cung cấp. CTP và PĐE được chiết theo quy trình chuẩn tại Viện Dược liệu Việt Nam.

- Điều chế CTP: từ 4,5 kg dược liệu (quả Dứa dại thái lát, phơi khô, nghiền nhỏ) được chiết chiết nóng 3 lần với cồn ethylic 96% (EtOH) thu được 290 gam CTP.



Hình 2.1. Quy trình chiết CTP từ quả Dứa dại

- Điều chế PĐE: từ 4,5 kg dược liệu (quả Dứa dại thái lát, phơi khô, nghiền nhỏ) chiết theo quy trình dưới đây thu được 46,9g phân đoạn EtOAc (PĐE);



Hình 2.2. Quy trình chiết PĐE từ quả Dứa dại

(Chú thích: Hx: n-hexan; BuOH: Buthanol)

- Vì CTP và PĐE không tan hoàn toàn trong nước nên phải pha CTP và PĐE trong dầu olive cho tan hoàn toàn để cho động vật thực nghiệm uống.

2.2. Thuốc, hóa chất, máy và thiết bị phục vụ nghiên cứu

2.2.1. Thuốc và hóa chất phục vụ nghiên cứu

- Paracetamol (biệt dược Efferalgan) dạng viên sủi, hàm lượng 500 mg của hãng Bristol-Myers Squibb;

- Silymarin (biệt dược Legalon) dạng viên nén, hàm lượng 70 mg của hãng Madaus (Korea);

- Aspirin (biệt dược Aspégic) gói bột hàm lượng 250 mg của hãng Sanofi - Synthelabo (Pháp);

- Methyl prednisolon (biệt dược Medrol) viên nén hàm lượng 4 mg của hãng Pfizer;

- Dầu olive;
- Actiso dạng ống thuốc uống, mỗi ống 5 ml chứa 9,3 mg cao mềm actiso của Công ty cổ phần dược phẩm Nam Hà;
- Carbon tetrachlorid của hãng Sigma;
- Carrageenin của hãng BDH Chemical Ltd (Anh);
- Sợi amiant;
- Kít định lượng ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần, creatinin của hãng Hospitex Diagnostics (Italy);
- Dung dịch xét nghiệm máu của hãng Exigo (Thụy Điển);
- Các hóa chất làm tiêu bản mô bệnh học đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Trung tâm nghiên cứu phát hiện sớm Ung thư – Liên hiệp các Hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam cung cấp;
- Các hóa chất nghiên cứu để định lượng nồng độ hydroxyprolin và collagen type IV trong gan chuột đạt tiêu chuẩn thí nghiệm do Viện 69 – Bộ Tư lệnh Bảo vệ lăng Hồ Chí Minh cung cấp;
- Các hóa chất nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa *in vitro* (DPPH Pcode 101087701, xanthin Pcode 1001097986, xanthin oxydase Pcode 1001212703) do Viện Dược liệu cung cấp.

2.2.2. Máy và thiết bị phục vụ nghiên cứu

- Máy xét nghiệm sinh hóa máu XC-55 Chemistry Analyzer của hãng Meikang medical (Trung Quốc);
- Máy xét nghiệm huyết học chuyên dụng Exigo- Boule Medical AB của hãng Exigo (Thụy Điển);
- Máy đo viêm cấp Plethysmometer No 7140 của hãng UGO BASILE (Italy);
- Máy quang phổ ELX 800 của hãng Biotek instruments- INC (Mỹ);
- Máy đo quang phổ tử ngoại – khả kiến Specord 210 (Đức);
- Các dụng cụ thí nghiệm thông thường của bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội.

2.3. Động vật thực nghiệm

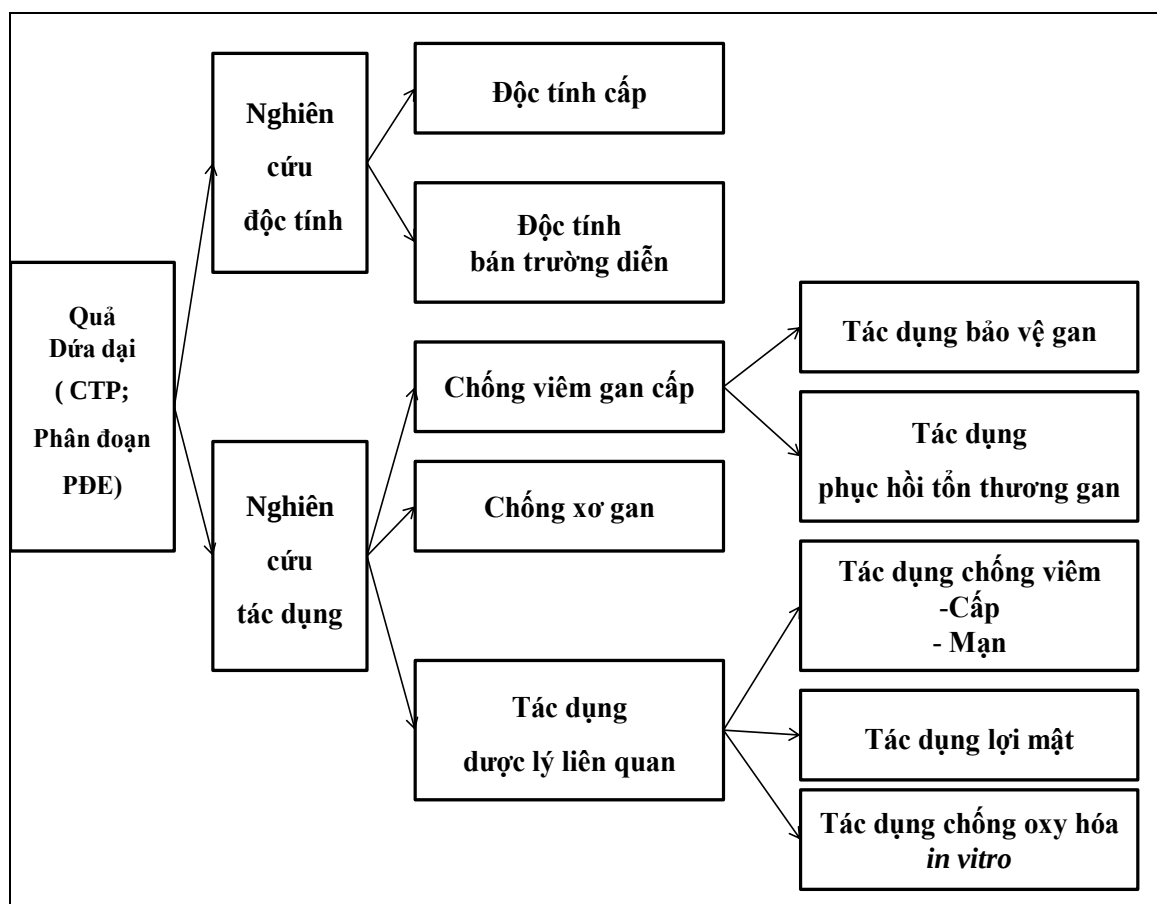
- Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng $25,0 \pm 2,0$ gam (để nghiên cứu tác dụng bảo vệ, phục hồi tổn thương gan và chống xơ gan); trọng lượng $20,0 \pm 2,0$ gam (để nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng lợi mật, chống viêm mạn) do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

- Chuột cống trắng cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng 200 ± 20 gam (để nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp và độc tính bán trường diễn).

- Động vật được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước uống tại phòng thí nghiệm từ 3 - 5 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu tại Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Dựa theo mục tiêu nghiên cứu, các thí nghiệm được tiến hành theo sơ đồ sau:



Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu

2.4.1. Nghiên cứu độc tính

2.4.1.1. Nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và hướng dẫn của Bộ Y tế Việt nam về thử thuốc có nguồn gốc từ dược liệu [100],[101]. Xác định LD₅₀ của mẫu thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [102].

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm. Từng lô chuột nhắt trắng, mỗi lô 10 con, được uống mẫu thuốc nghiên cứu theo liều tăng dần. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột (0%), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100%) và các liều trung gian. Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của mẫu thử. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống mẫu nghiên cứu.

2.4.1.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của mẫu thử PĐE được tiến hành trên chuột cống trắng theo đường uống theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới [100].

Chuột cống trắng được chia làm 3 lô, mỗi lô 10 con.

Lô chứng	Uống dầu olive 0,25 ml/100g/ngày
Lô trị 1	Uống PĐE liều tương đương 4,2 g dược liệu/ kg/ngày (liều có tác dụng tương đương trên người, tính theo hệ số 7)
Lô trị 2	Uống PĐE liều tương đương 12,6 g dược liệu/ kg/ngày (gấp 3 lần lô trị 1)

Chuột được uống dầu olive hoặc mẫu thử PĐE trong 8 tuần liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu:

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột.
- Đánh giá chức phận tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.

- Đánh giá mức độ tổn thương gan và chức năng gan thông qua các hội chứng:
 - + Hội chứng hủy hoại tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ các enzym trong máu: ALT, AST.
 - + Hội chứng ứ mật thông qua định lượng bilirubin toàn phần.
 - + Hội chứng suy tế bào gan thông qua định lượng albumin và cholesterol toàn phần.
- Đánh giá chức năng lọc cầu thận thông qua định lượng nồng độ creatinin huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống mẫu thử, sau 4 tuần, sau 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử.

- Giải phẫu bệnh: Sau 8 tuần uống mẫu thử và 2 tuần ngừng uống mẫu thử, chuột được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số chuột ở mỗi lô. Các xét nghiệm vi thể được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư (do PGS.TS. Lê Đình Roanh đọc kết quả vi thể).

2.4.2. Nghiên cứu tác dụng chống viêm gan, xơ gan của quả Dứa dại

2.4.2.1. Nghiên cứu tác dụng chống viêm gan cấp

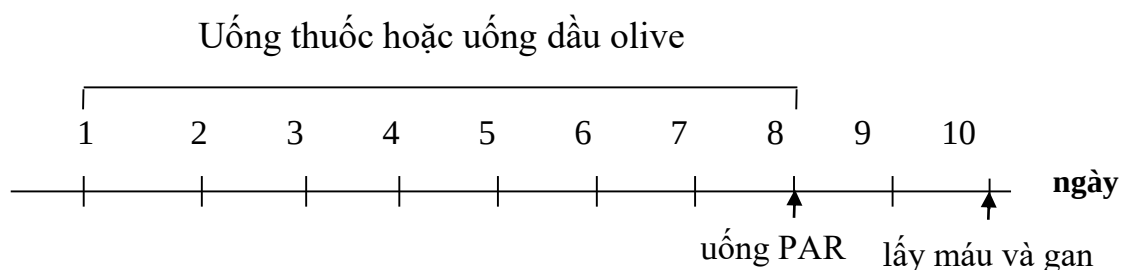
** Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan:*

Chuột nhắt trắng $25,0 \pm 2,0\text{g}$ được chia ngẫu nhiên thành 7 lô, mỗi lô 10 con:

Lô 1 (chứng trắng)	Uống dầu olive 0,1 ml/10g
Lô 2 (mô hình viêm gan)	Uống dầu olive + uống PAR
Lô 3 (chứng dương)	Uống silymarin (70 mg/kg/ngày) + uống PAR
Lô 4 (CTP liều 1)	Uống CTP liều tương đương với 7,2 g dược liệu/kg/ngày + uống PAR
Lô 5 (CTP liều 2)	Uống CTP liều tương đương với 14,4 g dược liệu/kg/ngày + uống PAR
Lô 6 (PDE liều 1)	Uống PDE liều tương đương với 7,2 g dược liệu/kg/ngày + uống PAR
Lô 7 (PDE liều 2)	Uống PDE liều tương đương với 14,4 g dược liệu/kg/ngày + uống PAR

Chuột được uống dầu olive, silymarin hoặc mẫu thử liên tục trong 8 ngày. Ngày thứ 8, sau uống thuốc 1 giờ (chuột được nhịn đói 16 - 18 giờ trước đó) gây tổn thương gan chuột ở các lô từ lô 2 đến lô 7 bằng uống paracetamol (PAR) liều 400 mg/kg, với thể tích 0,2 ml/10g. 48 giờ sau gây độc bằng PAR, lấy máu động mạch cảnh của chuột để xác định hoạt độ enzym AST, ALT và đồng thời lấy gan để quan sát mô bệnh học (đại thể, vi thể).

Sơ đồ thời gian làm thực nghiệm



** Nghiên cứu tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan của quả Dứa dại*

Chuột nhắt trắng $25,0 \pm 2,0$ g, được chia thành 9 lô, mỗi lô 10 con.

Gây tổn thương gan chuột bằng uống PAR liều 400 mg/kg, với thể tích 0,2 ml/10g. Sau khi uống PAR 1 giờ, cho chuột uống dầu olive hoặc thuốc thử tương ứng với từng lô theo sơ đồ dưới đây:

Lô 1 (chứng trắng)	Uống dầu olive 0,1 ml/10g
Lô 2 (mô hình viêm gan)	Uống PAR + uống dầu olive
Lô 3 (chứng dương)	Uống PAR + uống silymarin (70 mg/kg/ngày)
Lô 4 (CTP)	Uống PAR + CTP liều tương đương với 7,2 g dược liệu/kg/ngày
Lô 5 (PĐE)	Uống PAR + PĐE liều tương đương với 7,2 g dược liệu/kg/ngày
Lô 6 (mô hình viêm gan)	Uống PAR + uống dầu olive
Lô 7 (chứng dương)	Uống PAR + uống silymarin (70 mg/kg/ngày)
Lô 8 (CTP)	Uống PAR + CTP liều tương đương với 7,2 g dược liệu/kg/ ngày

Lô 9 (PĐE) Uống PAR + PĐE liều tương đương với 7,2 g
dược liệu/kg/ ngày

Chuột ở các lô 1 (5 con), 2, 3, 4 và 5 được uống dầu olive hoặc thuốc thử trong 2 ngày. Chuột ở các lô 1 (5 con), 6, 7, 8 và 9 được uống dầu olive hoặc thuốc thử trong 4 ngày.

Sau 2 hoặc 4 ngày uống thuốc thử, lấy máu động mạch cảnh để xác định hoạt độ các enzym AST, ALT; lấy gan để quan sát mô bệnh học (đại thể, vi thể).

2.4.2.2. Nghiên cứu tác dụng chống xơ gan của quả Dứa dại

Chuột nhắt trắng chủng Swiss trọng lượng $25,0 \pm 2,0$ g được gây mô hình viêm gan mạn dẫn tới xơ gan bằng tiêm màng bụng carbon tetrachlorid (CCl_4) pha trong dầu olive liều 1,0 ml/kg, 2 lần/tuần trong 18 tuần. Thuốc thử hoặc thuốc chứng được uống hàng ngày trong 18 tuần (cùng thời gian tiêm CCl_4).

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

Lô 1 (chứng trắng)	Uống dầu olive thể tích 0,1 ml/10g
Lô 2 (mô hình)	Tiêm màng bụng CCl_4 1,0 ml/kg, 2 lần/tuần. Uống dầu olive 0,1 ml/10g/ ngày
Lô 3 (chứng dương)	Tiêm màng bụng CCl_4 1,0 ml/kg, 2 lần/tuần. Uống silymarin liều 70 mg/kg /ngày
Lô 4 (CTP)	Tiêm màng bụng CCl_4 1,0 ml/kg, 2 lần/tuần. Uống CTP liều tương đương 7,2 g dược liệu/kg/ngày
Lô 5 (PĐE)	Tiêm màng bụng CCl_4 1,0 ml/kg, 2 lần/tuần. Uống PĐE liều tương đương 7,2 g dược liệu/kg/ngày

Chuột được tiêm CCl_4 và uống thuốc thử trong 18 tuần, tuần thứ 19 tiến hành mổ chuột, lấy máu và gan làm các xét nghiệm.

Các chỉ tiêu đánh giá:

- Trọng lượng chuột, trọng lượng tương đối của gan chuột (trọng lượng gan quy về 100 g thể trọng chuột).
- Đánh giá mức độ tổn thương gan và chức năng gan thông qua các hội chứng:

+ Hội chứng hủy hoại tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ enzym trong máu: ALT, AST

+ Hội chứng ứ mật thông qua định lượng bilirubin toàn phần.

+ Hội chứng suy tế bào gan thông qua định lượng albumin và cholesterol toàn phần trong máu.

- Huyết học: Số lượng bạch cầu, số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố.

- Định lượng collagen typ IV theo phương pháp bán định lượng - và định lượng hàm lượng hydroxyprolin trong gan chuột (thực hiện tại Viện 69 – Bộ Tư lệnh bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh).

- Mô bệnh học: Hình ảnh vi thể gan 5 chuột/lô, thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư (do PGS.TS. Lê Đình Roanh đọc kết quả vi thể).

2.4.3. Nghiên cứu một số tác dụng dược lý liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ gan

2.4.3.1. Nghiên cứu tác dụng lợi mật

Tiến hành theo hướng dẫn phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý thuốc có tác dụng sinh mật và thông mật (có thay đổi để phù hợp với phương pháp đánh giá tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan của thuốc) [22].

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 13 lô, lô 1 có 20 con, các lô còn lại mỗi lô 10 con. Tiến hành gây độc cho chuột ở các lô từ 2 đến 13 bằng cách cho uống PAR liều 400 mg/kg với thể tích 0,2 ml/10g. Sau khi uống PAR 1 giờ, cho chuột uống dầu olive hoặc mẫu thử tương ứng với từng lô như sau:

Lô 1 (chứng trắng)	Uống dầu olive 0,1 ml/10g
Lô 2 (mô hình)	Uống PAR liều 400 mg/kg + uống dầu olive
Lô 3 (chứng dương)	Uống actiso 1 ống/kg/ngày (1 ống 5ml chứa 9,3 mg cao mềm actiso)
Lô 4 (CTP liều 1)	Uống CTP liều tương đương với 7,2 g dược liệu khô/kg/ngày
Lô 5 (CTP liều 2)	Uống CTP liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg/ngày

- Lô 6** (PĐE liều 1) Uống PĐE liều tương đương với 7,2 g dược liệu khô/kg/ ngày
- Lô 7** (PĐE liều 2) Uống PĐE liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg/ ngày
- Lô 8** (mô hình) Uống PAR liều 400 mg/kg + uống dầu olive
- Lô 9** Uống actiso 1 ống/kg/ngày
(chứng dương) (1 ống 5ml chứa 9,3 mg cao mềm actiso)
- Lô 10** (CTP liều 1) Uống CTP liều tương đương với 7,2 g dược liệu khô/kg/ngày
- Lô 11** (CTP liều 2) Uống CTP liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg/ ngày
- Lô 12** (PĐE liều 1) Uống PĐE liều tương đương với 7,2 g dược liệu khô/kg/ ngày
- Lô 13** (PĐE liều 2) Uống PĐE liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg/ ngày

Actiso hoặc mẫu thử được pha trong dầu olive, cho chuột uống với lượng 0,1 ml/10g thể trọng chuột.

Chuột ở các lô 1 (10 con), 2, 3, 4, 5, 6 và 7 được uống dầu olive hoặc mẫu thử trong 2 ngày. Chuột ở các lô 1 (10 con), 8, 9, 10, 11, 12 và 13 được uống dầu olive hoặc mẫu thử trong 4 ngày.

Ngày thứ 2 và ngày thứ 4, sau khi uống thuốc 30 phút, gây mê chuột bằng ether.

Mổ bụng chuột, thắt ống mật chủ, sau đó khâu tạm thành bụng lại. Sau 30 phút, mở lại ổ bụng chuột, bóc tách túi mật, thấm sạch bằng giấy lọc, cân xác định trọng lượng túi mật (m_1)

Rạch túi mật, thấm hết dịch mật, cân riêng vỏ túi mật (m_2)

Trọng lượng dịch mật $m = m_1 - m_2$

Trọng lượng dịch mật được quy về 10 g thể trọng

So sánh trọng lượng dịch mật ở các lô.

Độ lợi mật được tính theo công thức:

$$L\% = \frac{m_t - m_c}{m_c} \times 100$$

Trong đó: m_t : Trọng lượng dịch mật trung bình ở lô uống thuốc thử

m_c : Trọng lượng dịch mật trung bình ở lô chứng

2.4.3.2. Nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp

** Đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin*

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con.

Lô 1 (mô hình)	Uống dầu olive 1,0 ml/100g
Lô 2 (chứng dương)	uống aspirin liều 200 mg/kg
Lô 3 (CTP liều 1)	Uống CTP liều tương đương với 4,2 g dược liệu khô/kg (Liều có tác dụng tương đương trên người, tính theo hệ số 7)
Lô 4 (CTP liều 2)	Uống CTP liều tương đương với 8,4 g dược liệu khô/kg
Lô 5 (PĐE liều 1)	Uống PĐE liều tương đương với 4,2 g dược liệu khô/kg
Lô 6 (PĐE liều 2)	Uống PĐE liều tương đương với 8,4 g dược liệu khô/kg

Các thuốc chuẩn hoặc thuốc thử được pha trong dầu olive, cho chuột uống với lượng 1,0 ml/100g.

Chuột được uống dầu olive hoặc thuốc trong 4 ngày liền trước khi gây viêm. Ngày thứ 4, sau khi uống thuốc 30 phút, gây viêm bằng cách tiêm carrageenin 1% (pha trong nước muối sinh lý) 0,05 ml/chuột vào gan bàn chân sau, bên phải của chuột.

Đo thể tích chân chuột (đến khớp cổ chân) bằng dụng cụ chuyên biệt (Plethysmometer) vào các thời điểm: trước khi gây viêm, sau khi gây viêm 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 24 giờ.

Kết quả được tính theo công thức của Fontaine:

Độ tăng thể tích chân của từng chuột được tính theo công thức:

$$\Delta V\% = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Trong đó: V_0 : thể tích chân chuột trước khi gây viêm.

V_t : thể tích chân chuột sau khi gây viêm.

- Tác dụng chống viêm của thuốc được đánh giá bằng khả năng ức chế phản ứng phù (I%):

$$I\% = \frac{\overline{\Delta V_c}\% - \overline{\Delta V_t}\%}{\overline{\Delta V_c}\%} \times 100$$

Trong đó: $\overline{\Delta V_c}\%$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô chứng (%)

$\overline{\Delta V_t}\%$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô uống thuốc (%)

** Đánh giá tác dụng chống viêm cấp theo phương pháp gây viêm màng bụng trên chuột cống trắng:*

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con.

Các lô chuột được uống dầu olive, aspirin hoặc các liều mẫu thử CTP, PĐE tương tự như trong thí nghiệm đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin.

Chuột được uống dầu olive hoặc thuốc trong 4 ngày liền trước khi gây viêm. Ngày thứ 4 sau khi uống thuốc hoặc dầu olive 30 phút, tiến hành gây viêm màng bụng bằng dung dịch carrageenin 0,05 g + formaldehyd 1,4 ml pha trong 100 ml nước muối sinh lý vừa đủ, với thể tích 2 ml vào khoang màng bụng cho mỗi chuột.

Sau 24 giờ gây viêm, mổ ổ bụng chuột hút dịch rỉ viêm. Đo thể tích và đếm số lượng bạch cầu/ml dịch rỉ viêm, định lượng protein trong dịch rỉ viêm.

2.4.3.3. Tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng amiant

Gây u hạt thực nghiệm theo phương pháp của Ducrot, Julou và cộng sự trên chuột nhắt trắng [22].

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con.

Lô 1 (mô hình)	Uống dầu olive 0,1ml/10g
Lô 2 (chứng dương)	Uống methyl prednisolon liều 15 mg/kg
Lô 3 (CTP liều 1)	Uống CTP liều tương đương với 7,2 g dược liệu /kg
Lô 4 (CTP liều 2)	Uống CTP liều tương đương với 14,4 g dược liệu /kg
Lô 5 (PĐEliều 1)	Uống PĐE liều tương đương với 7,2 g dược liệu /kg
Lô 6 (PĐE liều 2)	Uống PĐE liều tương đương với 14,4 g dược liệu /kg

Gây viêm mạn bằng cách cấy sợi amiant trọng lượng 6 mg đã tiệt trùng (sấy 120°C trong 1 giờ) được tẩm carrageenin 1%, ở da gáy của mỗi chuột.

Sau khi cấy sợi amiant, các chuột được uống dầu olive hoặc thuốc thử liên tục trong 7 ngày. Ngày thứ 8 tiến hành giết chuột bằng clorofoc, bóc tách khối u hạt, sấy khô ở nhiệt độ 56°C trong 18 giờ. Cân trọng lượng u hạt sau khi đã được sấy khô. So sánh trọng lượng trung bình của khối u hạt (đã trừ trọng lượng amiant) giữa các lô. Tác dụng chống viêm được tính theo tỉ lệ % giảm trọng lượng khối u so với lô mô hình.

2.4.3.4. *Đánh giá tác dụng chống oxy hóa in vitro*

** Chuẩn bị mẫu thử:*

- Pha dung dịch thử: Cân 20 mg mẫu thử, hòa tan với 1ml dung môi methanol để được dung dịch có nồng độ 20 mg/ml. Từ dung dịch này tiến hành pha loãng với methanol để được các dung dịch loãng hơn có nồng độ khác nhau.

- Pha mẫu đối chiếu dương (quercetin): Cân 2 mg mẫu thử, hòa tan với 1ml dung môi methanol để được dung dịch có nồng độ 2 mg/ml. Từ dung dịch này tiến hành pha loãng với methanol để được các dung dịch loãng hơn có nồng độ khác nhau.

** Phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH:*

- Nguyên tắc: Đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH của các mẫu nghiên cứu được tiến hành bằng phương pháp đo quang. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) là chất tạo ra gốc tự do được dùng để thực hiện phản ứng mang tính chất sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng $\lambda = 517 \text{ nm}$ [103], [104], [105].

- Tiến hành: Pha dung dịch DPPH nồng độ 150 μM trong methanol trước khi dùng. Cho vào ống nghiệm hỗn hợp gồm có: 10 μl dung dịch mẫu thử (chỉ là MeOH nếu là mẫu chứng), 990 μl dung dịch DPPH đã pha. Lắc đều, rồi để yên 30 phút trong bóng tối, ở nhiệt độ thường. Dung dịch sau khi phản ứng

được đem đo độ hấp thụ quang ở bước sóng $\lambda = 517$ nm (có thể chọn trong khoảng 515 - 520 nm). Chất đối chứng dương được sử dụng là quercetin.

- Thông số đánh giá: Khả năng dọn gốc tự do DPPH của mẫu thử (cho cả chất đối chiếu dương) được tính theo công thức:

$$I (\%) = [(OD_{ch} - OD_{th}) / OD_{ch}] \times 100$$

Trong đó:

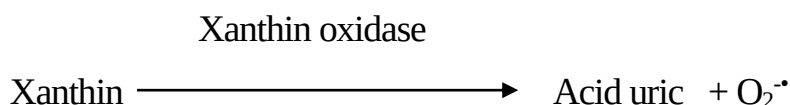
- I (%): Khả năng dọn gốc DPPH của mẫu thử

- OD_{ch} , OD_{th} : Mật độ quang của mẫu chứng, mẫu thử (đối chứng dương)

Khả năng dọn gốc tự do DPPH được biểu diễn bằng giá trị IC_{50} được hiểu là nồng độ tại đó mẫu thử ức chế 50 % lượng gốc tự do. Giá trị IC_{50} được tính toán theo phương pháp probit [105], [106].

* *Phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do anionsuperoxid ($O_2^{\cdot-}$):*

- Nguyên tắc: Anion superoxid ($O_2^{\cdot-}$) được tạo ra từ phản ứng chuyển xanthin thành acid uric dưới xúc tác của xanthin oxidase.



Anionsuperoxid phản ứng với nitro blue tetrazolium (NBT) tạo dung dịch có màu xanh tím.

Đánh giá khả năng dọn gốc tự do $O_2^{\cdot-}$ của các mẫu nghiên cứu được tiến hành bằng phương pháp đo quang thực hiện theo hướng dẫn trong tài liệu [103].

- Tiến hành: Cho vào ống nghiệm hỗn hợp gồm có: 460 μ l dung dịch đệm phosphat (pH 8,0) chứa 0,1 mM EDTA, 10 μ l dung dịch xanthin 5 mM, 10 μ l dung dịch NBT 5 mM, 10 μ l dung dịch mẫu thử pha trong DMSO (dimethyl sulfoxid) (chỉ là DMSO nếu là mẫu chứng), và cuối cùng cho 10 μ l dung dịch enzym xanthine oxidase. Trộn đều hỗn hợp trong khoảng 1 phút rồi để yên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng cho phản ứng xảy ra. Đo độ hấp thụ quang của hỗn hợp ở bước sóng 560 nm (OD). Chất đối chứng dương được sử dụng là quercetin.

- Thông số đánh giá: Khả năng dọn gốc tự do $O_2^{\cdot-}$ của mẫu thử (cho cả chất đối chứng dương) được tính theo công thức:

$$I (\%) = [(OD_{ch} - OD_{th})/OD_{ch}] \times 100$$

Trong đó:

- I (%): Khả năng dọn gốc tự do $O_2^{\cdot-}$ của mẫu thử
- OD_{ch} : Độ hấp thụ quang của mẫu chứng
- OD_{th} : Độ hấp thụ quang của mẫu thử (đối chứng dương)

Khả năng dọn gốc tự do $O_2^{\cdot-}$ được biểu diễn bằng giá trị IC_{50} được hiểu là nồng độ tại đó mẫu thử ức chế 50 % lượng gốc tự do. Giá trị IC_{50} được tính toán theo phương pháp probit [106].

2.5. Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t - test Student và test “trước - sau”(Avant - Après).

Số liệu được biểu diễn dưới dạng : $\bar{X} \pm SD$

Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

**Thời gian nghiên cứu:* Từ 01/2014 đến 12/2017

**Địa điểm nghiên cứu:*

- Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội: Thực hiện các nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn, nghiên cứu tác dụng chống viêm gan cấp, chống xơ gan và các tác dụng dược lý liên quan.

- Viện Dược liệu- Bộ Y tế: Thực hiện nghiên cứu chống oxy hóa *in vitro*

- Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư: Đánh giá kết quả giải phẫu bệnh cho các nghiên cứu.

- Viện 69 – Bộ Tư lệnh bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh: Đánh giá kết quả định lượng hàm lượng hydroxyprolin và collagen type IV của nghiên cứu tác dụng chống xơ gan.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

3.1.1. *Độc tính cấp*

3.1.1.1. *Độc tính cấp của CTP*

Chuột nhắt trắng được uống mẫu CTP với liều tăng dần từ liều tương đương với 207 gam được liệu/kg/24 giờ đến liều tương đương với 1035 gam được liệu/kg/24 giờ (liều cao nhất có thể cho chuột uống bằng kim chuyên dụng).

Sau khi uống mẫu thử, chuột vẫn ăn uống, hoạt động và bài tiết bình thường. Không thấy có biểu hiện ngộ độc ở chuột và không có chuột nào chết trong 72 giờ sau khi uống mẫu thử. Tiếp tục theo dõi trong 7 ngày sau uống mẫu thử thấy chuột vẫn hoàn toàn bình thường, không có biểu hiện gì đặc biệt. Vì vậy chưa xác định được LD₅₀ của CTP trên chuột nhắt trắng theo đường uống.

3.1.1.2. *Độc tính cấp của PDE*

Chuột nhắt trắng được uống mẫu PDE với liều tăng dần từ liều tương đương với 1350 gam được liệu/kg/24 giờ đến liều tương đương với 6750 gam được liệu/kg/24 giờ (liều cao nhất có thể cho chuột uống bằng kim chuyên dụng).

Sau khi uống mẫu thử, chuột vẫn ăn uống, hoạt động và bài tiết bình thường. Không thấy có biểu hiện ngộ độc ở chuột và không có chuột nào chết trong vòng 72 giờ sau khi uống mẫu thử. Tiếp tục theo dõi trong 7 ngày sau uống mẫu thử thấy chuột vẫn hoàn toàn bình thường, không có biểu hiện gì đặc biệt. Vì vậy chưa xác định được LD₅₀ của PDE trên chuột nhắt trắng theo đường uống.

3.1.2. *Độc tính bán trường diễn của PDE chiết xuất từ quả Dứa dại*

3.1.2.1. *Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột*

* *Tình trạng chung*: Trong 4 tuần đầu, chuột ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, phân hơi lỏng. Từ sau thời điểm 4 tuần đến tuần thứ 8, chuột hoạt động kém hơn, lông xù, giảm ăn, phân lỏng. Sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử, chuột hoạt động nhanh nhẹn trở lại, phân khô, lông mượt.

* *Sự thay đổi thể trọng chuột*:

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của PĐE đến thể trọng chuột

Thời gian	Lô chứng (n = 10)		Lô trị 1 (n = 10)		Lô trị 2 (n = 10)		p (t-test Studen t)
	<i>Trọng lượng (g)</i>	<i>% tăng trọng lượng</i>	<i>Trọng lượng (g)</i>	<i>% tăng trọng lượng</i>	<i>Trọng lượng (g)</i>	<i>% tăng trọng lượng</i>	
Trước uống PĐE	189,5 ± 9,5		190,0 ± 10,5		202,5 ± 34,5		> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	210,0 ± 20,2	10,8	209,5 ± 17,2	10,3	214,5 ± 28,9	5,9	> 0,05
p trước – sau	< 0,01		< 0,001		< 0,01		
Sau 8 tuần uống PĐE	200,5 ± 41,5	5,5	191,0 ± 26,4	0,5	210,0 ± 37,4	3,7	> 0,05
p trước – sau	> 0,05		> 0,05		> 0,05		
Sau 2 tuần ngừng PĐE	214,2 ± 33,4	13,1	207,1 ± 40,3	9,0	205,7 ± 35,5	1,6	> 0,05
p trước – sau	> 0,05		> 0,05		> 0,05		

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.1 cho thấy:

- Sau 4 tuần uống mẫu thử, trọng lượng chuột ở 2 lô uống PĐE và lô chứng đều tăng rõ so với trước khi nghiên cứu ($p < 0,01$ và $p < 0,001$).
- Ở thời điểm sau 8 tuần, chuột ở cả 3 lô đều có hiện tượng giảm cân so với thời điểm 4 tuần. Không có sự khác biệt về trọng lượng chuột giữa lô chứng và 2 lô uống PĐE.

- Sau 2 tuần ngừng thuốc, chuột ở lô chứng và lô trị 1 (uống PĐE liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày) có tăng trọng lượng so với thời điểm 8 tuần. Chuột ở lô trị 2 (uống PĐE liều tương đương 12,6 g dược liệu/kg/ngày) trọng lượng có giảm nhẹ so với thời điểm 8 tuần, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô chứng và lô trị 1 ($p > 0,05$).

3.1.2.2. Đánh giá chức năng tạo máu

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của PĐE đến số lượng hồng cầu trong máu chuột

Thời gian	Số lượng hồng cầu (T/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	8,14 ± 0,48	7,98 ± 0,41	7,97 ± 0,40	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	8,16 ± 0,67	7,98 ± 0,60	7,90 ± 0,75	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	8,40 ± 0,49	8,14 ± 0,55	8,07 ± 0,89	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	8,33 ± 0,38	8,23 ± 0,59	8,34 ± 0,39	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy: Sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống PĐE, số lượng hồng cầu ở cả lô trị 1 (uống PĐE liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày) và lô trị 2 (uống PĐE liều gấp 3 lần lô trị 1) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của PĐE đến hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột

Thời gian	Hàm lượng huyết sắc tố (g/dl)			P (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	12,03 ± 0,65	11,92 ± 0,70	11,73 ± 0,83	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	11,47 ± 0,88	11,60 ± 1,13	11,47 ± 1,06	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	11,54 ± 0,73	11,49 ± 0,77	11,09 ± 0,76	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	11,43 ± 0,99	11,63 ± 0,78	11,83 ± 0,31	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của PĐE đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột

Thời gian	Thể tích trung bình hồng cầu (fl)			P (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	45,36 ± 1,21	46,36 ± 1,17	45,70 ± 4,16	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	45,40 ± 1,17	44,70 ± 2,67	45,00 ± 3,37	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	46,50 ± 2,27	45,00 ± 2,11	45,60 ± 1,84	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	45,43 ± 3,05	45,14 ± 0,90	46,71 ± 1,38	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.3 và 3.4 cho thấy: Sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử PĐE và sau 2 tuần ngừng uống, hàm lượng huyết sắc tố và thể tích trung bình hồng cầu ở cả lô trị 1 (*uống PĐE liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày*) và lô trị 2 (*uống PĐE liều gấp 3 lần lô trị 1*) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.5. *Ảnh hưởng của PĐE đến số lượng bạch cầu trong máu chuột*

Thời gian	Số lượng bạch cầu (G/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	7,33 ± 1,44	7,32 ± 1,12	7,78 ± 2,12	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	8,87 ± 1,78	8,59 ± 1,78	9,19 ± 1,83	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	8,43 ± 2,61	8,53 ± 2,76	8,42 ± 2,77	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	8,34 ± 1,52	8,20 ± 1,04	8,50 ± 1,08	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của PĐE đến công thức bạch cầu trong máu chuột

Thời gian	Công thức bạch cầu					
	<i>Lô chứng</i> (n = 10)		<i>Lô trị 1</i> (n = 10)		<i>Lô trị 2</i> (n = 10)	
	<i>Lympho</i> (%)	<i>Trung</i> <i>tính (%)</i>	<i>Lympho</i> (%)	<i>Trung</i> <i>tính (%)</i>	<i>Lympho</i> (%)	<i>Trung</i> <i>tính (%)</i>
Trước uống PĐE	89,9 ± 5,2	10,1 ± 5,2	90,4 ± 5,5	9,6 ± 5,5	90,0 ± 6,0	10,0 ± 6,0
Sau 4 tuần uống PĐE	86,7 ± 6,1	13,3 ± 6,1	88,4 ± 3,9	11,6 ± 3,9	82,6 ± 4,9	17,4 ± 4,9
P (trước –sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 8 tuần uống PĐE	85,6 ± 6,5	14,4 ± 6,5	87,5 ± 6,6	12,5 ± 6,6	87,7 ± 3,8	12,3 ± 3,8
P (trước –sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Sau 2 tuần ngừng PĐE	84,0 ± 8,7	16,0 ± 8,7	84,9 ± 5,1	15,1 ± 5,1	88,6 ± 2,2	11,4 ± 2,2
P (trước –sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.5 và 3.6 cho thấy: Sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống, số lượng và công thức bạch cầu ở cả lô trị 1 (*uống PĐE liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày*) và lô trị 2 (*uống PĐE liều gấp 3 lần lô trị 1*) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của PĐE đến số lượng tiểu cầu trong máu chuột

Thời gian	Số lượng tiểu cầu (G/l)			p (t- test Student)
	<i>Lô chứng</i> (<i>n</i> = 10)	<i>Lô trị 1</i> (<i>n</i> = 10)	<i>Lô trị 2</i> (<i>n</i> = 10)	
Trước uống PĐE	618,8 ± 71,2	659,1 ± 101,8	638,5 ± 122,0	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	598,6 ± 126,3	682,5 ± 134,4	574,9 ± 147,1	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	562,9 ± 57,7	574,9 ± 77,2	615,4 ± 67,9	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	571,7 ± 53,1	640,0 ± 100,3	565,0 ± 81,7	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy: Sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống, số lượng tiểu cầu ở cả lô trị 1 (uống PĐE liều tương đương 4,2g dược liệu/kg/ngày) và lô trị 2 (uống PĐE liều gấp 3 lần lô trị 1) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

3.1.2.3. Đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan và chức năng gan

* Đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan:

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của PĐE đến hoạt độ AST (GOT) trong máu chuột

Thời gian	Hoạt độ AST (UI/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	99,20 ± 30,87	91,60 ± 22,31	94,16 ± 20,25	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	90,90 ± 19,99	116,40 ± 37,45	83,90 ± 19,81	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	90,20 ± 22,36	85,50 ± 14,06	84,30 ± 17,24	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	89,71 ± 11,80	80,57 ± 7,21	99,00 ± 18,11	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của PĐE đến hoạt độ ALT (GPT) trong máu chuột

Thời gian	Hoạt độ ALT (UI/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	53,80 ± 16,54	55,60 ± 19,75	50,60 ± 14,66	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	69,70 ± 17,61	65,50 ± 19,28	65,80 ± 16,13	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	54,80 ± 11,65	56,70 ± 12,85	58,10 ± 7,62	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	47,57 ± 7,23	54,86 ± 6,64	54,29 ± 7,34	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.8 và 3.9 cho thấy: Sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống, xét nghiệm đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan - hoạt độ AST và ALT trong máu chuột công trắng ở cả lô trị 1 (uống

PĐE liều tương đương 4,2 g được liều/kg/ngày) và lô trị 2 (uống PĐE liều gấp 3 lần lô trị 1) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

* Đánh giá chức năng gan:

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của PĐE đến nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột

Thời gian	Bilirubin toàn phần(mmol/l)			p (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	13,43 ± 0,40	13,71 ± 0,34	13,56 ± 0,47	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	13,64 ± 0,34	13,49 ± 0,38	13,54 ± 0,39	> 0,05
p (trước –sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	13,53 ± 0,40	13,30 ± 0,57	13,48 ± 0,56	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	13,36 ± 0,59	13,77 ± 0,16	13,54 ± 0,36	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của PĐE đến nồng độ albumin trong máu chuột

Thời gian	Albumin (g/dl)			p (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	2,74 ± 0,08	2,83 ± 0,20	2,60 ± 0,27	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	2,53 ± 0,35	2,72 ± 0,39	2,61 ± 0,31	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	2,53 ± 0,32	2,70 ± 0,28	2,49 ± 0,20	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	2,60 ± 0,18	2,67 ± 0,20	2,63 ± 0,24	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của PĐE đến nồng độ cholesterol trong máu chuột

Thời gian	Cholesterol (mmol/l)			p (t- test Student)
	<i>Lô chứng</i> (n = 10)	<i>Lô trị 1</i> (n = 10)	<i>Lô trị 2</i> (n = 10)	
Trước uống PĐE	1,35 ± 0,26	1,29 ± 0,27	1,34 ± 0,50	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	1,63 ± 0,49	1,74 ± 0,53	1,83 ± 0,50	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	1,54 ± 0,53	1,67 ± 0,57	1,53 ± 0,45	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	1,53 ± 0,20	1,43 ± 0,24	1,44 ± 0,15	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở các bảng 3.10, 3.11 và 3.12 cho thấy: Sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống, nồng độ bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol toàn phần trong máu chuột ở cả lô trị 1 (*uống PĐE liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày*) và lô trị 2 (*uống PĐE liều gấp 3 lần lô trị 1*) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

3.1.2.4. Đánh giá chức năng thận

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của PĐE đến nồng độ creatinin trong máu chuột

Thời gian	Creatinin (mg/dl)			P (t- test Student)
	Lô chứng (n = 10)	Lô trị 1 (n = 10)	Lô trị 2 (n = 10)	
Trước uống PĐE	1,06 ± 0,11	1,04 ± 0,08	1,08 ± 0,09	> 0,05
Sau 4 tuần uống PĐE	1,08 ± 0,04	1,03 ± 0,07	1,03 ± 0,09	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 8 tuần uống PĐE	1,07 ± 0,08	1,05 ± 0,08	1,06 ± 0,07	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 2 tuần ngừng PĐE	1,09 ± 0,09	1,03 ± 0,10	1,13 ± 0,05	> 0,05
p (trước - sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy: Sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống, ở cả lô trị 1 (uống PĐE liều tương đương 4,2 g được liều/kg/ngày) và lô trị 2 (uống PĐE liều gấp 3 lần lô trị 1) nồng độ creatinin trong máu chuột không có sự thay đổi khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

3.1.2.5. Thay đổi về mô bệnh học

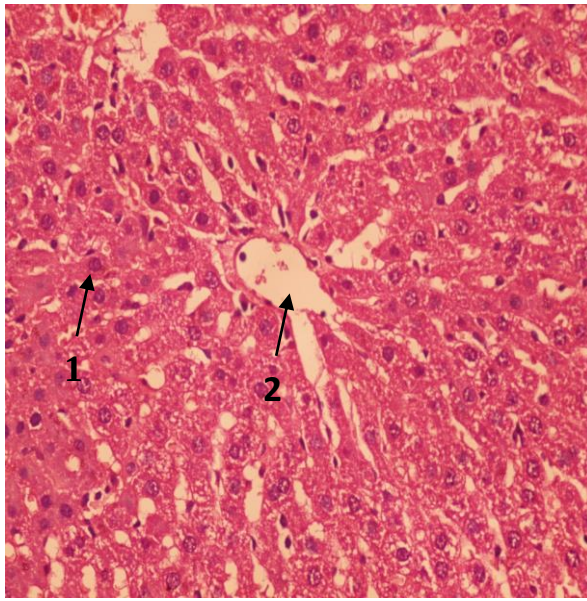
Sau 8 tuần uống mẫu thử:

* *Đại thể:* Trên tất cả các chuột cống trắng thực nghiệm (cả lô chứng và 2 lô trị) đều không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột.

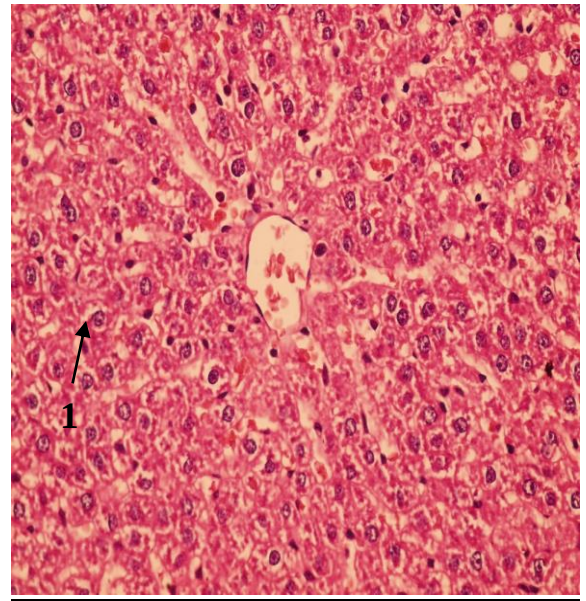
* *Vi thể:*

Bảng 3.14. Hình thái vi thể gan chuột sau 8 tuần uống mẫu thử

Lô chuột	Kết quả vi thể
Lô chứng (Ảnh 3.1 và 3.2)	- 1/3 mẫu bệnh phẩm gan có cấu trúc bình thường. - 2/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh <i>thoái hóa nhẹ</i> , tế bào có ít hóc sáng nhỏ.
Lô trị 1 (Ảnh 3.3 và 3.4)	- 2/3 mẫu bệnh phẩm gan có hình ảnh <i>thoái hóa nhẹ</i> , tế bào gan có ít hóc sáng nhỏ. - 1/3 mẫu bệnh phẩm gan có cấu trúc <i>thoái hóa vừa</i> , bào tương tế bào có khá nhiều hóc sáng nhỏ.
Lô trị 2 (Ảnh 3.5 và 3.6)	- 2/3 mẫu bệnh phẩm gan có hình ảnh <i>thoái hóa nhẹ</i> , tế bào gan có ít hóc sáng nhỏ. - 1/3 mẫu bệnh phẩm gan có hình ảnh <i>thoái hóa vừa</i> , tế bào gan có khá nhiều hóc sáng nhỏ.

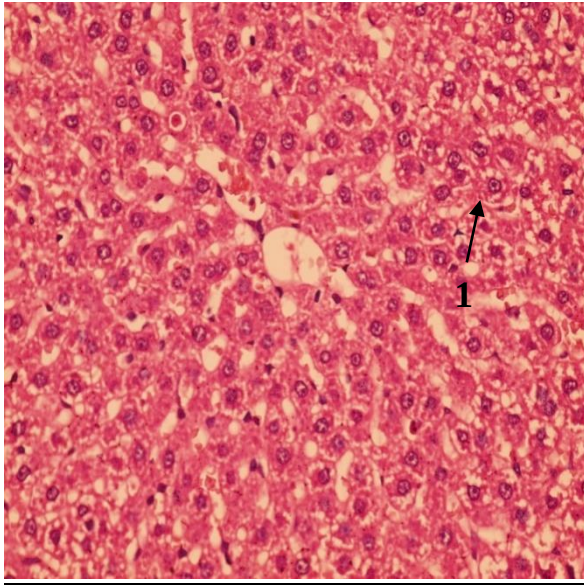
***Ảnh 3.1. Hình thái vi thể gan chuột lô chứng (chuột số 23)(HE x 400)***

1. Tế bào gan bình thường.
2. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy.

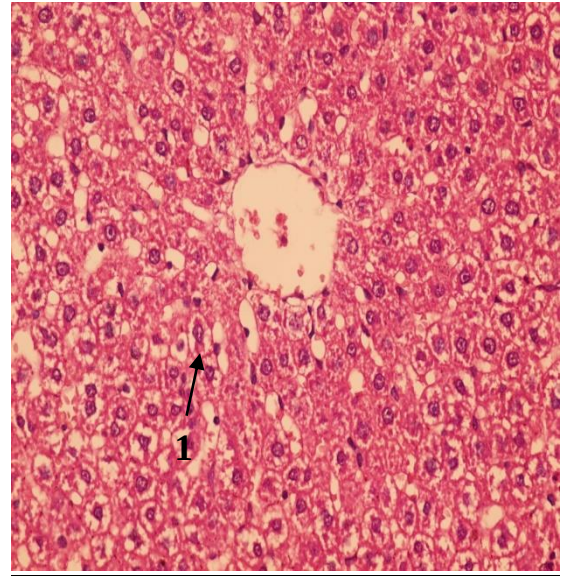
***Ảnh 3.2. Hình thái vi thể gan chuột lô chứng (chuột số 18) (HE x 400)***

1. Tế bào gan thoái hóa nhẹ.

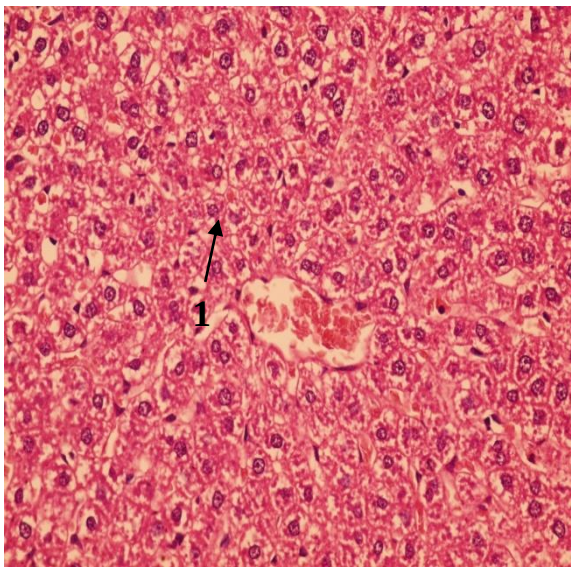
(HE x 400: Nhuộm Hematoxylin- Eosin, độ phóng đại 400 lần)



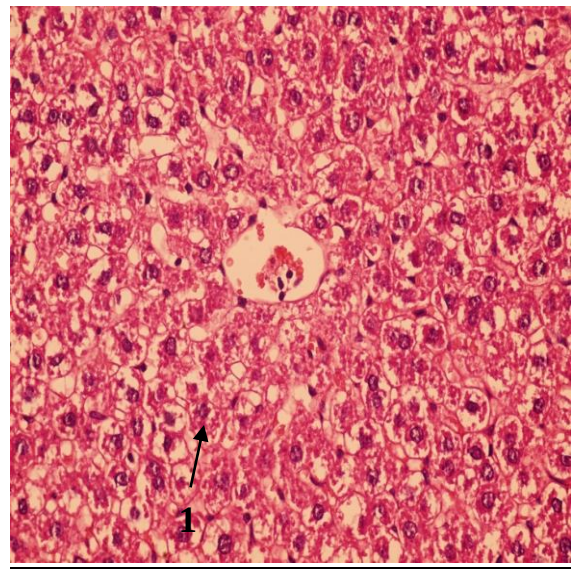
**Ảnh 3.3. Hình thái vi thể gan chuột
lô trị 1 sau 8 tuần uống thuốc thử
(chuột số 38)(HE x 400).**
1. Tế bào gan thoái hóa nhẹ.



**Ảnh 3.4. Hình thái vi thể gan chuột
lô trị 1 sau 8 tuần uống thuốc thử
(chuột số 39) (HE x 400).**
1. Tế bào gan thoái hóa vừa.



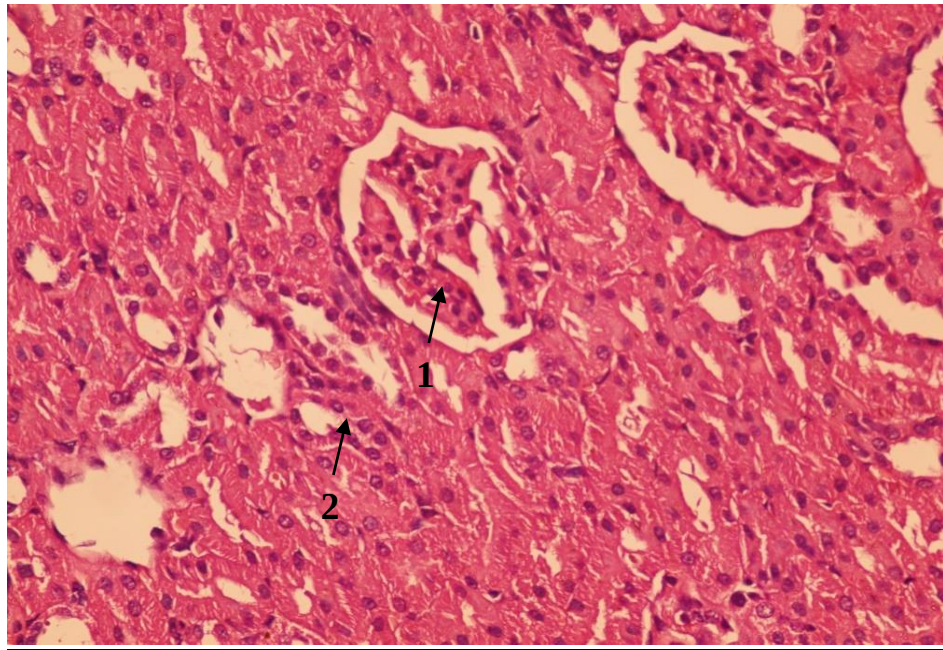
**Ảnh 3.5. Hình thái vi thể gan chuột
lô trị 2 sau 8 tuần uống thuốc thử.
(chuột số 32) (HE x 400).**
1. Tế bào gan thoái hóa nhẹ.



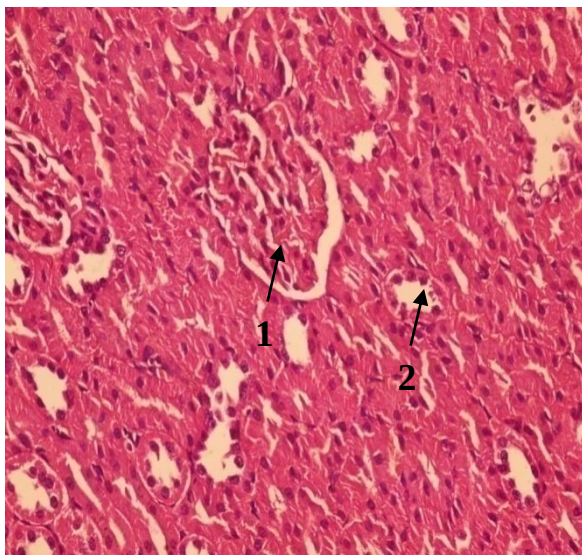
**Ảnh 3.6. Hình thái vi thể gan chuột
lô trị 2 sau 8 tuần uống thuốc thử
(chuột số 26)(HE x 400)**
1. Tế bào gan thoái hóa vừa.

Bảng 3.15. Hình thái vi thể thận chuột sau 8 tuần uống mẫu thử

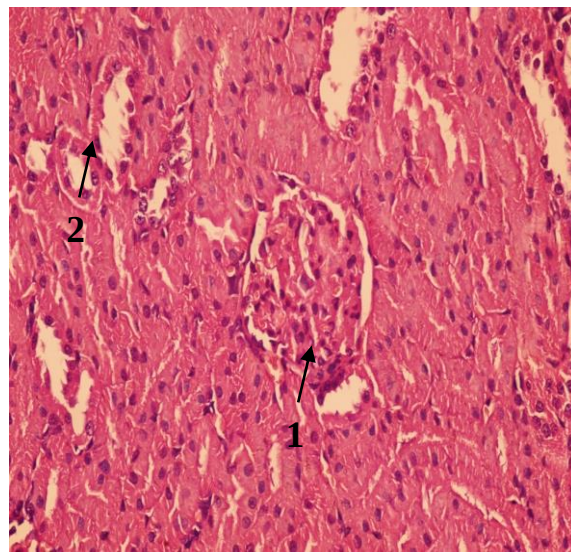
Lô chuột	Kết quả vi thể
Lô chứng sinh học. (<i>Ảnh 3.7</i>)	- 3/3 mẫu bệnh phẩm thận có cấu trúc bình thường.
Lô trị 1 (uống PĐE liều tương đương 4,2 g được liệu/kg/ngày). (<i>Ảnh 3.8</i>)	- 3/3 mẫu bệnh phẩm thận có cấu trúc bình thường.
Lô trị 2 (uống PĐE liều tương đương 12,6 g được liệu/kg/ngày). (<i>Ảnh 3.9</i>)	- 3/3 mẫu bệnh phẩm thận có cấu trúc bình thường.

***Ảnh 3.7. Hình thái vi thể thận chuột lô chứng (chuột số 22) (HE x 400)***

1. Cầu thận bình thường. 2. Ống thận bình thường.



Ảnh 3.8. Hình thái vi thể thận chuột lô trị 1 sau 8 tuần uống thuốc thử (chuột số 43) (HE x 400)
 1. Cầu thận bình thường.
 2. Ống thận bình thường.



Ảnh 3.9. Hình thái vi thể thận chuột lô trị 2 sau 8 tuần uống thuốc thử (chuột số 34) (HE x 400)
 1. Cầu thận bình thường.
 2. Ống thận bình thường.

Sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử:

* *Đại thể:* Trên tất cả các chuột cống trắng thực nghiệm (cả lô chứng và 2 lô trị) đều không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột.

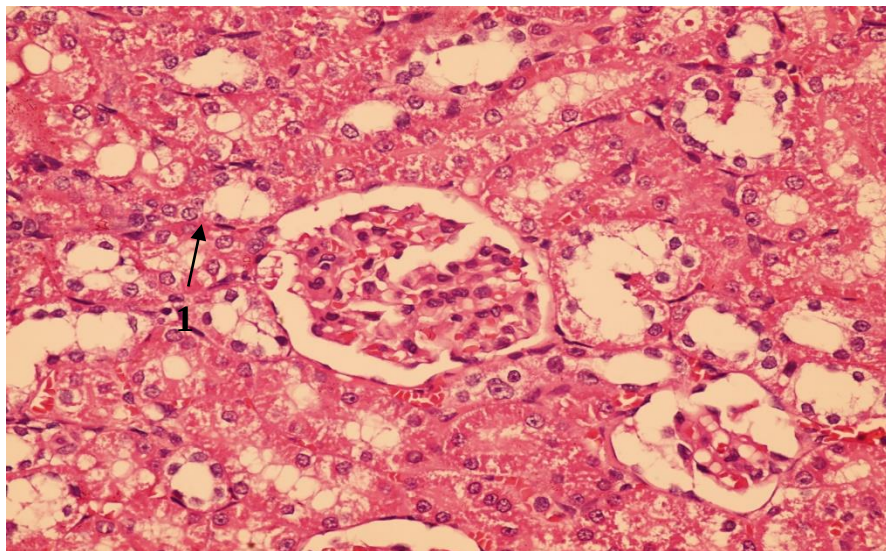
* *Vi thể:*

Bảng 3.16. Hình thái vi thể gan chuột sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử

Lô chuột	Kết quả vi thể
Lô chứng	- 2/3 mẫu bệnh phẩm gan có cấu trúc bình thường. - 1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh <i>thoái hóa vừa</i> , bào tương tế bào có khá nhiều hốc sáng nhỏ.
Lô trị 1	- 3/3 mẫu bệnh phẩm gan có hình ảnh <i>thoái hóa nhẹ</i> , tế bào gan có ít hốc sáng nhỏ.
Lô trị 2	- 1/3 mẫu bệnh phẩm gan có cấu trúc bình thường. - 1/3 mẫu bệnh phẩm gan có hình ảnh <i>thoái hóa nhẹ</i> , tế bào gan có ít hốc sáng nhỏ. - 1/3 mẫu bệnh phẩm gan có hình ảnh <i>thoái hóa vừa</i> , tế bào gan có khá nhiều hốc sáng nhỏ.

Bảng 3.17. Hình thái vi thể thận chuột sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử

Lô chuột	Kết quả vi thể
Lô chứng	- 3/3 mẫu bệnh phẩm thận có cấu trúc bình thường
Lô trị 1	- 2/3 mẫu bệnh phẩm thận có cấu trúc bình thường - 1/3 mẫu bệnh phẩm thận có hình ảnh <i>thoái hóa nhẹ</i> tế bào ống lượn gần, bào tương tế bào ống lượn gần có ít hốc sáng nhỏ. (Ảnh 3.10)
Lô trị 2	- 3/3 mẫu bệnh phẩm thận có cấu trúc bình thường.

***Ảnh 3.10. Hình thái vi thể thận chuột lô trị 1 sau 2 tuần ngừng thuốc thử (chuột số 207) (HE x 400)******1. Thận thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.***

Nhận xét: Kết quả mô bệnh học đại thể và vi thể sau 8 tuần dùng mẫu thử và theo dõi sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử cho thấy:

- Không thấy tổn thương về mặt hình thái khi quan sát đại thể các cơ quan của chuột cống trắng ở các lô trị so với lô chứng.

- Cấu trúc vi thể gan và thận của chuột cống trắng: không có sự khác biệt rõ rệt giữa lô chứng và các lô trị. Sau 8 tuần uống mẫu thử, cấu trúc vi thể gan của 2 lô trị có biểu hiện tổn thương thoái hóa nhiều hơn lô chứng, tuy nhiên ở lô chứng cũng có 2/3 mẫu bệnh phẩm (66,6%) có hình ảnh thoái hóa nhẹ tế

bào gan. Sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử, lô chứng cũng có 1/3 mẫu gan (33,3%) có tổn thương thoái hóa vừa.

3.2. Đánh giá tác dụng chống viêm gan, xơ gan của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại

3.2.1. Tác dụng chống viêm gan cấp trên mô hình gây viêm gan bằng PAR liều cao

3.2.1.1. Tác dụng bảo vệ gan

Bảng 3.18: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng PAR

Lô thí nghiệm	n	AST (UI/L) ($\bar{x} \pm SD$)	ALT (UI/L) ($\bar{x} \pm SD$)
Lô 1 (chứng)	10	206,0 $\pm$ 14,2	58,4 $\pm$ 8,0
Lô 2 (mô hình)	10	328,4 $\pm$ 31,8***	240,5 $\pm$ 68,0***
Lô 3 (silymarin)	10	225,1 $\pm$ 27,3 $\Delta\Delta\Delta$	116,9 $\pm$ 30,3***, $\Delta\Delta\Delta$
Lô 4 (CTP liều 1)	10	235,1 $\pm$ 22,9**, $\Delta\Delta\Delta$	95,9 $\pm$ 24,2***, $\Delta\Delta\Delta$
Lô 5 (CTP liều 2)	10	232,8 $\pm$ 36,7*, $\Delta\Delta\Delta$	106,6 $\pm$ 21,6***, $\Delta\Delta\Delta$
Lô 6 (PĐE liều 1)	10	208,4 $\pm$ 33,4 $\Delta\Delta\Delta$	93,1 $\pm$ 20,9***, $\Delta\Delta\Delta$
Lô 7 (PĐE liều 2)	10	216,6 $\pm$ 33,1 $\Delta\Delta\Delta$	100,8 $\pm$ 29,4***, $\Delta\Delta\Delta$

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích:*, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng)

$\Delta\Delta\Delta$: $p < 0,001$, p so với lô 2 (mô hình)

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy:

- Hoạt độ AST và ALT ở lô mô hình (gây độc bằng PAR liều cao) tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).

- Uống CTP, PĐE hoặc silymarin 8 ngày trước khi gây độc bằng PAR đã làm giảm rõ rệt hoạt độ AST và ALT so với lô 2 (lô gây độc nhưng không dùng thuốc) ($p < 0,001$).

- Tác dụng của 2 liều CTP và PĐE đã dùng tương đương nhau và tương đương với thuốc silymarin ($p > 0,05$);

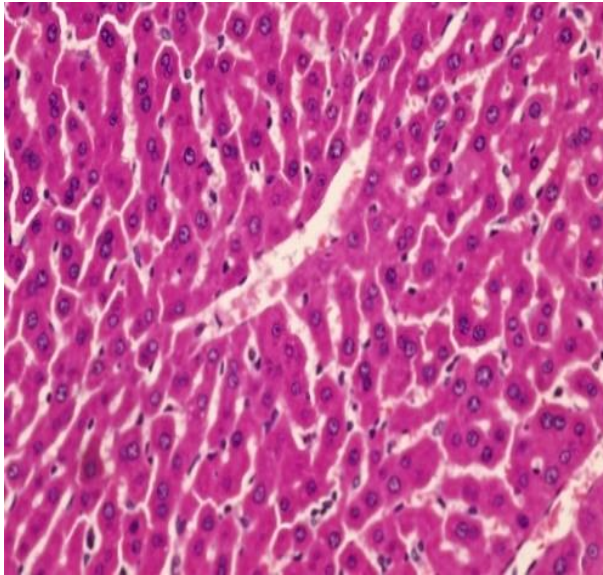
- Với liều dùng bằng nhau, CTP và PĐE có tác dụng tương đương nhau ($p_{6-4} > 0,05$; $p_{7-5} > 0,05$).

Bảng 3.19: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hình ảnh mô bệnh học của gan chuột bị gây độc bằng PAR

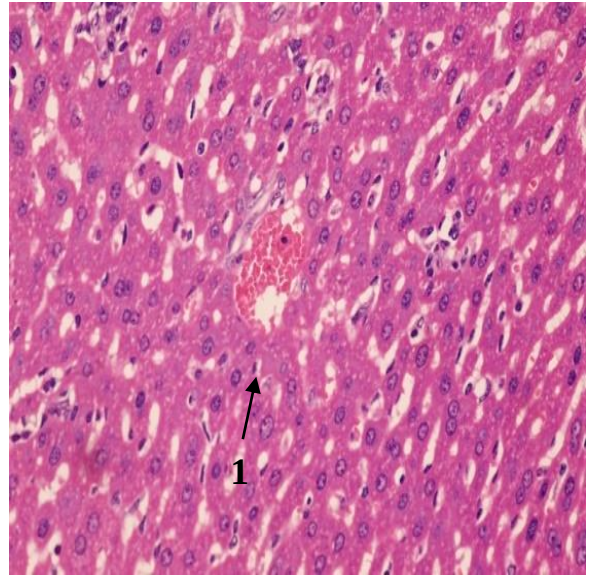
Lô thí nghiệm	Đại thể	Vi thể
Lô 1 (chứng)	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết.	2/3 mẫu bệnh phẩm cấu trúc vi thể gan <i>bình thường</i> , 1/3 mẫu bệnh phẩm gan <i>thoái hóa nhẹ</i> , bào tương tế bào gan có ít hóc sáng nhỏ. (Ảnh 3.11 và 3.12).
Lô 2 (mô hình)	Gan phù nề, sung huyết, nhạt màu, bề mặt gan không nhẵn, có nhiều chấm xuất huyết.	Các mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa nặng</i> , bào tương tế bào gan có nhiều hóc sáng lớn và nhỏ. Một số tế bào mất nhân. (Ảnh 3.13).
Lô 3 (silymarin)	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ, rải rác có vài điểm tổn thương.	Các mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa vừa</i> , bào tương tế bào gan có các hóc sáng nhỏ. (Ảnh 3.14).
Lô 4 (CTP liều 1)	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ, rải rác có vài điểm tổn thương.	Các mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa mức độ vừa</i> . (Ảnh 3.15).
Lô 5 (CTP liều 2)	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ, rải rác có vài điểm tổn thương.	Các mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa mức độ vừa</i> . (Ảnh 3.16).
Lô 6 (PĐE liều 1)	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ, không thấy rõ tổn thương trên bề mặt.	1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa nhẹ</i> . 1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa vừa</i> . 1/3 mẫu bệnh phẩm gan <i>thoái hóa nặng</i> (Ảnh 3.17, 3.18 và 3.19).
Lô 7 (PĐE liều 2)	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ, không thấy rõ tổn thương trên bề mặt.	2/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa vừa</i> . 1/3 mẫu bệnh phẩm gan <i>thoái hóa nhẹ</i> . (Ảnh 3.20 và 3.21).

Nhận xét: kết quả tại bảng 3.19 cho thấy:

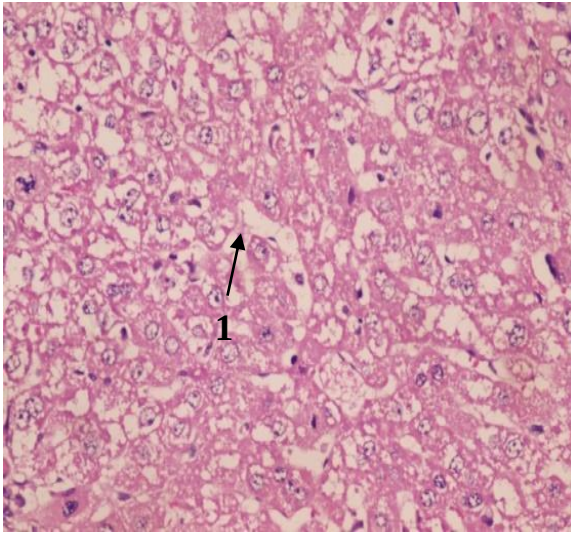
- Lô chứng quan sát đại thể gan bình thường, nhưng hình ảnh vi thể có 1/3 mẫu bệnh phẩm gan thoái hóa nhẹ.
- Lô mô hình thể hiện rõ tình trạng viêm gan cấp sau khi gây độc bằng PAR liều cao, cả khi quan sát đại thể gan và hình ảnh vi thể gan. Tất cả các mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan thoái hóa nặng.
- Uống CTP, PĐE và silymarin đã làm hạn chế rõ rệt mức độ tổn thương gan do PAR liều cao gây ra cả trên hình ảnh đại thể và vi thể.



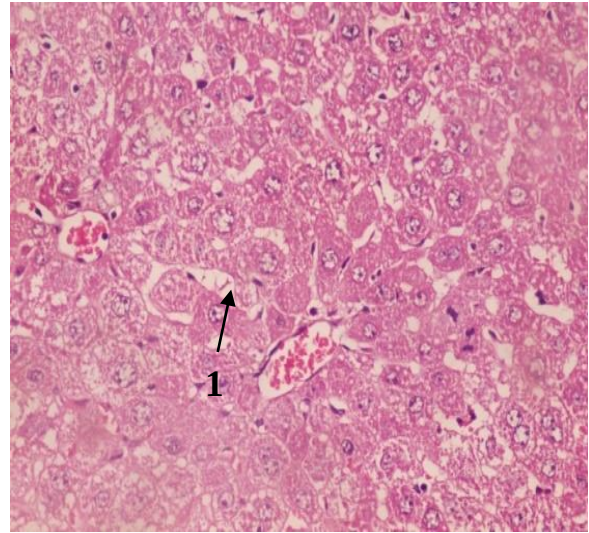
*Ảnh 3.11. Hình thái vi thể gan
chuột lô chứng
(chuột số 72) (HE x 400).
Gan bình thường.*



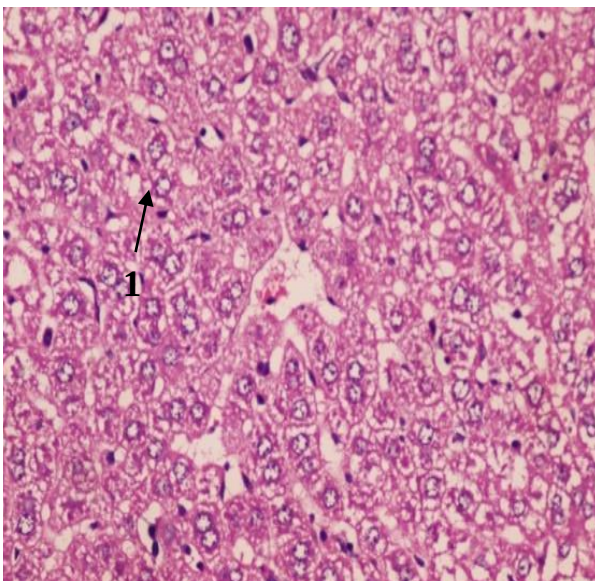
*Ảnh 3.12. Hình thái vi thể gan
chuột lô chứng
(chuột số 77) (HE x 400).
1. Gan thoái hóa nhẹ.*



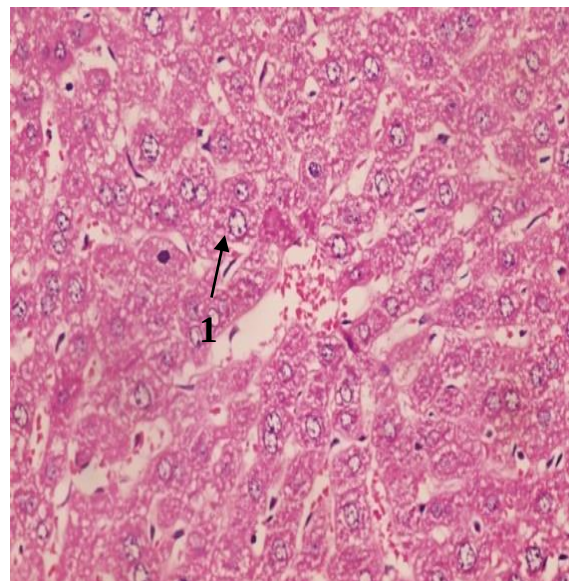
Ảnh 3.13. Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình
(chuột số 148) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa nặng.



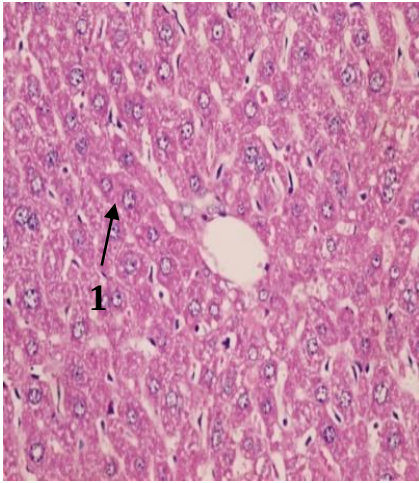
Ảnh 3.14. Hình thái vi thể gan chuột lô uống silymarin
(chuột số 136) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa vừa.



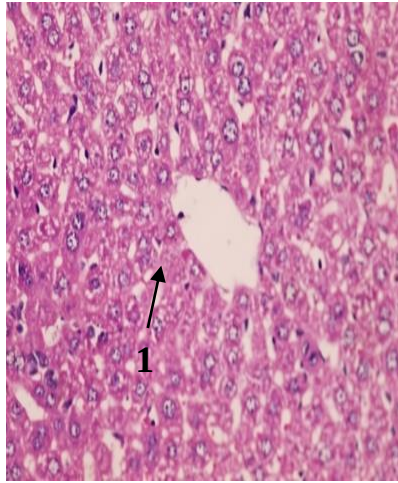
Ảnh 3.15. Hình thái vi thể gan chuột lô CTP liều 1
(chuột số 47) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa vừa.



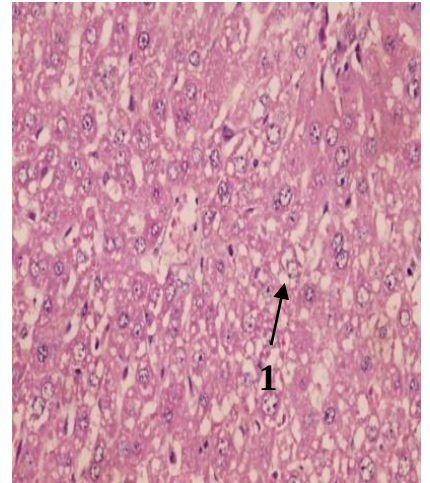
Ảnh 3.16. Hình thái vi thể gan chuột lô CTP liều 2
(chuột số 29) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa vừa.



Ảnh 3.17



Ảnh 3.18



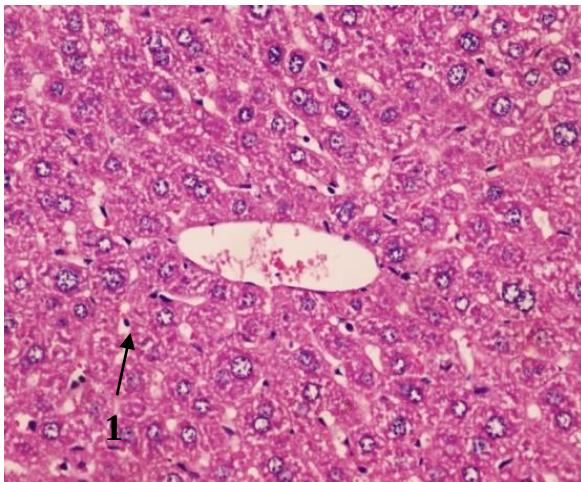
Ảnh 3.19

Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE liều 1 (HE x 400)

Ảnh 3.17: 1. Gan thoái hóa nhẹ (chuột số 170).

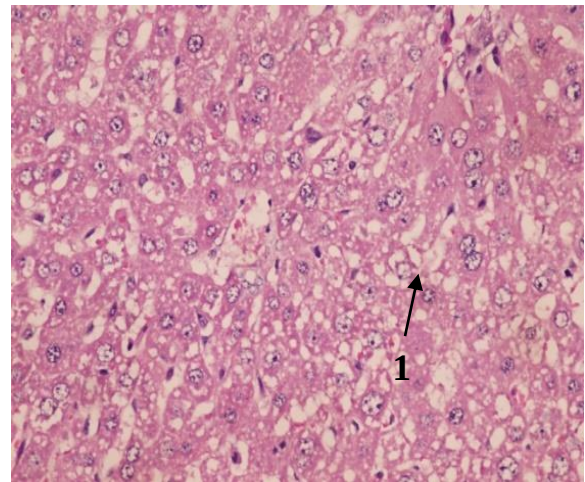
Ảnh 3.18: 1. Gan thoái hóa vừa (chuột số 167).

Ảnh 3.19: 1. Gan thoái hóa nặng (chuột số 165).



Ảnh 3.20. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống PĐE liều 2
(chuột số 159) (HE x 400)

1. Gan thoái hóa nhẹ.



Ảnh 3.21. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống PĐE liều 2
(chuột số 153) (HE x 400)

1. Gan thoái hóa vừa.

3.2.1.2. Tác dụng phục hồi tổn thương gan trên mô hình gây viêm gan bằng PAR liều cao

* Sau gây độc bằng PAR 2 ngày:

Bảng 3.20: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh chuột sau gây độc bằng PAR 2 ngày

Lô thí nghiệm	n	AST (UI/L) ($\bar{X} \pm SD$)	ALT (UI/L) ($\bar{X} \pm SD$)
Lô 1 (chứng)	5	108,0 $\pm$ 14,6	48,4 $\pm$ 6,4
Lô 2 (mô hình)	10	442,0 $\pm$ 143,0***	286,3 $\pm$ 90,2***
Lô 3 (silymarin)	10	221,1 $\pm$ 40,7***, $\Delta\Delta\Delta$	117,3 $\pm$ 35,8**, $\Delta\Delta\Delta$
Lô 4 (CTP)	10	238,4 $\pm$ 74,3**, $\Delta\Delta\Delta$	120,4 $\pm$ 40,7**, $\Delta\Delta\Delta$
Lô 5 (PĐE)	10	205,9 $\pm$ 33,4***, $\Delta\Delta\Delta$	94,1 $\pm$ 30,0**, $\Delta\Delta\Delta$

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích: **, ***: $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng)

$\Delta\Delta\Delta$: $p < 0,001$, p so với lô 2 (mô hình)

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.20 cho thấy:

- Sau 2 ngày gây độc bằng PAR, hoạt độ AST và ALT ở lô mô hình tăng cao rõ rệt so với lô chứng ($p_{2-1} < 0,001$).
- Các lô uống CTP, PĐE và silymarin làm giảm rõ rệt hoạt độ AST và ALT so với lô mô hình ($p < 0,001$) nhưng vẫn tăng cao so với lô chứng ($p < 0,01$).
- PĐE có xu hướng làm giảm hoạt độ AST và ALT tốt nhất, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô uống CTP và silymarin.

Bảng 3.21: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hình ảnh mô bệnh học của gan chuột sau gây độc bằng PAR 2 ngày

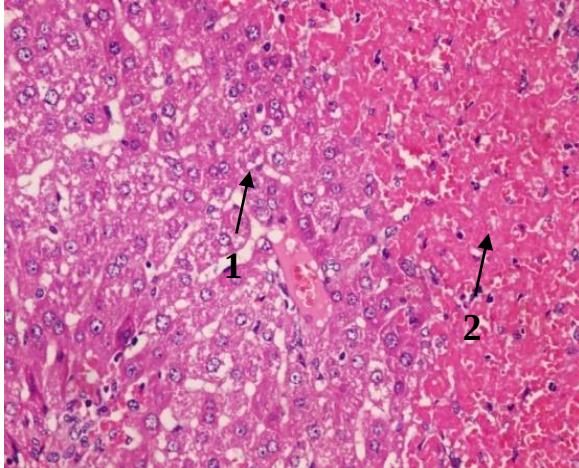
Lô thí nghiệm	Đại thể	Vi thể
Lô 1 (chứng)	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết.	2/3 mẫu bệnh phẩm cấu trúc vi thể gan bình thường, 1/3 mẫu bệnh phẩm gan <i>thoái hóa nhẹ</i> , bào tương tế bào gan có ít hốc sáng nhỏ.
Lô 2 (mô hình)	Gan phù nề, sung huyết, bề mặt gan không nhẵn, có nhiều ổ hoại tử, các chấm xuất huyết.	2/3 mẫu bệnh phẩm có <i>thoái hóa nặng</i> kèm theo hoại tử tế bào gan, xen kẽ có các vùng hoại tử chảy máu, có xâm nhập viêm. 1/3 mẫu bệnh phẩm gan <i>thoái hóa vừa</i> , bào tương tế bào gan có khá nhiều hốc sáng nhỏ. (Ảnh 3.22 và 3.23).
Lô 3 (silymarin)	Gan phù nề, sung huyết nhẹ, bề mặt gan có một vài chấm xuất huyết.	Các mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa vừa</i> , bào tương tế bào gan có nhiều hốc sáng nhỏ. Nhân tế bào không đều, có xâm nhập viêm ở khoảng cửa. (Ảnh 3.24)
Lô 4 (CTP)	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ, rải rác có một số điểm tổn thương.	1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan <i>thoái hóa nặng</i> , 1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh <i>gan thoái hóa vừa</i> , 1/3 mẫu bệnh phẩm <i>gan thoái hóa nhẹ</i> . (Ảnh 3.25, 3.26 và 3.27)
Lô 5 (PĐE)	Gan màu đỏ, sung huyết nhẹ, không thấy rõ tổn thương trên bề mặt.	1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh <i>gan thoái hóa mức độ vừa</i> , 2/3 mẫu bệnh phẩm <i>gan thoái hóa nhẹ</i> . (Ảnh 3.28 và 3.29)

Nhận xét: Kết quả tại bảng 3.21 cho thấy:

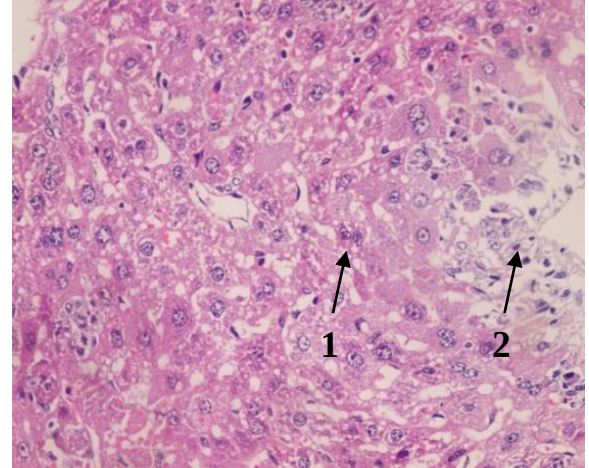
- Lô chứng quan sát đại thể gan bình thường, nhưng hình ảnh vi thể có 1/3 mẫu bệnh phẩm gan thoái hóa nhẹ.
- Lô mô hình thể hiện rõ tình trạng viêm gan cấp sau khi gây độc bằng PAR liều cao, cả khi quan sát đại thể gan và hình ảnh vi thể gan. 2/3 mẫu

bệnh phẩm có hình ảnh gan thoái hóa nặng, 1/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan thoái hóa vừa.

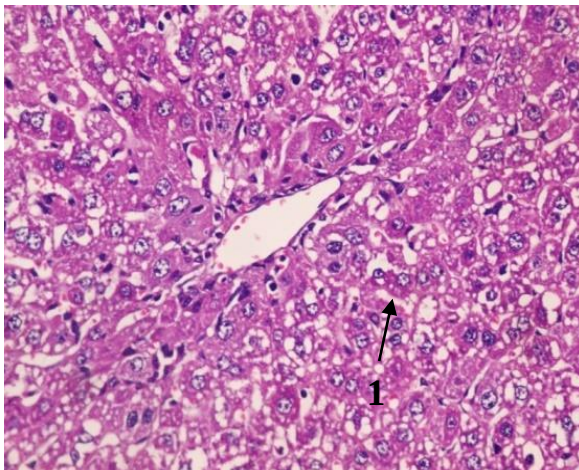
- Uống CTP, PDE và silymarin đã làm hạn chế rõ rệt mức độ tổn thương gan do PAR liều cao gây ra cả trên hình ảnh đại thể và vi thể, trong đó mẫu PDE thể hiện tác dụng tốt hơn cả.



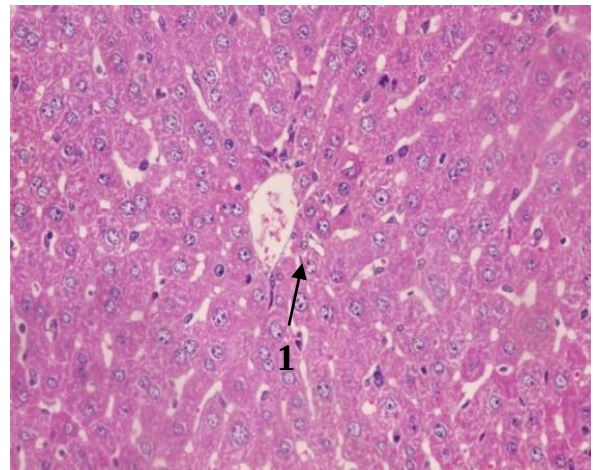
Ảnh 3.22. Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình.
(chuột số 9) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa vừa.
2. Vùng hoại tử, chảy máu.



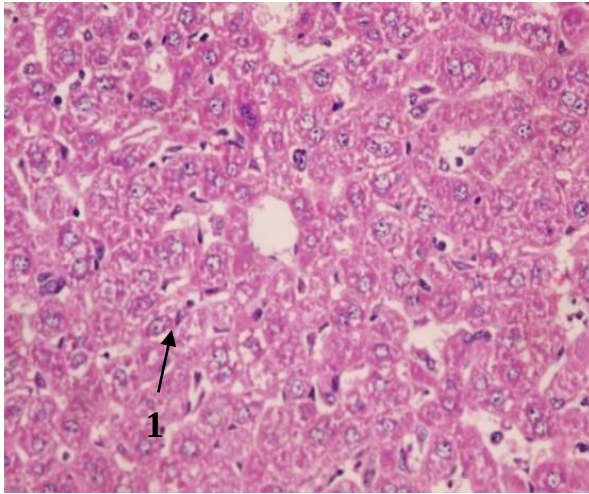
Ảnh 3.23. Hình thái vi thể gan chuột lô mô hình.
(chuột số 12) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa nặng.
2. Hoại tử tế bào gan.



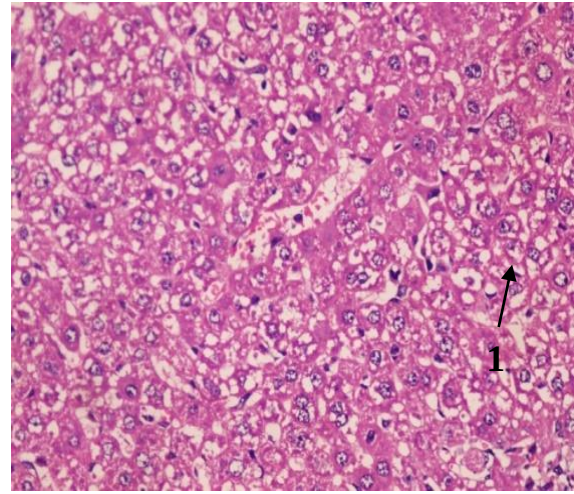
Ảnh 3.24. Hình thái vi thể gan chuột lô uống silymarin.
(chuột số 29) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa vừa.



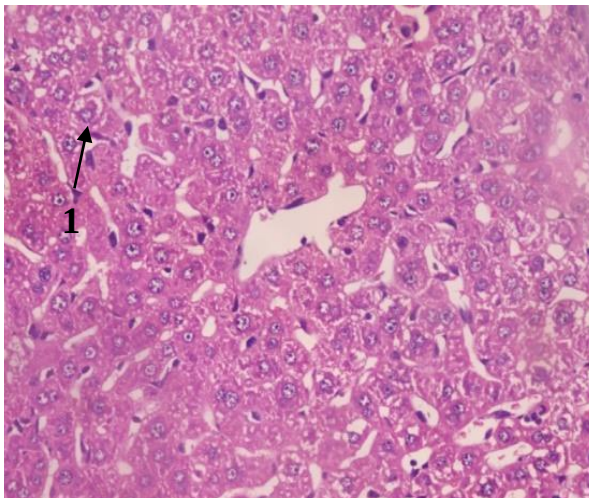
Ảnh 3.25. Hình thái vi thể gan chuột lô uống CTP.
(chuột số 44) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa nhẹ.



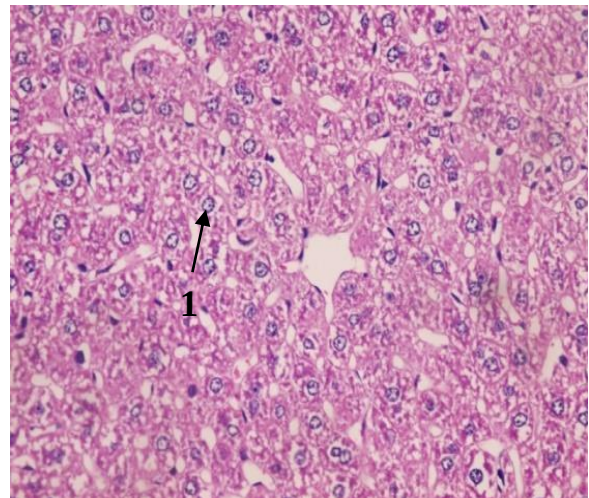
**Ảnh 3.26. Hình thái vi thể gan chuột
lô uống CTP**
(chuột số 42) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa vừa.



**Ảnh 3.27. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống CTP**
(chuột số 34) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa nặng.



**Ảnh 3.28. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống PDE**
(chuột số 46) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa nhẹ.



**Ảnh 3.29. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống PDE**
(chuột số 51) (HE x 400)
1. Gan thoái hóa vừa.

* Sau gây độc bằng PAR 4 ngày:

Bảng 3.22: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh chuột sau gây độc bằng PAR 4 ngày

Lô thí nghiệm	n	AST (UI/L) ($\bar{x} \pm SD$)	ALT (UI/L) ($\bar{x} \pm SD$)
Lô 1 (chứng)	5	111,0 $\pm$ 12,5	49,6 $\pm$ 2,7
Lô 6 (mô hình)	10	197,3 $\pm$ 24,7***	108,2 $\pm$ 17,1***
Lô 7 (silymarin)	10	132,0 $\pm$ 35,7 $\Delta\Delta\Delta$	54,3 $\pm$ 6,7 $\Delta\Delta\Delta$
Lô 8 (CTP)	10	144,2 $\pm$ 28,0*, $\Delta\Delta\Delta$	56,7 $\pm$ 7,4 $\Delta\Delta\Delta$
Lô 9 (PĐE)	10	130,6 $\pm$ 22,5 $\Delta\Delta\Delta$	53,7 $\pm$ 4,6 $\Delta\Delta\Delta$

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích: * ***: $p < 0,05$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng)

$\Delta\Delta\Delta$: $p < 0,001$, p so với lô 6 (mô hình)

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.22 cho thấy:

- Sau gây độc bằng PAR 4 ngày, hoạt độ AST và ALT ở lô mô hình gây độc bằng PAR (lô 6) vẫn tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).

- Các lô uống mẫu thử CTP, PĐE và silymarin có tác dụng làm giảm rõ rệt hoạt độ AST và ALT so với lô 6 ($p < 0,001$), trở về giá trị tương đương với lô chứng sinh học ($p > 0,05$).

- Tác dụng làm giảm hoạt độ AST và ALT của các lô uống thuốc thử CTP, PĐE và silymarin tương đương nhau, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

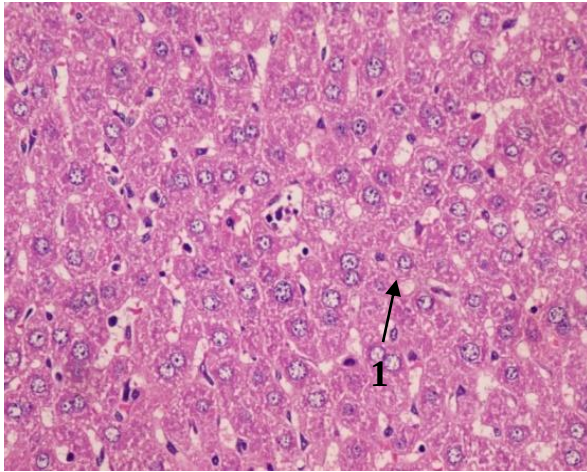
Bảng 3.23: Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên hình ảnh mô bệnh học của gan chuột sau gây độc bằng PAR 4 ngày

Lô thí nghiệm	Đại thể	Vi thể
Lô 1 (chứng)	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết.	2/3 mẫu bệnh phẩm cấu trúc vi thể gan bình thường, 1/3 mẫu bệnh phẩm <i>gan thoái hóa nhẹ</i> , bào tương tế bào gan có ít hốc sáng nhỏ.
Lô 6 (mô hình)	Gan phù nề, sung huyết nhẹ, bề mặt gan có một số chấm xuất huyết.	2/3 mẫu bệnh phẩm có <i>thoái hóa vừa</i> , bào tương tế bào gan có khá nhiều hốc sáng nhỏ. 1/3 mẫu bệnh phẩm <i>gan thoái hóa nhẹ</i> . (Ảnh 3.30 và 3.31)
Lô 7 (silymarin)	Gan màu đỏ, không thấy rõ tổn thương trên bề mặt.	2/3 mẫu bệnh phẩm cấu trúc vi thể gan <i>bình thường</i> , 1/3 mẫu bệnh phẩm <i>gan thoái hóa nhẹ</i> .
Lô 8 (CTP)	Gan màu đỏ, không thấy rõ tổn thương trên bề mặt.	1/3 mẫu bệnh phẩm cấu trúc vi thể gan <i>bình thường</i> , 2/3 mẫu bệnh phẩm <i>gan thoái hóa nhẹ</i> . (Ảnh 3.32 và 3.33)
Lô 9 (PĐE)	Gan màu đỏ, không thấy rõ tổn thương trên bề mặt.	Các mẫu bệnh phẩm có hình ảnh <i>gan thoái hóa nhẹ</i> . (Ảnh 3.34)

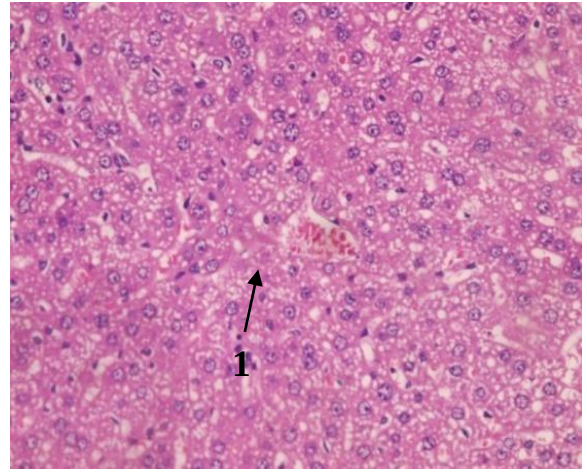
Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.23 cho thấy:

- Lô chứng quan sát đại thể gan bình thường, nhưng hình ảnh vi thể có 1/3 mẫu bệnh phẩm gan thoái hóa nhẹ.

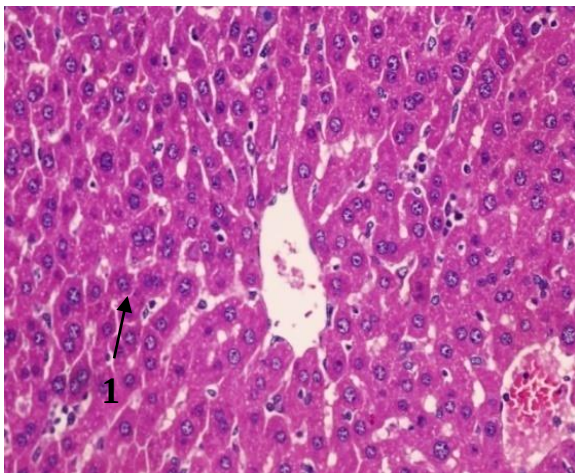
- Ở tất cả các lô gây độc bằng PAR liều cao, mức độ tổn thương gan đã giảm hơn so với thời điểm sau 2 ngày gây độc, nhưng mức độ tổn thương gan ở lô mô hình vẫn nặng hơn rõ rệt so với các lô uống CTP, PĐE hoặc silymarin.



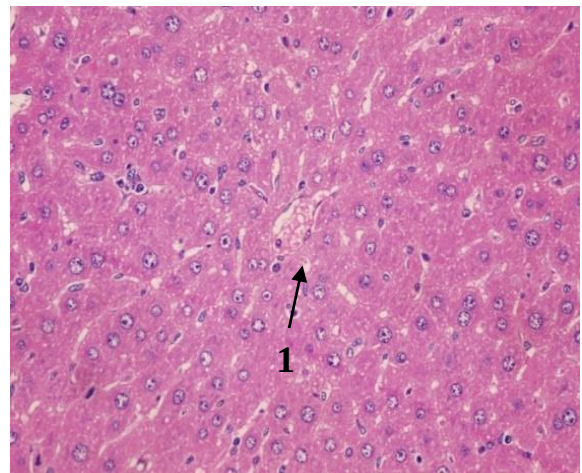
*Ảnh 3.30. Hình thái vi thể gan
chuột lô mô hình
(chuột số 69) (HE x 400)*
1. Gan thoái hóa nhẹ.



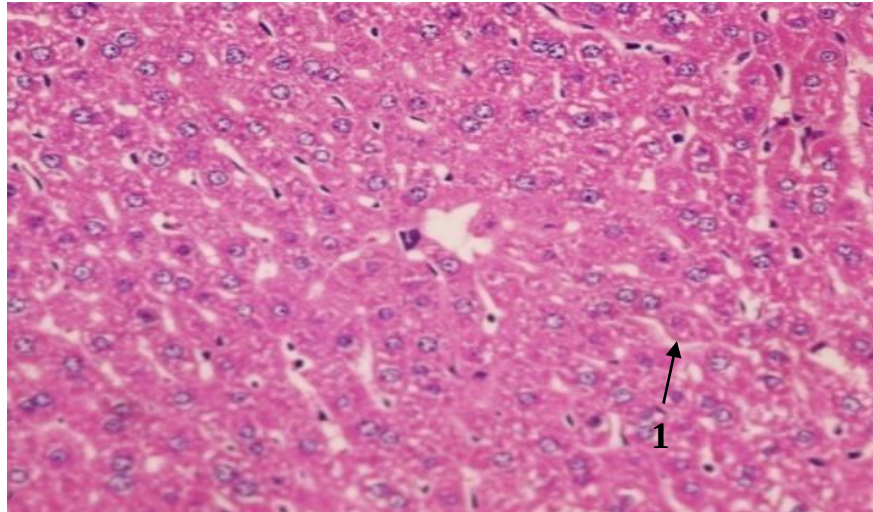
*Ảnh 3.31. Hình thái vi thể gan
chuột lô mô hình
(chuột số 71) (HE x 400)*
1. Gan thoái hóa vừa.



*Ảnh 3.32. Hình thái vi thể gan chuột
lô uống CTP
(chuột số 95) (HE x 400)*
1. Gan bình thường.



*Ảnh 3.33. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống CTP
(chuột số 102) (HE x 400)*
1. Gan thoái hóa nhẹ.



Ảnh 3.34. Hình thái vi thể gan chuột lô uống PĐE
(chuột số 109) (HE x 400). 1. Gan thoái hóa nhẹ.

3.2.2. Tác dụng chống xơ gan của CTP và PĐE

3.2.2.1. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng tương đối của gan chuột

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng tương đối của gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4

Lô thí nghiệm	n	Trọng lượng tương đối của gan chuột (g/100g thể trọng). ($\bar{X} \pm \text{SD}$)
Lô 1 (Chứng)	10	$3,69 \pm 0,46$
Lô 2 (Mô hình)	10	$6,28 \pm 0,15^{***}$
Lô 3 (Silymarin)	10	$5,04 \pm 0,60^{***, \Delta}$
Lô 4 (CTP)	9	$5,56 \pm 0,78^{***}$
Lô 5 (PĐE)	9	$5,19 \pm 0,92^{***}$

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích:***: $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng)

Δ : $p < 0,05$, p so với lô 2 (mô hình)

Nhận xét: Kết quả bảng 3.24 cho thấy:

- Trọng lượng tương đối của gan chuột ở lô mô hình và tất cả các lô dùng thuốc thử sau khi gây độc bằng CCl_4 18 tuần đều tăng cao so với lô chứng ($p < 0,001$).

- Trọng lượng tương đối của gan chuột lô 3 (uống silymarin) giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p < 0,05$), nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa so với 2 lô dùng thuốc thử ($p > 0,05$).

- Hai lô dùng CTP và PĐE có trọng lượng tương đối của gan chuột nhỏ hơn so với lô mô hình, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về trọng lượng tương đối của gan chuột giữa các lô dùng silymarin, CTP và PĐE.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến mức độ tổn thương tế bào gan chuột

Bảng 3.25. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến hoạt độ ALT trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4 .

Lô thí nghiệm	n	Hoạt độ ALT (UI/L). ($\bar{X} \pm \text{SD}$)
Lô 1 (Chứng)	10	$74,0 \pm 18,2$
Lô 2 (Mô hình)	10	$152,0 \pm 101,3^*$
Lô 3 (Silymarin)	10	$144,6 \pm 58,6^{**}$
Lô 4 (CTP)	9	$149,7 \pm 48,8^{***}$
Lô 5 (PĐE)	9	$139,6 \pm 40,0^{***}$

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích:*, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng)

Nhận xét: Kết quả bảng 3.25 cho thấy: Hoạt độ ALT ở lô mô hình và các lô dùng thuốc thử, thuốc chuẩn đều tăng cao so với lô chứng ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Các lô 3, 4 và 5 đều có hoạt độ ALT giảm hơn so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt về hoạt độ ALT giữa lô dùng thuốc chuẩn với các lô dùng thuốc thử ($p > 0,05$).

Bảng 3.26. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến hoạt độ AST trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl₄

Lô thí nghiệm	n	Hoạt độ AST (UI/L). ($\bar{X} \pm SD$)
Lô 1 (Chứng)	10	172,2 ± 31,9
Lô 2 (Mô hình)	10	305,4 ± 173,8*
Lô 3 (Silymarin)	10	260,2 ± 110,6*
Lô 4 (CTP)	9	281,7 ± 94,2**
Lô 5 (PĐE)	9	253,4 ± 71,0**

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích: * **: $p < 0,05$, $p < 0,01$, p so với lô 1 (chứng)

Nhận xét: Kết quả bảng 3.26 cho thấy: Hoạt độ AST ở lô mô hình và các lô dùng thuốc thử, thuốc chuẩn đều tăng cao so với lô chứng ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Các lô dùng thuốc thử và thuốc chuẩn đều có hoạt độ AST giảm hơn so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt về hoạt độ ALT giữa lô dùng thuốc chuẩn silymarin với các lô dùng thuốc thử CTP và PĐE ($p > 0,05$).

3.2.2.3. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến chức năng gan chuột

Bảng 3.27. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến nồng độ albumin trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl₄

Lô thí nghiệm	n	Albumin (g/dl). ($\bar{X} \pm SD$)
Lô 1 (Chứng)	10	3,09 ± 0,31
Lô 2 (Mô hình)	10	2,51 ± 0,26***
Lô 3 (Silymarin)	10	2,78 ± 0,42
Lô 4 (CTP)	9	2,65 ± 0,26**
Lô 5 (PĐE)	9	2,55 ± 0,28**

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích: **,***: $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng)

Nhận xét: Kết quả bảng 3.27 cho thấy:

- Nồng độ albumin trong máu chuột ở lô mô hình và các lô dùng thuốc thử đều giảm so với lô chứng ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). Riêng nồng độ albumin ở lô uống silymarin có giảm nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

- Mặc dù nồng độ albumin trong máu chuột ở các lô uống thuốc thử và thuốc chuẩn cao hơn so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Không có sự khác biệt có ý nghĩa về nồng độ albumin trong máu chuột giữa lô uống thuốc chuẩn silymarin với các lô uống CTP và PDE ($p > 0,05$).

Bảng 3.28. *Ảnh hưởng của CTP và PDE đến nồng độ cholesterol toàn phần trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4*

Lô thí nghiệm	n	Cholesterol toàn phần (mmol/l). ($\bar{X} \pm \text{SD}$)
Lô 1 (Chứng)	10	$2,96 \pm 0,47$
Lô 2 (Mô hình)	10	$2,09 \pm 0,39^{***}$
Lô 3 (Silymarin)	10	$3,15 \pm 1,01^{\Delta\Delta}$
Lô 4 (CTP)	9	$2,37 \pm 0,26^{**}$
Lô 5 (PDE)	9	$2,56 \pm 0,32^{\Delta\Delta}$

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

*Chú thích: **:**: $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng)*

$\Delta\Delta$: $p < 0,01$, p so với lô 2 (mô hình).

Nhận xét: Kết quả bảng 3.28 cho thấy:

- Nồng độ cholesterol trong máu chuột ở lô mô hình giảm rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,001$).

- Lô uống CTP có nồng độ cholesterol giảm rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,01$) và không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô mô hình.

- Nồng độ cholesterol trong máu chuột của lô 3 và lô 5 tăng rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,01$) và không có sự khác biệt so với lô chứng ($p > 0,05$).

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl₄.

Lô thí nghiệm	n	Bilirubin toàn phần (mmol/l). ($\bar{X} \pm SD$)
Lô 1 (Chứng)	10	1,33 $\pm$ 0,33
Lô 2 (Mô hình)	10	1,74 $\pm$ 0,41*
Lô 3 (Silymarin)	10	1,29 $\pm$ 0,54 ^Δ
Lô 4 (CTP)	9	0,95 $\pm$ 0,25*, ^{ΔΔΔ}
Lô 5 (PĐE)	9	0,80 $\pm$ 0,21**, ^{ΔΔΔ}

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích:***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, p so với lô 1 (chứng).

^{Δ, ΔΔΔ}: $p < 0,05$, $p < 0,001$, p so với lô 2 (mô hình).

Nhận xét: Kết quả bảng 3.29 cho thấy:

- Nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột ở lô mô hình tăng rõ rệt so với lô chứng (lô 1).
- Tất cả các lô uống CTP (lô 4), PĐE (lô 5) và lô uống silymarin (lô 3) đã làm giảm rõ rệt nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột so với lô mô hình ($p < 0,05$ và $p < 0,001$).

3.2.2.4. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến các chỉ số huyết học trong máu chuột

Bảng 3.30. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến số lượng bạch cầu trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl₄.

Lô thí nghiệm	n	Số lượng bạch cầu (G/l). ($\bar{X} \pm SD$)
Lô 1 (Chứng)	10	4,43 $\pm$ 1,31
Lô 2 (Mô hình)	10	7,22 $\pm$ 3,17*
Lô 3 (Silymarin)	10	5,82 $\pm$ 2,19
Lô 4 (CTP)	9	7,86 $\pm$ 1,69***
Lô 5 (PĐE)	9	6,97 $\pm$ 2,47*

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích:*,***: $p < 0,05$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng).

Nhận xét: Kết quả bảng 3.30 cho thấy: Số lượng bạch cầu trong máu chuột sau gây độc bằng CCl_4 18 tuần ở lô mô hình và các lô dùng thuốc thử CTP và PĐE đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,05$ và $p < 0,001$). Lô dùng silymarin có tăng số lượng bạch cầu so với lô chứng nhưng chưa có sự khác biệt ($p > 0,05$). Số lượng bạch cầu ở các lô uống thuốc chuẩn và thuốc thử đều không khác biệt so với lô mô hình.

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4

Lô thí nghiệm	n	Số lượng hồng cầu (T/l). ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	Hàm lượng huyết sắc tố (g/dl). ($\bar{X} \pm \text{SD}$)
Lô 1 (Chứng)	10	$8,11 \pm 0,32$	$12,26 \pm 0,57$
Lô 2 (Mô hình)	10	$6,52 \pm 0,86^{***}$	$10,03 \pm 1,09^{***}$
Lô 3 (Silymarin)	10	$6,66 \pm 1,30^{**}$	$10,56 \pm 1,62^{**}$
Lô 4 (CTP)	9	$7,16 \pm 0,92^{**}$	$10,81 \pm 1,19^{**}$
Lô 5 (PĐE)	9	$7,08 \pm 0,82^{**}$	$10,51 \pm 1,24^{**}$

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích:*,***: $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng).

Nhận xét: Kết quả bảng 3.31 cho thấy:

- Số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột ở lô mô hình và tất cả các lô dùng thuốc thử và thuốc chuẩn đều giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,01$ và $p < 0,001$).

- Số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột ở hai lô dùng thuốc thử có xu hướng tăng hơn so với lô mô hình, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.2.5. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến các chỉ số đánh giá mức độ xơ gan trong gan chuột

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến hàm lượng hydroxyprolin (Hyp) trong gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl₄

Lô thí nghiệm	n	Hàm lượng hydroxyprolin (µg Hyp/1g mô tươi). ($\bar{X} \pm SD$)
Lô 1 (Chứng)	10	336,0 ± 62,0
Lô 2 (Mô hình)	10	553,4 ± 100,7***
Lô 3 (Silymarin)	10	505,3 ± 123,2***
Lô 4 (CTP)	9	495,7 ± 95,8***
Lô 5 (PĐE)	9	576,3 ± 148,3***

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích:***: $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng).

Nhận xét: Kết quả bảng 3.32 cho thấy hàm lượng hydroxyprolin trong gan chuột ở lô mô hình và các lô dùng thuốc thử, thuốc chuẩn đã tăng rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,001$). Các lô dùng silymarin, CTP có xu hướng giảm nồng độ hydroxyprolin so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.33. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến lượng collagen type IV trong gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl₄

Lô thí nghiệm	n	Lượng collagen type IV(%) ($\bar{X} \pm SD$)
Lô 1 (Chứng)	10	0,1205 ± 0,0175
Lô 2 (Mô hình)	10	6,3441 ± 0,9972***
Lô 3 (Silymarin)	10	6,3536 ± 3,1695***
Lô 4 (CTP)	9	5,5142 ± 2,4812***
Lô 5 (PĐE)	9	5,3286 ± 2,3270***

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

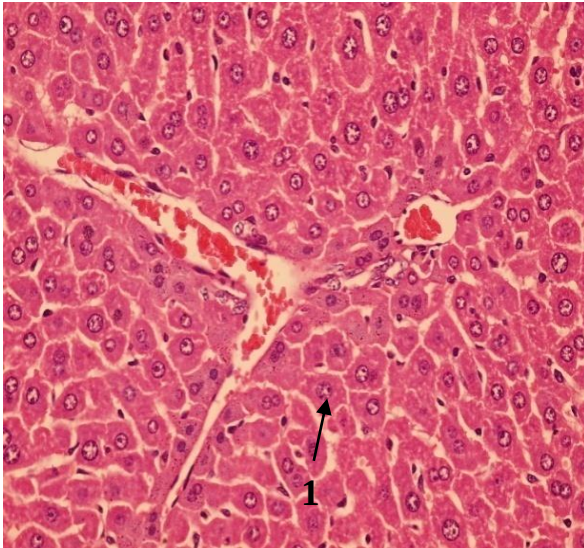
Chú thích:***: $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng).

Nhận xét: Kết quả bảng 3.33 cho thấy: Lượng collagen type IV trong gan chuột ở lô mô hình và các lô dùng thuốc thử, thuốc chuẩn đều tăng rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,001$). Các lô dùng thuốc thử (CTP và PĐE) có xu hướng giảm lượng collagen type IV so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

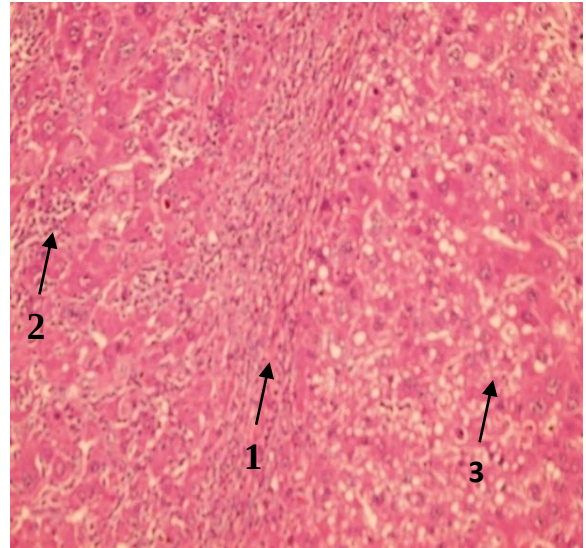
3.2.2.6. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến mô bệnh học gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4

Bảng 3.34: Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến mô bệnh học gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4

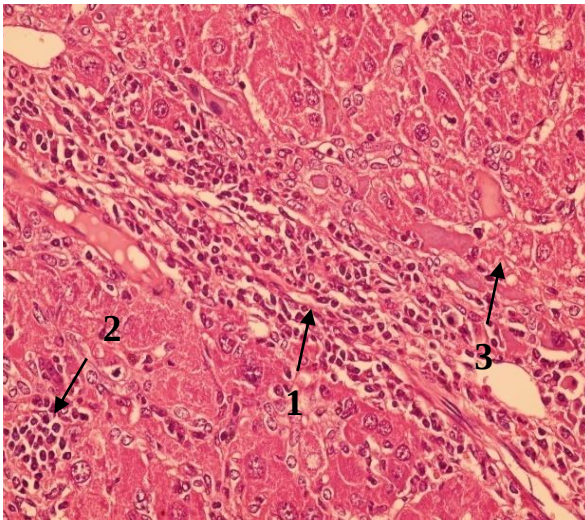
Lô chuột	Kết quả vi thể gan chuột
Lô 1 (Chứng)	5/5 mẫu bệnh gan có cấu trúc bình thường. (Ảnh 3.35).
Lô 2 (Mô hình)	-1/5 mẫu bệnh phẩm có tổn thương xơ gan, xâm nhập viêm và thoái hóa tế bào gan mức độ vừa. (Ảnh 3.36). -3/5 mẫu bệnh phẩm có tổn thương xơ hóa nhẹ, cục bộ của gan, có xâm nhập viêm lan tỏa và thoái hóa mức độ vừa tế bào gan. (Ảnh 3.37). -1/5 mẫu bệnh phẩm không có tổn thương xơ gan, có phì đại của nhân tế bào gan và thoái hóa nhẹ tế bào gan. (Ảnh 3.38).
Lô 3 (Silymarin)	- 1/5 mẫu bệnh phẩm có xơ gan nhẹ cục bộ, xâm nhập viêm nhẹ ở khoảng cửa và thoái hóa nhẹ của tế bào gan. (Ảnh 3.39). - 4/5 mẫu bệnh phẩm không có xơ gan, có xâm nhập viêm nhẹ ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan. (Ảnh 3.40).
Lô 4 (CTP)	- 1/5 mẫu bệnh phẩm bắt đầu xơ gan cục bộ. (Ảnh 3.41). - 4/5 mẫu bệnh có xơ hóa nhẹ và xâm nhập viêm ở khoảng cửa (không có hình ảnh xơ gan đầy đủ), thoái hóa nhẹ đến nặng tế bào gan. (Ảnh 3.42).
Lô 5 (PĐE)	- 5/5 mẫu bệnh phẩm không có xơ gan, có xơ hóa nhẹ và xâm nhập viêm nhẹ ở khoảng cửa, có thoái hóa nhẹ đến nặng của tế bào gan. (Ảnh 3.43, 3.44).



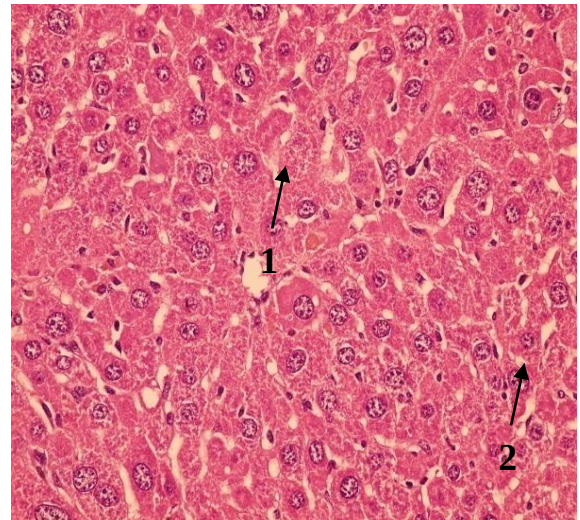
**Ảnh 3.35. Hình thái vi thể gan chuột
lô chứng**
(chuột số 01) (HE x 400)
1. Gan bình thường



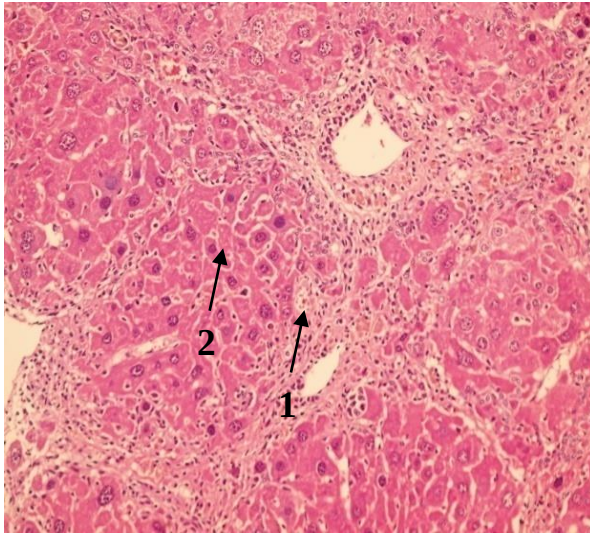
**Ảnh 3.36. Hình thái vi thể gan chuột
lô mô hình**
(chuột số 17) (HE x 400)
1. Tổn thương xơ gan
2. Xâm nhập viêm
3. Thoái hóa tế bào gan mức độ vừa



**Ảnh 3.37. Hình thái vi thể gan chuột
lô mô hình**
(chuột số 19) (HE x 400)
1. Gan tổn thương xơ hóa nhẹ
2. Xâm nhập viêm lan tỏa
3. Thoái hóa tế bào gan mức độ vừa

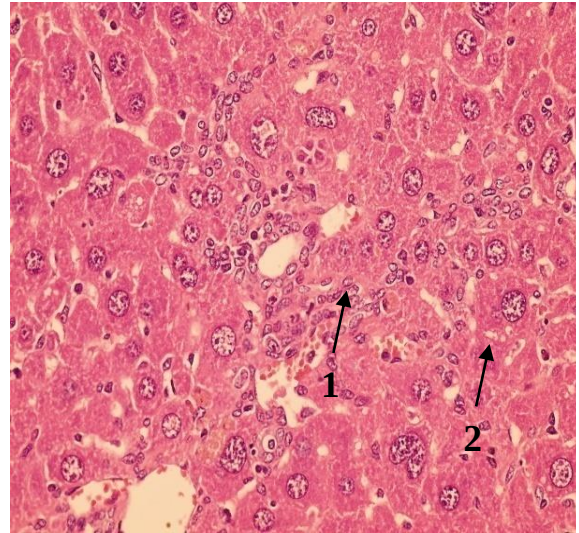


**Ảnh 3.38. Hình thái vi thể gan
chuột lô mô hình**
(chuột số 21) (HE x 400)
1. Phì đại nhân tế bào gan
2. Thoái hóa tế bào gan mức độ nhẹ



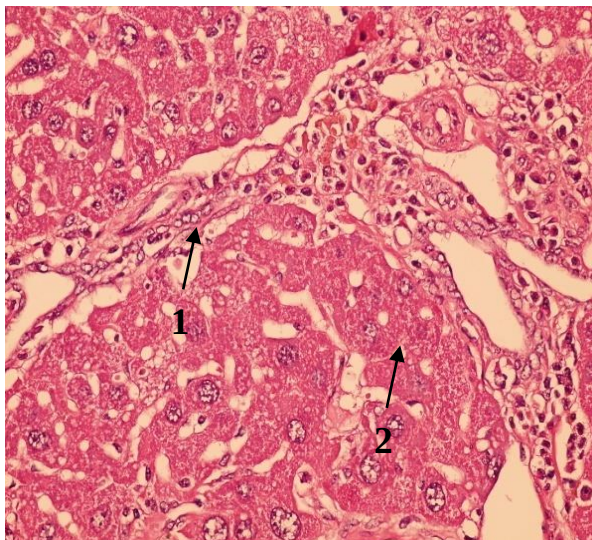
**Ảnh 3.39. Hình thái vi thể gan chuột
lô uống silymarin
(chuột số 24) (HE x 400)**

1. Gan tổn thương xơ hóa nhẹ
2. Thoái hóa tế bào gan mức độ nhẹ



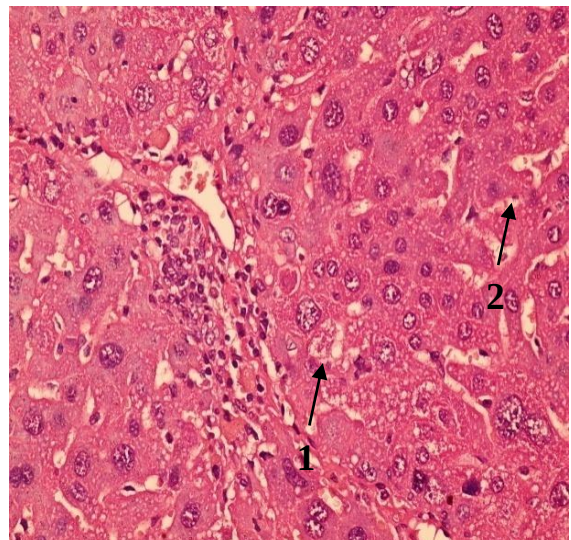
**Ảnh 3.40. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống silymarin
(chuột số 28) (HE x 400)**

1. Xâm nhập viêm nhẹ ở khoảng cửa
2. Thoái hóa tế bào gan mức độ nhẹ



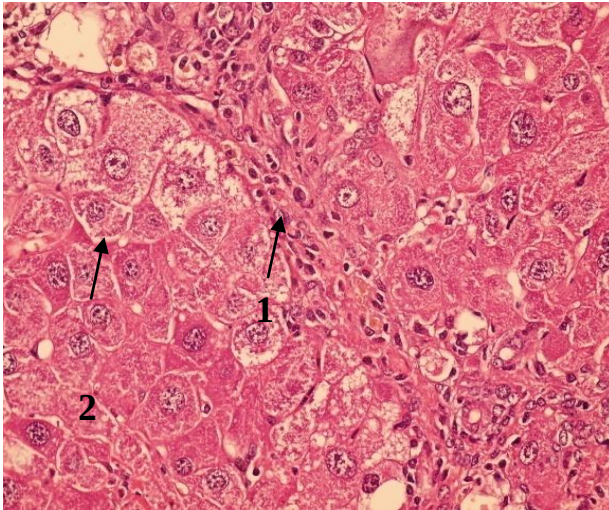
**Ảnh 3.41. Hình thái vi thể gan chuột
lô uống CTP
(chuột số 63) (HE x 400)**

1. Biểu hiện bắt đầu xơ gan cục bộ
2. Thoái hóa tế bào gan mức độ nhẹ



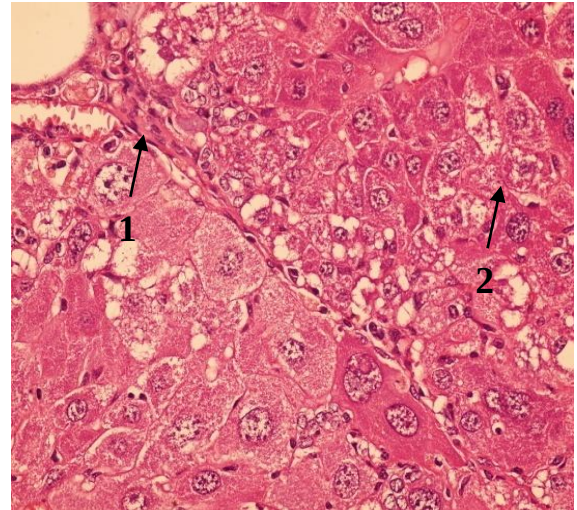
**Ảnh 3.42. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống CTP
(chuột số 75) (HE x 400)**

1. Xơ hóa nhẹ và xâm nhập viêm ở khoảng cửa
2. Thoái hóa tế bào gan mức độ nhẹ



**Ảnh 3.43. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống PĐE
(chuột số 78)(HE x 400)**

1. Xơ hóa nhẹ và xâm nhập viêm
2. Thoái hóa tế bào gan mức độ nhẹ



**Ảnh 3.44. Hình thái vi thể gan
chuột lô uống PĐE
(chuột số 89)(HE x 400)**

1. Xơ hóa nhẹ và xâm nhập viêm
2. Thoái hóa tế bào gan mức độ vừa

3.3. Kết quả một số tác dụng dược lý liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ gan của quả Dứa dại

3.3.1. Kết quả nghiên cứu tác dụng lợi mật của quả Dứa dại

3.3.1.1. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng dịch mật trong túi mật của chuột sau gây độc bằng PAR 2 ngày

Bảng 3.35. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng dịch mật trong túi mật của chuột sau gây độc 2 ngày

Lô thí nghiệm	n	Trọng lượng dịch mật (mg/10g thể trọng). ($\bar{X} \pm SD$)	% tăng so với lô mô hình	Độ lợi mật (%)
Lô 1 (Chứng)	10	$8,76 \pm 1,94$		
Lô 2 (Mô hình)	10	$6,38 \pm 1,67^{**}$		-27,1%
Lô 3 (Actiso)	10	$9,01 \pm 1,30^{\Delta\Delta}$	41,2	2,9%
Lô 4 (CTP liều 1)	10	$7,37 \pm 1,46$	15,5	-15,9%
Lô 5 (CTP liều 2)	10	$7,68 \pm 1,28$	20,4	-12,3%
Lô 6 (PĐE liều 1)	10	$7,16 \pm 1,64$	12,2	-18,3%
Lô 7 (PĐE liều 2)	10	$7,39 \pm 1,18$	15,8	-15,6%

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích: **: $p < 0,01$, p so với lô 1 (chứng).

$\Delta\Delta$: $p < 0,01$, p so với lô 2 (mô hình).

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.35 cho thấy:

- Sau khi gây độc bằng PAR 2 ngày, lô gây mô hình (gây độc nhưng không dùng thuốc) có trọng lượng dịch mật giảm đáng kể so với lô chứng ($p < 0,01$).

- Các lô uống thuốc CTP và PĐE và actiso có độ lợi mật tăng hơn so với lô gây mô hình, không khác biệt với lô chứng, nhưng chỉ có lô uống actiso tăng có ý nghĩa so với lô gây mô hình ($p < 0,01$).

- Không có sự khác biệt về trọng lượng dịch mật giữa 2 lô uống CTP hoặc 2 lô uống PĐE ($p > 0,05$).

3.3.1.2. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng dịch mật trong túi mật của chuột sau gây độc bằng PAR 4 ngày

Bảng 3.36. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến trọng lượng dịch mật trong túi mật của chuột sau gây độc 4 ngày

Lô thí nghiệm	n	Trọng lượng dịch mật (mg/10g thể trọng). ($\bar{X} \pm SD$)	% tăng so với lô mô hình	Độ lợi mật (%)
Lô 1 (Chứng)	10	$8,54 \pm 1,79$		
Lô 8 (Mô hình)	10	$6,98 \pm 1,49^*$		-18,3%
Lô 9 (Actiso)	10	$9,73 \pm 1,61^{\Delta\Delta}$	39,4	13,9%
Lô 10 (CTP liều 1)	10	$11,38 \pm 2,55^{*,\Delta\Delta}$	63,0	33,3%
Lô 11 (CTP liều 2)	10	$11,74 \pm 2,79^{**, \Delta\Delta}$	68,2	37,5%
Lô 12 (PĐE liều 1)	10	$10,49 \pm 1,94^{*, \Delta\Delta}$	50,3	22,8%
Lô 13 (PĐE liều 2)	10	$15,5 \pm 2,87^{***, \Delta\Delta}$	122,1	91,5%

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích: *, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (chứng).

$\Delta\Delta\Delta$: $p < 0,001$, p so với lô 8 (mô hình).

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.36 cho thấy:

- Sau gây độc bằng PAR 4 ngày, trọng lượng dịch mật của lô mô hình đã tăng lên so với thời điểm sau 2 ngày, nhưng vẫn giảm rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,05$).

- Tất cả các lô uống CTP, PĐE và actiso trọng lượng dịch mật đều tăng rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,001$).

- Cả 4 lô uống 2 liều mẫu thử CTP và PĐE đều có trọng lượng dịch mật tăng rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,05$ đến $p < 0,001$). Độ lợi mật của các lô dùng thuốc thử từ 22,8% đến 91,5%.

- Đặc biệt lô 13 (uống PĐE liều cao) có trọng lượng dịch mật tăng cao nhất, cao hơn rõ rệt so với lô uống actiso ($p < 0,001$).

3.3.2. Đánh giá tác dụng chống viêm cấp của CTP và PĐE

3.3.2.1. Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin

Trên mô hình gây viêm cấp thực nghiệm bằng carrageenin, đo thể tích chân chuột trước khi gây viêm và tại một số thời điểm sau khi gây viêm, tính được độ tăng thể tích chân chuột như sau:

Bảng 3.37. Độ tăng thể tích chân chuột sau khi gây viêm

Lô nghiên cứu	n	Độ tăng thể tích chân chuột ($\Delta V\%$)($\bar{X} \pm SD$)			
		Sau 2h	Sau 4h	Sau 6h	Sau 24h
Lô 1 (Chứng)	10	24,11 $\pm$ 9,07	47,94 $\pm$ 13,22	43,86 $\pm$ 13,61	26,49 $\pm$ 9,97
Lô 2 (aspirin)	10	12,08 $\pm$ 4,38**	34,48 $\pm$ 8,59*	35,07 $\pm$ 8,46	23,22 $\pm$ 7,79
Lô 3 (CTP liều 1)	10	22,38 $\pm$ 8,07 $\Delta\Delta$	44,86 $\pm$ 11,16 Δ	41,90 $\pm$ 12,47	22,34 $\pm$ 6,93
Lô 4 (CTP liều 2)	10	14,80 $\pm$ 4,83*	36,41 $\pm$ 8,12*	39,69 $\pm$ 17,27	22,76 $\pm$ 11,19
Lô 5 (PĐE liều 1)	10	17,40 $\pm$ 4,19*, Δ	38,17 $\pm$ 5,5*	39,89 $\pm$ 8,92	24,57 $\pm$ 9,33
Lô 6 (PĐE liều 2)	10	15,65 $\pm$ 4,82*	32,11 $\pm$ 10,05**	34,76 $\pm$ 11,89	18,45 $\pm$ 8,11

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích: *, **: $p < 0,05$, $p < 0,01$, p so với lô 1 (chứng).

Δ , $\Delta\Delta$: $p < 0,05$, $p < 0,01$, p so với lô 2 (aspirin).

Bảng 3.38. Mức độ ức chế phản ứng phù của CTP và PĐE Dứa dại

Lô nghiên cứu	n	Mức độ ức chế phản ứng phù (I %) so với lô chứng			
		Sau 2 giờ	Sau 4 giờ	Sau 6 giờ	Sau 24 giờ
Lô 2 (aspirin)	10	49,9	28,08	20,04	12,32
Lô 3 (CTP liều 1)	10	7,15	6,42	4,48	15,65
Lô 4 (CTP liều 2)	10	38,60	24,06	9,52	14,06
Lô 5 (PĐE liều 1)	10	27,82	20,39	9,05	7,22
Lô 6 (PĐE liều 2)	10	35,09	33,02	20,74	30,34

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.37 và 3.38 cho thấy:

- Tại thời điểm 2 giờ sau khi gây viêm, lô uống aspirin, lô CTP liều 2 và hai lô uống PĐE đều có tác dụng làm giảm rõ rệt mức độ tăng thể tích chân chuột so với lô 1, trong đó lô uống aspirin thể hiện tác dụng rõ nhất (ức chế được 49,9 % phản ứng phù viêm). Lô uống CTP liều 1 có xu hướng làm giảm mức độ tăng thể tích chân chuột, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

- Tại thời điểm 4 giờ sau khi gây viêm, trừ lô uống CTP liều 1 (liều thấp) có tác dụng ức chế phản ứng phù yếu, tất cả các lô uống thuốc thử và thuốc chuẩn còn lại đều có tác dụng làm giảm phản ứng phù, trong đó lô uống PĐE liều 2 thể hiện tác dụng tốt nhất (ức chế được 33,02% phản ứng phù viêm).

- Tại thời điểm 6 giờ và 24 giờ sau khi gây viêm, mức độ tăng thể tích chân chuột ở tất cả các lô uống thuốc thử và thuốc chuẩn không có sự khác biệt so với lô chứng ($p > 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy CTP liều cao (liều 2) và 2 liều PĐE có tác dụng chống viêm cấp rõ rệt trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin. Riêng lô uống CTP liều 1 chưa thể hiện tác dụng chống viêm cấp trên mô hình này.

3.3.2.2. *Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây viêm màng bụng bằng carrageenin*

Bảng 3.39. Ảnh hưởng của CTP và PĐE lên thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu và hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm

Lô nghiên cứu	n	Thể tích dịch rỉ viêm (ml)	Số lượng bạch cầu (G/l)	Hàm lượng protein (mg/dl)
Lô 1 (Mô hình)	10	3,45 ± 0,98	16,06 ± 5,79	4,25 ± 0,30
Lô 2 (Aspirin)	10	2,05 ± 0,68***	10,01 ± 3,11**	3,09 ± 0,40***
Lô 3 (CTP liều 1)	10	2,80 ± 1,17	14,48 ± 1,56 ^{ΔΔ}	3,98 ± 0,29 ^{ΔΔΔ}
Lô 4 (CTP liều 2)	10	2,51 ± 0,28*	8,58 ± 2,72***	3,65 ± 0,46***, ^Δ
Lô 5 (PĐE liều 1)	10	2,29 ± 0,61**, ^{ΔΔ}	10,80 ± 1,79*	3,83 ± 0,47*, ^{ΔΔ}
Lô 6 (PĐE liều 2)	10	2,23 ± 0,73**	10,52 ± 3,73*	3,88 ± 0,34*, ^{ΔΔΔ}

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

*Chú thích: *, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 1 (mô hình).*

^Δ, ^{ΔΔ}, ^{ΔΔΔ}: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô 2 (aspirin).

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.39 cho thấy:

- Aspirin liều 200 mg/kg có tác dụng làm giảm rõ rệt thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu và hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm so với lô mô hình ($p < 0,001$ và $p < 0,01$).

- CTP liều 2 và PĐE cả 2 liều uống trong 4 ngày liên tục làm giảm rõ rệt thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu và hàm lượng protein so với lô chứng ($p < 0,05$ và $p < 0,001$). CTP liều thấp (liều 1) chưa thể hiện tác dụng chống

viêm cấp trên mô hình này.

3.3.3. Tác dụng chống viêm mạn của CTP và PĐE trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng amiant

Trên mô hình gây viêm mạn thực nghiệm bằng cây amiant, xác định trọng lượng khối u hạt của các lô chuột, kết quả thu được như sau:

Bảng 3.40. Trọng lượng trung bình u hạt thực nghiệm

Lô nghiên cứu	n	Trọng lượng u hạt (mg) ($\bar{X} \pm SD$)	Tỉ lệ giảm trọng lượng u hạt (%)
Lô 1 (mô hình)	10	20,0 $\pm$ 6,5	
Lô 2 (Methyl prednisolon)	10	13,3 $\pm$ 4,3*	33,5
Lô 3 (CTP liều 1)	10	16,3 $\pm$ 5,1	18,5
Lô 4 (CTP liều 2)	10	15,0 $\pm$ 2,7*	24,5
Lô 5 (PĐE liều 1)	10	15,7 $\pm$ 4,3	21,5
Lô 6 (PĐE liều 2)	10	15,2 $\pm$ 2,6*	24,0

Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student.

Chú thích: *: $p < 0,05$, p so với lô 1 (mô hình).

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.40 cho thấy:

- Trọng lượng u hạt ở lô uống methylprednisolon và 2 lô uống mẫu thử CTP liều cao và PĐE liều cao đều giảm rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,05$). Hai lô uống CTP và PĐE liều thấp mặc dù có giảm trọng lượng u hạt so với lô mô hình, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

- Không có sự khác biệt rõ rệt về trọng lượng u hạt giữa các lô uống mẫu thử và với methylprednisolon.

3.3.4. Tác dụng chống oxy hóa in vitro của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại

3.3.4.1. Kết quả dọn gốc tự do DPPH

Bảng 3.41. Khả năng dọn gốc tự do DPPH của CTP và PĐE

Khả năng dọn gốc tự do DPPH (%)							
Nồng độ (µg/ml) Mẫu thử	400	200	100	50	25	12,5	IC ₅₀ (µg/ml)
CTP	55,5	33,8	18,1	10,7	8,0		>200
PĐE		98,8	92,6	69,0	41,2	25,5	29,1

Khả năng dọn gốc tự do DPPH của quercetin

Nồng độ (µg/ml)	20	10	5	2,5	1,25	IC ₅₀ (µg/ml)
Khả năng dọn gốc tự do (%)	95,0	90,0	88,4	60,3	21,2	1,88

3.4.4.2. Kết quả dọn gốc superoxid

Bảng 3.42. Kết quả dọn gốc tự do anion superoxid của của CTP và PĐE

Khả năng dọn gốc tự do anionsuperoxid (%)							
Nồng độ (µg/ml) Mẫu thử	400	200	100	50	25	12,5	IC ₅₀ (µg/ml)
CTP	3	2	0				> 400
PĐE		98,6	86,7	71,8	53,5	30,1	23,8

Khả năng dọn gốc tự do anion superoxid của quercetin

Nồng độ (µg/ml)	20	10	5	2,5	1,25	IC ₅₀ (µg/ml)
Khả năng dọn gốc tự do (%)	94,0	87,7	70,1	40,8	28,3	2,6

Nhận xét: Kết quả tại bảng 3.41 và 3.42 cho thấy:

- Cao phân đoạn ethyl acetat của quả Dứa dại có tác dụng chống oxy hóa *in vitro* trên cả hai mô hình dọn gốc tự do DPPH và dọn gốc tự do $O_2^{\cdot-}$ với giá trị IC_{50} lần lượt là 29,1 và 23,8 $\mu g/ml$. Cao toàn phần không có tác dụng, hoặc có tác dụng yếu trên cả 2 mô hình này.

- Hợp chất quercetin thường được sử dụng làm chất đối chứng dương trong các thử nghiệm chống oxy hóa *in vitro* có giá trị IC_{50} trên 02 mô hình thử nghiệm dọn gốc tự do bằng DPPH và dọn gốc tự do $O_2^{\cdot-}$ lần lượt là 1,88 và 2,6 $\mu g/ml$.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

Hiện nay, với quan điểm kết hợp Y học hiện đại và Y học cổ truyền trong điều trị bệnh, các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu đã và đang được đưa vào sử dụng rộng rãi tại Việt Nam. Nước ta có nguồn dược liệu phong phú, nhân dân ta có kinh nghiệm sử dụng thuốc từ dược liệu lâu đời. Nhiều vị thuốc đã được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian để điều trị nhiều bệnh, trong đó có quả Dứa dại. Quả Dứa dại có thể được dùng riêng hoặc kết hợp với một số thảo dược khác để điều trị viêm gan, xơ gan [8]. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu về Dứa dại, nhưng ở nước ta, mặc dù quả Dứa dại được dùng khá phổ biến, nhưng cho đến nay chưa có nghiên cứu nào đánh giá về tác dụng điều trị bệnh gan và độc tính của quả Dứa dại trồng ở Việt Nam. Vậy quả Dứa dại có tác dụng thật sự trong điều trị bệnh viêm gan, xơ gan như kinh nghiệm dân gian hay không? Đề tài luận án được tiến hành để chứng minh cơ sở khoa học của việc sử dụng Dứa dại trong dân gian, hướng tới mục tiêu có thể đưa quả Dứa dại vào sản xuất thuốc, góp phần đáp ứng yêu cầu điều trị các bệnh về gan hiện nay.

Theo kinh nghiệm dân gian, để điều trị các bệnh về gan, quả Dứa dại được dùng với liều khoảng 30 g dược liệu khô/ngày, tương đương 0,6 g/kg/ngày (tính trung bình người nặng 50 kg). Ngoại suy liều từ người sang động vật thực nghiệm, chuột nhắt tính theo hệ số 12, chuột cống tính theo hệ số 7 [107], liều dùng có hiệu quả tương đương trên người của chuột nhắt là 7,2 g dược liệu/kg, chuột cống là 4,2 g dược liệu/kg. Đây là cơ sở để tính liều dùng trên động vật thực nghiệm.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 2 mẫu thử chiết xuất từ quả Dứa dại là cao toàn phần (CTP) và phân đoạn ethyl acetat (PĐE). Lý do chọn phân đoạn PĐE để nghiên cứu là do đây là phân đoạn hoạt chất chính, giàu polyphenol trong quả Dứa dại. Để có cơ sở rõ hơn cho việc lựa chọn phân đoạn này, chúng tôi đã nghiên cứu sàng lọc tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của các

cao phân đoạn trong quy trình chiết xuất (phân đoạn ethyl acetat, phân đoạn Hx, phân đoạn BuOH, phân đoạn H₂O) (Hình 2.2), kết quả cho thấy phân đoạn PDE có tác dụng chống oxy hóa rõ rệt, hơn hẳn các phân đoạn khác.

Bên cạnh chọn mẫu nghiên cứu là CTP, chúng tôi chọn phân đoạn PDE để nghiên cứu với hy vọng nếu nhóm hoạt chất này là thành phần chủ yếu có tác dụng điều trị viêm gan, xơ gan trong quả Dứa dại thì có thể dùng thành phần này để sản xuất thuốc, sẽ tạo được dạng thuốc tinh khiết hơn, dễ kiểm soát chất lượng, liều dùng chính xác và thuận tiện hơn khi sử dụng.

4.1. Độc tính của CTP và PDE chiết xuất từ quả Dứa dại

Thuốc muốn được sử dụng phải đảm bảo an toàn và có hiệu lực. Một thuốc dù có hiệu lực mạnh đến đâu, nhưng nếu không đảm bảo an toàn thì cũng không được sử dụng. Để chứng minh thuốc có tính an toàn hay không, phải nghiên cứu độc tính của thuốc. Đây là bước rất quan trọng trong nghiên cứu phát triển thuốc. Theo hướng dẫn của WHO, tất cả các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu hay hóa chất đều phải đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn trên động vật trước khi đưa vào thử nghiệm trên người [100]. Vì vậy nghiên cứu này đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của CTP và PDE chiết xuất từ quả Dứa dại theo hướng dẫn của WHO và Cục Khoa học, Công nghệ và Đào tạo (Bộ Y tế) [100],[101].

4.1.1. Độc tính cấp của CTP và PDE

Xác định độc tính cấp và liều chết 50% để đánh giá mức độ độc của mẫu thử và có cơ sở chọn liều thử tác dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Độc tính cấp cung cấp các thông tin về triệu chứng, thời gian, mức độ ngộ độc của động vật thực nghiệm sau khi dùng mẫu thử đơn liều hoặc đa liều trong 24 giờ, thường được tiến hành theo đường dùng giống với đường dùng trong lâm sàng.

Khi thử độc tính cấp cần xác định liều an toàn, liều dung nạp tối đa, liều gây độc tính có thể quan sát được, liều thấp nhất có thể gây chết động vật thực nghiệm và LD₅₀ (liều gây chết 50% số động vật thực nghiệm) nếu có [102].

** Độc tính cấp của CTP:*

Cho chuột nhắt trắng uống mẫu thử CTP theo liều tăng dần từ liều tương đương với 207 g dược liệu/kg/24 giờ (*gấp 28,75 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) đến liều cao nhất có thể được (nồng độ và thể tích tối đa cho phép) là liều tương đương với 1035 g dược liệu/kg/24 giờ (*gấp 143,75 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) nhưng không thấy dấu hiệu bất thường nào trên chuột và không có chuột nào chết.

** Độc tính cấp của PĐE:*

Cho chuột nhắt trắng uống mẫu PĐE theo liều tăng dần từ liều tương đương với 1350 g dược liệu/kg/24 giờ (*gấp 187,5 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) đến liều cao nhất có thể được (nồng độ và thể tích tối đa cho phép) là liều tương đương với 6750 g dược liệu/kg/24 giờ (*gấp 937,5 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) nhưng không thấy dấu hiệu bất thường nào trên chuột và không có chuột nào chết.

Mặc dù chuột nhắt trắng đã được uống CTP hoặc PĐE đến liều rất cao (liều tương đương với 1035 g và liều tương đương với 6750 g dược liệu/kg/24 giờ), nhưng với mức liều này không có chuột nào chết và không quan sát thấy biểu hiện ngộ độc ở chuột. Vì vậy, chưa xác định được độc tính cấp và chưa tính được LD₅₀ của mẫu CTP và PĐE trên chuột nhắt trắng theo đường uống.

Sama Raju và cộng sự (2011) đã tiến hành nghiên cứu độc tính cấp của chiết xuất methanol lá Dứa dại trên chuột nhắt trắng theo hướng dẫn của OECD 2011. Kết quả cho thấy với liều 2,0 g/ kg căn khô cao chiết lá Dứa dại trong methanol không thể hiện độc tính cấp trên chuột nhắt trắng theo đường uống [98].

Sama Venkatesh và cộng sự khi nghiên cứu về độc tính của cao chiết ethanolic từ rễ cây Dứa dại cho thấy khi cho chuột nhắt trắng uống với các liều khác nhau (0,5, 1,0, 2,0 và 3,0 g/kg thể trọng), quan sát tại các thời điểm 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 24 giờ và 48 giờ không có chuột nào chết, không có biểu hiện nào bất thường ở chuột [99].

Mẫu CTP đã cho chuột uống đến liều tương đương với 1035 g được liệu/kg/24 giờ (*gấp 143,75 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) và mẫu PĐE đã cho chuột uống đến liều tương đương với 6750 g được liệu/kg/24 giờ (*gấp 937,5 lần liều có tác dụng tương đương trên người*) nhưng không thấy dấu hiệu bất thường nào ở chuột và không có chuột nào chết. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy 2 mẫu thử này, đặc biệt mẫu PĐE có độ an toàn rất cao [100].

4.1.2. Độ tính bán trường diễn của PĐE

Trong quá trình chiết xuất các cao chiết từ quả Dứa dại, mẫu PĐE thu được tinh khiết hơn mẫu CTP. Khi đánh giá độc tính cấp của 2 mẫu CTP và PĐE, liều cao nhất của mẫu PĐE đã cho chuột uống được gấp đến 6,5 lần mẫu CTP, tính theo lượng được liệu khô (6750g được liệu/kg/24 giờ so với 1035g được liệu/kg/24 giờ), nhưng cũng chưa có biểu hiện độc. Qua nghiên cứu về tác dụng chống viêm gan, xơ gan và một số tác dụng dược lý liên quan, kết quả cho thấy mẫu PĐE có xu hướng thể hiện tác dụng tốt hơn CTP. Nếu mẫu PĐE được nghiên cứu phát triển thành thuốc sử dụng trong lâm sàng thì sẽ có nhiều ưu điểm hơn so với mẫu CTP. Vì lý do đó, chúng tôi định hướng sẽ lựa chọn phân đoạn hoạt chất PĐE để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo trên lâm sàng, vì vậy độ tính bán trường diễn của mẫu PĐE đã được đánh giá trên chuột cống trắng theo đường uống. Nghiên cứu được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và của Bộ Y tế về “Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y và thuốc từ dược liệu” [100],[101].

Chuột cống trắng được uống mẫu PĐE với 2 mức liều: liều tương đương 4,2 g được liệu/kg/ngày (*liều có tác dụng tương đương trên người*) và một liều cao gấp 3 lần (12,6 g được liệu/kg/ngày), uống liên tục trong 8 tuần. Theo dõi ảnh hưởng của mẫu thử đến các chỉ số về tình trạng chung, sự thay đổi trọng lượng cơ thể, sự tổn thương gan, chức năng của một số cơ quan quan trọng trong cơ thể như cơ quan tạo máu, gan, thận và mô bệnh học các cơ quan của chuột ở các thời điểm sau uống mẫu thử 4 tuần và 8 tuần. Sau khi

ngừng uống PĐE 2 tuần, các chỉ số trên được đánh giá lại để phát hiện độc tính chậm của mẫu thử hoặc khả năng phục hồi (nếu có độc tính). Nếu thuốc có độc tính bán trường diễn, sẽ ảnh hưởng tới tình trạng toàn thân cũng như chức năng, hình thái của các cơ quan trong cơ thể chuột. Chúng tôi đã ghi nhận được các kết quả nghiên cứu như sau:

4.1.2.1. Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của chuột

Trong 4 tuần đầu uống mẫu thử, theo dõi tình trạng chung của chuột cống trắng ở cả 3 lô nghiên cứu thấy tất cả các chuột đều ăn uống, hoạt động bình thường, lông mượt, mắt sáng, không có biểu hiện của tình trạng nhiễm độc. Điều này phù hợp với sự gia tăng trọng lượng chuột ở các lô (*Bảng 3.1*). Sau 4 tuần uống mẫu PĐE, trọng lượng chuột ở cả 3 lô (2 lô uống PĐE và lô chứng) đều tăng rõ rệt so với trước khi nghiên cứu ($p < 0,01$ và $p < 0,001$), không có sự khác biệt về trọng lượng chuột giữa các lô ($p > 0,05$). Điều đó chứng tỏ PĐE không ảnh hưởng đến tình trạng chung và sự gia tăng trọng lượng chuột sau 4 tuần uống mẫu thử.

Tuy nhiên, ở thời điểm từ tuần thứ 5 đến tuần thứ 8 uống PĐE, chuột ở cả 3 lô đều ăn kém hơn, ít hoạt động hơn, phân lỏng và có hiện tượng giảm cân so với thời điểm sau 4 tuần uống mẫu thử. Không có sự khác biệt về trọng lượng chuột giữa lô chứng và 2 lô uống PĐE. Tình trạng chung của 3 lô chuột giống nhau, tình trạng giảm trọng lượng tương đương nhau giữa 2 lô uống PĐE và lô chứng, chứng tỏ không phải hoạt chất có trong PĐE gây ra tình trạng này. Theo chúng tôi, chuột ở 2 lô trị uống PĐE pha trong dầu olive (do PĐE không tan hoàn toàn trong nước nên phải pha trong dầu), chuột lô chứng uống dung môi pha mẫu thử PĐE là dầu olive. Cả 3 lô cùng uống dầu trong thời gian dài dẫn đến tình trạng chán ăn, đi ngoài phân lỏng, làm giảm trọng lượng chuột ở cả 3 lô.

Sau 2 tuần ngừng uống mẫu thử, tình trạng chung của chuột ở cả 3 lô lại dần trở về bình thường. Đa số chuột ăn uống tốt hơn, hoạt động nhanh nhẹn, hết tình trạng phân lỏng. Trọng lượng chuột ở lô chứng và lô trị 1 tăng lên so

với thời điểm sau 8 tuần uống mẫu thử. Chuột ở lô trị 2 trọng lượng cơ thể không tăng so với thời điểm sau 8 tuần uống mẫu thử, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô chứng và lô trị 1 ($p > 0,05$).

4.1.2.2. Ảnh hưởng của PDE đến cơ quan tạo máu

Máu là tổ chức lỏng điều hòa toàn bộ các hoạt động của cơ thể nhờ rất nhiều các chức năng khác nhau, giữ vai trò cực kỳ quan trọng trong sự sống [108]. Số lượng và chất lượng các tế bào máu phản ánh tình trạng của cơ quan tạo máu. Hệ thống tạo máu là một trong những đích nhạy cảm nhất với các chất độc và là chỉ số quan trọng đánh giá tình trạng sinh lý và bệnh lý ở người và động vật [100]. Nếu thuốc nghiên cứu gây ra độc tính với cơ quan tạo máu sẽ làm thay đổi số lượng và chất lượng các tế bào máu [22].

Để đánh giá ảnh hưởng của PDE đến chức phận của cơ quan tạo máu, các chỉ số về số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu trong máu chuột cống trắng thực nghiệm đã được theo dõi.

Huyết sắc tố trong hồng cầu có nhiệm vụ quan trọng là vận chuyển oxy đến các cơ quan trong cơ thể và lấy CO_2 ra khỏi cơ thể [109]. Bên cạnh xác định số lượng hồng cầu, định lượng huyết sắc tố để đánh giá chức năng của hồng cầu. Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) là tỷ lệ giữa hematocrit và số lượng hồng cầu. Các chỉ số về hồng cầu là chỉ số có ích để chẩn đoán và đánh giá mức độ thiếu máu ở động vật.

Kết quả nghiên cứu ở các bảng từ 3.2 đến 3.4 cho thấy sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống, số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố và thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột ở cả lô trị 1 (uống PDE liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày) và lô trị 2 (uống PDE liều gấp 3 lần lô trị 1) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p > 0,05$). Như vậy, mẫu thử PDE ở hai mức liều đã dùng, uống liên tục trong 8 tuần không gây

ảnh hưởng tới số lượng, kích thước và chức năng hồng cầu, không gây tình trạng thiếu máu hồng cầu nhỏ hoặc thiếu máu hồng cầu to. Sau 2 tuần ngừng uống PDE, xét nghiệm lại các chỉ số về hồng cầu đều thấy không có sự khác biệt so với lô chứng, chứng tỏ PDE không gây độc tính muộn với hồng cầu sau 2 tuần ngừng uống.

Trong xét nghiệm huyết học, các chỉ số về bạch cầu bao gồm số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu là những chỉ số quan trọng. Chức năng chính của bạch cầu là thực bào và sản xuất gamma- globulin, chống lại các tác nhân lạ đi vào cơ thể. Trong quá trình bảo vệ cơ thể, mỗi loại bạch cầu thực hiện những chức năng khác nhau [109]. Số lượng bạch cầu và công thức bạch cầu ngoại vi gián tiếp phản ánh chức năng bảo vệ cơ thể, đồng thời phản ánh chức phận của cơ quan tạo máu [22].

Kết quả ở bảng 3.5 và 3.6 cho thấy sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử PDE và sau 2 tuần ngừng uống, số lượng và công thức bạch cầu ở cả lô trị 1 (*uống PDE liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày*) và lô trị 2 (*uống PDE liều gấp 3 lần lô trị 1*) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử ($p>0,05$).

Kết quả này chứng tỏ mẫu PDE chiết xuất từ quả Dứa dại với hai liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày và tương đương 12,6 g dược liệu/kg/ngày, uống liên tục trong 8 tuần không làm ảnh hưởng tới chức phận sinh bạch cầu của cơ quan tạo máu, không làm thay đổi tỷ lệ % các dòng bạch cầu trong máu chuột, gián tiếp cho thấy không ảnh hưởng đến chức năng bảo vệ cơ thể.

Tiểu cầu có nhiệm vụ tham gia vào cơ chế cầm máu và đông máu. Thuốc làm tăng hoặc giảm số lượng tiểu cầu có thể gây ảnh hưởng tới quá trình này. Đồng thời, số lượng tiểu cầu cũng đánh giá một phần tác động của thuốc lên chức năng tạo máu [22],[109].

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.7 cũng cho thấy uống mẫu PDE trong 8 tuần liên tục không làm ảnh hưởng tới số lượng tiểu cầu trong máu chuột.

Điều này chứng tỏ PĐE không gây ảnh hưởng đến quá trình sinh tiêu cầu của cơ quan tạo máu chuột.

Từ các kết quả nghiên cứu trên có thể kết luận rằng mẫu thử PĐE ở hai mức liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày và 12,6 g dược liệu/kg/ngày, uống liên tục trong 8 tuần không làm thay đổi các chỉ số huyết học ở máu ngoại vi của chuột. Sau 2 tuần ngừng uống PĐE, xét nghiệm lại các chỉ số huyết học cũng không thấy có sự khác biệt so với lô chứng, chứng tỏ PĐE không gây ảnh hưởng xấu đến cơ quan tạo máu trên động vật thực nghiệm.

4.1.2.3. Ảnh hưởng của PĐE đến các chỉ số đánh giá mức độ tổn thương gan, cấu trúc và chức năng gan.

Gan là tạng lớn của cơ thể, đảm nhận rất nhiều chức năng quan trọng và phức tạp của cơ thể. Gan còn là nơi chuyển hóa và thải trừ thuốc. Chính vì vậy, khi đưa thuốc từ bên ngoài vào trong cơ thể với mục đích chữa bệnh, chính thuốc cũng có thể là tác nhân gây độc với gan, gây tổn thương gan. Vì vậy, trong các nghiên cứu đánh giá độc tính của thuốc, rất cần thiết phải nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc tới cấu trúc và chức năng của gan.

Để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan, thường định lượng nồng độ các enzym có nguồn gốc tại gan trong huyết thanh. Sự tăng nồng độ các enzym này thường gắn liền với độc tính của thuốc do sự hủy hoại tế bào gan. ALT là enzym được tìm thấy nhiều nhất ở gan, khu trú trong bào tương của tế bào nhu mô gan. Khi tổn thương hủy hoại tế bào gan, thậm chí chỉ cần thay đổi tính thấm của màng tế bào gan, hoạt độ ALT đã tăng cao trong máu. Hoạt độ ALT thường được sử dụng như dấu ấn sinh học đặc hiệu cho các bệnh ở gan. Khác với ALT, AST không những có ở gan mà còn có ở các cơ quan khác như cơ tim, cơ vân, thận, não... Trong lâm sàng, hoạt độ AST thường được sử dụng như dấu ấn sinh học để chẩn đoán nhồi máu cơ tim cấp. Trong tế bào gan, AST có chủ yếu trong ty thể, chỉ 1/3 khi trú ở bào tương của tế bào. Khi tổn thương tế bào gan ở mức độ dưới tế bào, AST trong ty thể

mới được giải phóng ra ngoài [29]. Xét nghiệm hoạt độ ALT đặc hiệu cho tổn thương tế bào gan hơn so với AST. Khi có hội chứng hủy hoại tế bào gan, ALT và AST thường tăng rất cao, $> 10 - 100$ lần, do đó có giá trị trong chẩn đoán viêm gan cấp.

Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của PĐE ở bảng 3.8 và bảng 3.9 cho thấy hoạt độ hai enzym này không tăng trong huyết thanh ở cả ba thời điểm sau 4 tuần, 8 tuần uống PĐE và sau 2 tuần ngừng uống so với lô chứng và so với trước uống thuốc, chứng tỏ 2 liều PĐE đã dùng uống liên tục trong 8 tuần không gây tổn thương tế bào gan của chuột và không gây độc tính chậm trên gan sau 2 tuần đã ngừng thuốc.

Kết quả này tương ứng với quan sát đại thể và vi thể gan chuột.

Quan sát đại thể các cơ quan, trong đó có gan của tất cả các chuột thực nghiệm (cả lô chứng và 2 lô trị) đều không thấy có thay đổi bệnh lý nào của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột sau 8 tuần uống PĐE và sau 2 tuần ngừng uống.

Hình ảnh vi thể gan không có sự khác biệt rõ rệt giữa lô chứng và các lô uống PĐE. Quan sát ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan của 30% số chuột ở mỗi lô tại 2 thời điểm (sau 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống), kết quả ở bảng 3.14 và 3.16 cho thấy ở cả lô chứng và các lô uống PĐE đều có mẫu bệnh phẩm gan có hình ảnh thoái hóa nhẹ đến vừa tế bào gan. Ở một số nghiên cứu khác, chúng tôi cũng đã thấy chuột nhóm chứng có tổn thương thoái hóa ở gan tương tự như vậy. Ngoài ra không quan sát thấy sự thay đổi nào khác ở gan của tất cả các mẫu bệnh phẩm của lô chứng và lô trị như không có tình trạng xâm nhập viêm, hoại tử, xơ hóa ...

Tại gan, khi các nguyên nhân gây tổn thương tấn công, các tế bào gan có thể bị ảnh hưởng nặng hoặc nhẹ tùy thuộc vào loại nguyên nhân và thời gian tiếp xúc với nguyên nhân tổn thương. Sự tổn thương của tế bào nói chung và tế bào gan nói riêng được chia làm 3 mức độ khác nhau là tổn thương có khả năng hồi phục (thoái hóa), tổn thương có nguy cơ gây chết tế bào và tổn thương

không có khả năng hồi phục (hoại tử) [9]. Trong các tổn thương tế bào nói trên, tổn thương thoái hóa là tổn thương ban đầu và nhẹ nhất của tế bào, các tế bào có thể tự phục hồi lại được tổn thương này để trở về tình trạng bình thường. Sự thoái hóa của tế bào có thể là thoái hóa hạt, thoái hóa nước và thoái hóa mỡ. Một đặc điểm rất quan trọng của sự thoái hóa tế bào là bình thường tế bào già nua trước khi hoại tử và chết cũng trải qua giai đoạn thoái hóa [9].

Trong phần kết quả nghiên cứu, sự thoái hóa nhẹ của tế bào gan chuột cống trắng ở lô chứng sinh học đã phản ánh rõ đặc điểm sinh lý này của đời sống tế bào. Chính vì vậy, mặc dù có tình trạng thoái hóa của tế bào gan chuột cống trắng thực nghiệm sau khi uống mẫu thử PDE ở cả liều thấp và liều cao nhưng sự thoái hóa tế bào này không có sự khác biệt rõ rệt so với lô chứng. Kết hợp với kết quả xét nghiệm đánh giá tổn thương tế bào gan, hoạt độ ALT và AST ở 2 lô uống PDE đều ở mức bình thường, không khác biệt so với lô chứng, nên theo chúng tôi, chưa có cơ sở để cho rằng PDE gây tổn thương gan chuột thông qua xét nghiệm vi thể gan chuột tại nghiên cứu độc tính bán trường diễn.

Gan là cơ quan có nhiều chức năng quan trọng trong tổng hợp, chuyển hóa, bài tiết các chất trong cơ thể như chuyển hóa protid, lipid, bài tiết mật,...

Một trong những chức năng quan trọng của gan là chức năng tiết mật. Gan tạo ra mật, bài tiết mật vào tá tràng, tham gia vào quá trình tiêu hóa [22],[29]. Ngoài ra gan còn đào thải rất nhiều chất độc cũng như các chất cặn bã của các quá trình chuyển hóa qua việc bài xuất mật xuống ruột rồi theo phân ra ngoài. Để đánh giá chức năng tạo và bài tiết mật của gan, người ta thường dựa vào chỉ số xét nghiệm bilirubin trong máu. Bilirubin là chất màu chủ yếu trong mật, có nguồn gốc từ việc thoái hóa các tế bào hồng cầu. Bilirubin được gắn với albumin và chuyển tới gan để thoái hóa tiếp. Có khoảng 200 - 300 mg bilirubin liên hợp được sản xuất mỗi ngày ở gan [1].

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.10 cho thấy sau 4 tuần, 8 tuần uống PĐE và sau 2 tuần ngừng uống, nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột ở cả lô trị 1 (*uống PĐE liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người*) và lô trị 2 (*uống PĐE liều gấp 3 lần lô trị 1*) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử. Điều đó chứng tỏ PĐE ở 2 liều đã dùng không ảnh hưởng đến khả năng bài tiết mật của gan. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả PĐE không làm ảnh hưởng đến số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột, đồng thời không gây hiện tượng ứ mật do hủy hoại gan hoặc viêm tắc đường dẫn mật.

Gan có vai trò quan trọng trong chuyển hóa các chất trong cơ thể. Hầu như tất cả các protein đều được tổng hợp tại gan, ngoại trừ các globulin miễn dịch và hemoglobin ở người trưởng thành. Một trong những protein quan trọng nhất chỉ được tổng hợp tại gan là albumin. Gan tổng hợp toàn bộ albumin huyết thanh, đây là protein máu chủ yếu có nhiều chức năng sinh lý quan trọng trong cơ thể [1]. Vì vậy định lượng albumin trong máu là chỉ số đánh giá chức năng tổng hợp protein của gan.

Trong cơ thể, nhiều cơ quan có thể tổng hợp lipid, đặc biệt là mô mỡ có quá trình tổng hợp lipid mạnh. Tuy nhiên tổng hợp lipid tại gan có ý nghĩa rất quan trọng. Cholesterol là một thành phần của mật, được gan tổng hợp, ester hóa và thải trừ ra ngoài. Vì vậy, định lượng cholesterol có thể đánh giá được một phần chức năng chuyển hóa lipid của gan.

Trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn của mẫu PĐE, chúng tôi tiến hành định lượng nồng độ albumin và cholesterol toàn phần trong huyết thanh chuột. Kết quả ở các bảng 3.11 và 3.12 cho thấy sau 4 tuần, 8 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống PĐE, nồng độ albumin và cholesterol toàn phần trong máu chuột ở cả lô trị 1 và lô trị 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống mẫu thử

($p>0,05$). Như vậy, uống PĐE 2 liều trên trong 8 tuần liên tục không ảnh hưởng đến chức năng tổng hợp albumin và cholesterol của gan.

Các kết quả trong nghiên cứu này đã chứng minh PĐE không gây tổn thương gan, không ảnh hưởng tới cấu trúc và chức năng gan của chuột cống trắng trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn.

4.1.2.4. Ảnh hưởng của PĐE đến chức năng lọc của cầu thận và mô bệnh học thận

Thận là cơ quan đảm nhận các chức năng quan trọng như lọc máu, tái hấp thu có chọn lọc nước và một số chất hòa tan giúp cân bằng nội môi, bài tiết chất cặn bã và các chất độc. Khi tiếp xúc với các chất độc nội sinh và ngoại sinh, cầu thận và ống thận rất dễ bị tổn thương [22]. Do phần lớn thuốc khi đưa vào cơ thể đều được đào thải qua thận nên nguy cơ gây độc của thuốc với thận rất cao. Vì vậy, thận là cơ quan bắt buộc phải đánh giá tổn thương khi tiến hành nghiên cứu độc tính bán trường diễn của thuốc.

Để đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên chức năng lọc của cầu thận, hiện nay thường dùng xét nghiệm định lượng creatinin huyết tương. Creatinin là thành phần ổn định nhất trong máu, hầu như không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý, mà chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Creatinin được lọc qua cầu thận và không được tái hấp thu ở ống thận. Khi cầu thận bị tổn thương, nồng độ creatinin huyết thanh tăng sớm hơn chỉ số ure huyết và đáng tin cậy hơn so với chỉ số ure huyết [22].

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.13 cho thấy PĐE ở cả 2 liều đã sử dụng cho chuột cống trắng tại thời điểm sau 4 tuần, 8 tuần và sau 2 tuần ngừng thuốc không làm thay đổi nồng độ creatinin huyết thanh so với lô chứng sinh học và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p>0,05$). Kết quả này phù hợp với kết quả quan sát đại thể và cấu trúc vi thể thận chuột ở lô chứng và các lô trị là bình thường.

4.1.2.5. Bàn luận chung về độc tính bán trường diễn

Trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn, mẫu thử PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại đã được cho chuột cống trắng uống với 2 mức liều: liều tương đương 4,2 g dược liệu/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người) và liều gấp 3 lần (liều tương đương 12,6 g dược liệu/kg/ngày), uống liên tục trong 8 tuần, theo dõi sau 2 tuần ngừng uống. Các chỉ số đánh giá được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và Bộ Y tế Việt Nam, bao gồm theo dõi về tình trạng chung, thể trọng của chuột, đánh giá chức phận tạo máu, cấu trúc và chức năng gan, mức độ tổn thương tế bào gan, cấu trúc và chức năng thận.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các chỉ số theo dõi ở 2 lô uống PĐE đều không có sự khác biệt so với lô chứng, chứng tỏ PĐE không gây độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng khi uống 2 liều như trên trong 8 tuần.

Trong nghiên cứu độc tính của cao chiết methanol từ lá Dứa dại (*Pandanus odoratissimus* L. f.), Sama Raju và cộng sự đã cho chuột nhắt trắng uống cao chiết methanol từ lá Dứa dại với liều 2 g/kg cân nặng, theo dõi các dấu hiệu của độc tính sau uống thuốc thử 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ và 6 giờ của ngày đầu tiên, sau đó mỗi ngày một lần trong 14 ngày. Kết quả cho thấy với liều 2 g/kg cân nặng, cao chiết methanol từ lá Dứa dại không thể hiện độc tính cấp trên chuột nhắt trắng theo đường uống [98].

Đến nay, chúng tôi chỉ tìm thấy rất ít các công trình nghiên cứu về độc tính của Dứa dại trên thế giới và chưa tìm được công trình nghiên cứu nào tại Việt Nam, vì vậy không có nhiều tài liệu để so sánh.

Với kết quả nghiên cứu về độc tính bán trường diễn của phân đoạn PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại, có thể phân loại PĐE vào nhóm các thuốc không có độc tính khi sử dụng liều lặp lại dài ngày (8 tuần).

4.2. Tác dụng chống viêm gan cấp của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại

4.2.1. Bàn luận về mô hình nghiên cứu

Để đánh giá khả năng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan của thuốc, trước hết phải gây được mô hình gây viêm gan thực nghiệm. Mô hình gây viêm gan

càng gần với thực tế và rõ ràng về cơ chế thì tính ứng dụng càng cao. Như đã trình bày trong phần tổng quan, có ba nhóm nguyên nhân chính gây viêm gan là do virus, do thuốc và do hóa chất. Vì vậy việc xây dựng mô hình gây viêm gan trên thực nghiệm thường dựa vào ba nhóm nguyên nhân này.

Hiện nay đã có một số nghiên cứu trên thế giới xây dựng thành công mô hình gây viêm gan virus B [110],[111], viêm gan virus C [111],[112],[113], viêm gan virus D [114] trên chuột *Fah^{-/-}Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* (chuột suy giảm miễn dịch do thiếu hụt fumaryl acetoacetate hydrolase) thông qua việc cấy ghép tế bào gan người vào gan của chủng chuột này có thể tạo ra gan chuột nhân hóa (*human liver chimeric mice*) và gây nhiễm virus viêm gan trên chính những con chuột đã được cấy ghép này [111],[115]. Trong điều kiện nghiên cứu tại Việt Nam, chúng tôi chưa thể áp dụng mô hình nghiên cứu này.

Một số tác giả đã sử dụng mô hình gây tổn thương gan do rượu để đánh giá tác dụng của thuốc thử [116],[117]. Hiện nay, để nghiên cứu thuốc có tác dụng trên gan, các tác giả trong và ngoài nước thường dùng các mô hình gây viêm gan bằng thuốc hoặc hóa chất, đánh giá tác dụng của thuốc thử qua tác dụng đối kháng với tác dụng gây tổn thương do các chất độc trên gan. Nghiên cứu có thể tiến hành theo hai hướng: tác dụng bảo vệ gan (gây độc gan sau khi dùng thuốc thử nghiệm) hoặc tác dụng tăng phục hồi tổn thương gan (gây độc gan trước khi dùng thuốc thử nghiệm). Ngoài ra có thể tiến hành thêm một số nghiên cứu tác dụng dược lý liên quan như tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, lợi mật... góp phần minh chứng cho cơ chế tác dụng về khả năng bảo vệ gan và tăng phục hồi tổn thương gan của thuốc [22],[35].

Có nhiều loại thuốc/ hóa chất được các tác giả sử dụng để gây mô hình viêm gan trong các nghiên cứu như PAR, carbon tetrachlorid [118], [119], D-galactosamin [120],[121], erythromycin estolat [122],[123], aflatoxin B1 [124],[125], thioacetamid [126]..... Tất cả các mô hình trên đều đã được chứng minh rõ ràng về cơ chế gây tổn thương gan [34],[38], việc lựa chọn mô hình nào tùy thuộc vào mục tiêu và điều kiện nghiên cứu thực tế.

Trong đề tài này chúng tôi chọn mô hình gây viêm gan cấp bằng PAR liều cao. PAR là thuốc hạ sốt, giảm đau thông thường được sử dụng rất rộng rãi. Đây là thuốc được dùng để điều trị triệu chứng trong nhiều bệnh, có thể mua dễ dàng mà không cần kê đơn, vì vậy tình trạng lạm dụng thuốc hoặc sử dụng quá liều dẫn đến độc tính của thuốc thường xảy ra. Với liều điều trị thông thường, PAR rất ít gây độc cho gan. Chỉ khi dùng liều cao ($> 10,0$ g), sau thời gian tiềm tàng 24 giờ, tế bào gan bị viêm cấp và hoại tử do tạo lượng lớn chất chuyển hóa N-acetyl-p-benzoquinoneimin (NAPQI) gây độc cho gan (cơ chế gây độc gan của NAPQI đã trình bày chi tiết trong mục 1.2.1.2.), có thể tiến triển tới chết sau 5-6 ngày [40].

Theo thống kê tại Mỹ, ngộ độc do PAR chiếm khoảng 39% các trường hợp viêm gan cấp do thuốc [127]. Trong hai năm (2002 - 2003) Ngô Hữu Hà thống kê tình hình ngộ độc cấp các thuốc thường gặp tại trung tâm chống độc Bệnh viện Bạch Mai thấy tỷ lệ ngộ độc PAR là 12,2% và đứng thứ 3 trong các loại ngộ độc thuốc [128]. Paracetamol gây tổn thương gan điển hình, khả năng gây độc gan trên thực nghiệm đã được chứng minh và dễ tiến hành, tần suất gặp tổn thương trên thực tế là rất lớn [39]. Vì vậy, để đánh giá tác dụng chống viêm gan cấp của quả Dứa dại, chúng tôi lựa chọn mô hình gây tổn thương gan bằng PAR liều cao, phù hợp với thực tiễn lâm sàng hiện nay.

Về liều gây độc gan của PAR trên thực nghiệm: Trong mô hình gây độc gan bằng PAR liều cao trên chuột nhắt trắng, mức độ tổn thương gan tùy thuộc vào liều lượng và đường dùng. Liều càng cao thì sự tổn thương tế bào gan càng nặng, có thể dẫn đến tử vong.

Theo Anwar (1995) liều PAR 1,0 g/ kg theo đường uống đã gây chết 100% số chuột nhắt trắng [129]. Göksel sener và cộng sự (2006) tiêm màng bụng chuột PAR 900 mg/kg đã gây độc tính nặng, làm tăng hoạt độ AST lên đến 1389,6 % và ALT lên 3162,5% so với nhóm chứng sinh học [130]. Theo Stephan U và cộng sự, liều PAR 150 mg/kg đường uống gây bán độc (subtoxic), liều 500 mg/kg gây độc tính rõ [53]. Nghiên cứu của A F Mohamed

và cộng sự chỉ ra rằng uống PAR liều 600 mg/kg gây chết 80% và liều 1 g/kg PAR gây chết 100% chuột [131].

Sau khi tham khảo tài liệu của tác giả Nguyễn Thị Tuyết Mai về chọn liều gây độc [78], chúng tôi chọn liều PAR gây độc trên chuột nhất là 400 mg/kg theo đường uống. Với liều gây độc này, chuột không chết sau khi gây độc, có thể quan sát được tổn thương gan ở mức độ vừa phải. Lựa chọn gây độc bằng PAR theo đường uống là phù hợp với thực tiễn lâm sàng là người bệnh chủ yếu bị ngộ độc thuốc theo đường uống.

Chọn thuốc chứng dương trong nghiên cứu: Trong nghiên cứu này, silymarin được lựa chọn làm thuốc chứng dương để so sánh với tác dụng của các mẫu thử. Silymarin là một thuốc đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ gan tốt thông qua một số nghiên cứu thực nghiệm trên mô hình gây độc gan bằng PAR [132], CCl₄ [133], D-galactosamin [134]... và nghiên cứu trên lâm sàng [73]. Cơ chế bảo vệ gan của silymarin có được thông qua một số tác dụng như: chống oxy hóa [135], ức chế peroxid hóa lipid [136], kích thích RNA polymerase ribosome tổng hợp protein dẫn đến tăng cường tái tạo tế bào gan [137], chống lại sự suy kiệt GSH (glutathion) [138], chống viêm [139]. Chính vì những lý do trên chúng tôi đã sử dụng silymarin làm thuốc chứng dương trong nghiên cứu này.

4.2.2. Tác dụng bảo vệ gan

Ở lô mô hình (gây độc bằng PAR nhưng không dùng mẫu thử), PAR với liều 400 mg/kg dùng đường uống trên chuột nhắt trắng, sau 2 ngày dùng thuốc đã làm tăng hoạt độ ALT 311,8% và AST 59,4% so với nhóm chứng (bảng 3.18). Điều này chứng tỏ PAR đã gây tổn thương tế bào gan cấp, làm giải phóng các enzym này vào máu. Mô hình gây độc này của chúng tôi có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của Đinh Thị Kim Chi (2007) [140] trong nghiên cứu về tác dụng bảo vệ gan của cây cỏ mật, tỷ lệ tăng hoạt độ ALT và AST trong lô mô hình tương ứng là 298,5% và 56,3%.

Dùng CTP và PĐE 8 ngày trước khi gây độc có tác dụng làm giảm rõ rệt hoạt độ ALT và AST so với lô mô hình ($p < 0,001$). Với CTP liều 1 (*liều có tác dụng tương đương trên người*), hoạt độ ALT giảm 60,1%, AST giảm 28,4% so với lô mô hình. Với CTP liều 2 (*gấp 2 lần liều 1*) hoạt độ ALT giảm 55,7%, AST giảm 29,1%. PĐE liều 1 (*liều có tác dụng tương đương trên người*) đã làm giảm hoạt độ ALT 61,3%, AST 36,5%; PĐE liều 2 đã làm giảm hoạt độ ALT 58,1% và AST 34,0% so với lô mô hình. Lô điều trị bằng silymarin làm giảm hoạt độ ALT 51,4% và hoạt độ AST 31,5%, so với lô mô hình.

Trong 4 lô dùng mẫu thử (2 liều CTP và 2 liều PĐE), mẫu PĐE liều thấp (liều 1) thể hiện tác dụng làm giảm hoạt độ ALT và AST cao nhất, mặc dù sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Quan sát mô bệnh học (bảng 3.19) cho thấy kết quả tương ứng với sự biến đổi enzym gan. Ở lô mô hình gây độc nhưng không dùng thuốc, quan sát đại thể thấy gan phù nề, sung huyết, hình ảnh vi thể gan thấy tất cả các mẫu bệnh phẩm có thoái hóa nặng, bào tương tế bào gan có nhiều hốc sáng lớn và nhỏ, một số tế bào mất nhân. Uống CTP, PĐE hoặc silymarin đã làm hạn chế rõ rệt mức độ tổn thương gan do PAR liều cao gây ra cả trên hình ảnh đại thể và vi thể.

Kết quả nghiên cứu trên phù hợp với các nghiên cứu của một số tác giả khác khi đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây Dứa dại. El-Shaibany nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của cuống và cụm hoa Dứa dại đã kết luận cuống hoa Dứa dại có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây độc gan bằng PAR thông qua khả năng làm giảm ALT và AST và lần lượt là 50% và 42% so với lô mô hình, các tổn thương trên giải phẫu bệnh chỉ ở mức độ nhẹ và tương đương silymarin [93]. Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao chiết ethanol rễ Dứa dại trên mô hình gây độc gan bằng PAR, Garima Mishra đã kết luận cao chiết ethanol rễ Dứa dại có tác dụng bảo vệ gan ở mức liều 400mg/kg, mức độ tổn thương mô bệnh học nhẹ hơn và khả năng làm giảm hoạt độ AST, ALT tương đương với silymarin [94].

Như vậy, CTP và PĐE có tác dụng bảo vệ gan khi gây độc bằng PAR liều cao, tác dụng của 2 liều CTP và 2 liều PĐE đã dùng tương đương nhau và tương đương với silymarin – loại thuốc đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ gan tốt trên thực nghiệm và lâm sàng.

4.2.3. Tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan

Các thuốc bảo vệ gan có tác dụng khi dùng thuốc *trước* khi gây độc, nhưng trên thực tế, thuốc thường được dùng với mục đích điều trị, tức là khi bệnh nhân xuất hiện các triệu chứng bệnh mới dùng thuốc. Trong trường hợp đó, liệu thuốc có hiệu quả như khi dùng dự phòng hay không? Để trả lời câu hỏi này, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan (uống thuốc *sau* khi gây độc) của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại.

Trong nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan, chúng tôi thấy tác dụng của CTP và PĐE ở liều tương đương 7,2 g dược liệu/ kg (liều 1) và liều tương đương 14,4 g dược liệu/ kg (liều 2) là tương đương nhau. Như vậy, tác dụng của CTP và PĐE không tỉ lệ thuận với liều dùng, dùng liều cao hơn, tác dụng cũng không tăng hơn. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi chọn CTP và PĐE liều thấp hơn (liều tương đương 7,2 g dược liệu/kg trên chuột nhắt trắng) để đánh giá tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan.

- **Sau 2 ngày** gây độc bằng PAR (bảng 3.20), hoạt độ ALT và AST ở lô mô hình tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học: ALT tăng 491,5%, AST tăng 309,3% ($p < 0,001$). Trong khi đó, ở lô uống CTP và PĐE, hoạt độ ALT và AST đã giảm đáng kể so với lô mô hình - theo thứ tự ALT giảm 57,9% và 67,1%, AST giảm 46,1% và 53,4%, nhưng vẫn còn tăng so với lô chứng sinh học. Hoạt độ 2 enzym này ở lô dùng silymarin tương đương với lô dùng CTP và PĐE.

Quan sát mô bệnh học (bảng 3.21) cho thấy lô mô hình thể hiện rõ tình trạng viêm gan cấp sau khi gây độc bằng PAR liều cao, cả trên hình ảnh đại thể và vi thể. 2/3 mẫu bệnh phẩm có hình ảnh gan thoái hóa nặng kèm theo hoại tử tế bào gan, có vùng hoại tử chảy máu, có xâm nhập viêm. 1/3 mẫu

bệnh phẩm có hình ảnh gan thoái hóa vừa. Uống CTP, PĐE hoặc silymarin đã làm hạn chế rõ rệt mức độ tổn thương gan do PAR liều cao gây ra cả trên hình ảnh đại thể và vi thể, trong đó mẫu PĐE thể hiện tác dụng tốt hơn cả.

- Sau 4 ngày gây độc bằng PAR (bảng 3.22), hoạt độ ALT và AST ở lô mô hình đã giảm so với thời điểm sau 2 ngày: ALT chỉ còn tăng 118,1% và AST chỉ còn tăng 77,7% so với lô chứng sinh học. Điều này chứng tỏ tổn thương gan ở lô mô hình đã tự phục hồi một phần. Theo Đào Văn Phan, trong trường hợp tổn thương gan không nặng thì chức phận gan có thể trở về bình thường sau 5 ngày [141].

Sau 4 ngày gây độc bằng PAR, hoạt độ ALT và AST trong máu chuột ở tất cả các lô uống CTP, PĐE và silymarin đã giảm rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,001$), trở về mức tương đương lô chứng sinh học ($p > 0,05$), trừ hoạt độ AST ở lô uống CTP còn tăng nhẹ so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$).

Quan sát mô bệnh học cho thấy kết quả tương ứng với sự biến đổi enzym gan. Trong khi ở lô mô hình, 2/3 mẫu bệnh phẩm vẫn tổn thương thoái hóa tế bào gan ở mức độ vừa, thì ở các lô uống thuốc thử CTP và PĐE cũng như lô uống thuốc chứng dương silymarin, tổn thương gan chỉ còn ở mức độ nhẹ hoặc đã trở về bình thường (bảng 3.23).

Như vậy, CTP và PĐE với liều tương đương 7,2 g dược liệu/ kg có tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan khi gây độc bằng PAR trên chuột nhắt trắng.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết luận của tác giả Ilanchezhian R: cao chiết rễ Dứa dại có tác dụng tăng phục hồi tổn thương gan trên mô hình gây tổn thương gan chuột cống trắng bằng CCl_4 [95].

Kết quả nghiên cứu tác dụng chống viêm gan cấp của quả Dứa dại trên thực nghiệm đã cho thấy CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại với 2 liều tương đương 7,2 g dược liệu/ kg (liều 1) và liều tương đương 14,4 g dược liệu/ kg (liều 2) có tác dụng tương đương nhau và tương đương với silymarin. Điều này gợi ý chỉ cần dùng liều thấp (liều 1) là đủ có tác dụng, không cần dùng liều cao hơn.

Trong cả 2 mô hình nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan, PDE đều có tác dụng tương đương CTP. Điều này cho thấy PDE là *hoạt chất chính* có tác dụng trên gan trong CTP của quả Dứa dại.

4.3. Tác dụng chống xơ gan trên mô hình gây xơ gan bằng CCl₄

4.3.1. Bàn luận về mô hình nghiên cứu

Mô hình gây xơ gan trên thực nghiệm đã được thực hiện qua nhiều nghiên cứu của các tác giả trong nước và trên thế giới. Các mô hình gây xơ hóa gan đã được áp dụng là: Mô hình gây độc bằng ethanol, carbon tetrachlorid, thiocetamid, dimethylnitrosamin, chế độ ăn thiếu methionin cholin, chế độ ăn giàu chất béo, thắt ống dẫn mật, gây mô hình xơ hóa gan bằng virus viêm gan [58].... Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn lựa mô hình gây xơ gan bằng carbon tetrachlorid (CCl₄) trên chuột nhắt trắng để đánh giá tác dụng chống xơ gan của quả Dứa dại, vì CCl₄ là chất gây độc được áp dụng nhiều nhất trong các nghiên cứu xơ hóa gan và bệnh xơ gan do tính tương đồng của xơ hóa gan so với nhiễm độc gan mạn tính gây ra xơ gan ở người [58].

Trong cơ thể CCl₄ được chuyển hóa phần lớn qua CYP2E1 thành gốc tự do trichloromethyl (CCl₃*), gốc tự do này thông qua hai con đường chính là haloalkyl hóa và peroxy hóa lipid [60],[61] gây ra hoại tử tế bào gan, kích hoạt tế bào Kupffer sản sinh nhiều chất gây viêm như leukotriene, interleukin, TNF- α , TGF- β [142]. Chính TGF- β và quá trình hoại tử tế bào gan liên tục do gốc tự do CCl₃* gây ra đã kích thích sự hoạt hóa các tế bào hình sao trong gan (hepatic stellate cells: HSCs) sản sinh mô sợi dẫn đến xơ hóa gan [143].

Mô hình gây xơ gan bằng CCl₄ có thể được thực hiện trên cả chuột cống trắng và chuột nhắt trắng, nhưng mô hình nghiên cứu sử dụng chuột nhắt trắng được áp dụng nhiều hơn vì tỷ lệ trao đổi chất CCl₄ cao hơn so với chuột cống trắng [68]. Tính miễn cảm của chuột đối với bệnh xơ gan do CCl₄ phụ thuộc vào chủng, các nghiên cứu cũng đã chứng minh chủng chuột nhắt trắng BALB/c có tình trạng xơ hóa nhiều hơn hẳn so với các chủng chuột khác (C57BL/6, DBA/2) khi tiến hành gây xơ gan bằng CCl₄ [70],[144]. Trong

điều kiện thực tế, chúng tôi chỉ có thể sử dụng chuột nhắt trắng chủng Swiss để tiến hành nghiên cứu này.

Có thể dùng CCl_4 đường tiêm dưới da, đường uống, đường tiêm màng bụng. Đường tiêm màng bụng là đường dùng được lựa chọn nhiều hơn cả do những lợi điểm như: tỷ lệ chuột chết thấp, khả năng gây xơ gan rõ [71], vì vậy chúng tôi lựa chọn đường tiêm màng bụng CCl_4 trong nghiên cứu này.

Về liều gây độc của CCl_4 : Các tác giả thường sử dụng CCl_4 với liều 1 μl / 1g thể trọng pha trong dầu olive với tỷ lệ 1 CCl_4 / 7 dầu olive tiêm màng bụng 2 lần/ tuần trong 8 đến 12 tuần để gây xơ gan trên chuột nhắt trắng thực nghiệm [69]. Sau khi tham khảo báo cáo về gây mô hình xơ gan bằng CCl_4 của nhóm tác giả Trương Hải Nhung và cộng sự [72], chúng tôi áp dụng mô hình nghiên cứu này, kèm theo một số thay đổi để phù hợp với mục tiêu nghiên cứu và điều kiện tại cơ sở nghiên cứu.

Chúng tôi sử dụng silymarin làm thuốc chứng dương trong nghiên cứu này vì silymarin đã được chứng minh có tác dụng tốt trong giảm xơ hóa gan chuột trên mô hình gây xơ gan bằng CCl_4 [145].

4.3.2. Tác dụng chống xơ gan trên mô hình gây xơ gan bằng CCl_4 của CTP và PDE

4.3.2.1. Ảnh hưởng của CTP và PDE đến trọng lượng tương đối của gan chuột

Trong bệnh lý xơ gan, gan xơ thường thay đổi về kích thước, mật độ và màu sắc. Gan có thể to, nặng hơn bình thường do xâm nhập nhiều mỡ hoặc các thành phần khác [9]. Kết quả ở bảng 3.24 cho thấy sau khi gây mô hình xơ gan bằng tiêm màng bụng CCl_4 trong 18 tuần, trọng lượng tương đối của gan chuột ở tất cả các lô gây độc bằng CCl_4 , có dùng hoặc không dùng thuốc đều tăng cao so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$). Trọng lượng tương đối của gan chuột cao nhất ở lô mô hình ($0,62 \pm 0,15$ g/10 g thể trọng), thấp nhất ở lô dùng silymarin ($0,50 \pm 0,06$ g/10 g thể trọng). Hai lô dùng CTP và PDE có xu hướng làm giảm trọng lượng tương đối của gan chuột so với lô mô hình nhưng sự khác

biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Không có sự khác biệt về trọng lượng tương đối giữa 2 lô dùng mẫu thử và thuốc chứng dương silymarin ($p > 0,05$).

Kết quả nghiên cứu này cho thấy PĐE và CTP có xu hướng làm giảm trọng lượng tương đối của gan chuột trong mô hình gây xơ gan bằng CCl_4 trên chuột nhắt trắng, tác dụng này chưa thực sự rõ rệt bằng silymarin.

4.3.2.2. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến mức độ tổn thương gan và chức năng gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4 .

Các enzym gan đóng một vai trò quan trọng trong việc đánh giá tổn thương hủy hoại tế bào gan vì sự phá hủy tế bào sẽ giải phóng các enzym từ tế bào vào tuần hoàn. Hai aminotransferase được sử dụng rộng rãi trong đánh giá sự tổn thương của tế bào gan là ALT và AST [1]. Trong viêm gan cấp AST và ALT thường tăng rất cao ($> 10 - 100$ lần), nhưng trong viêm gan mạn tính và xơ gan hai chỉ số xét nghiệm có thể bình thường hoặc tăng vừa phải [30]. Trong mô hình viêm gan cấp bằng PAR, CTP và PĐE có tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan tốt thông qua làm giảm hai enzym này. Nếu CTP và PĐE có tác dụng bảo vệ gan tốt trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4 sẽ ức chế sự tổn thương tế bào gan và được đánh giá thông qua việc làm giảm hoạt độ ALT và AST so với lô mô hình.

Kết quả tại bảng 3.25 và 3.26 cho thấy sau 18 tuần gây độc bằng CCl_4 , hoạt độ ALT và AST ở lô mô hình tăng so với lô chứng, mức độ tăng tương ứng là 205,4% và 177,3%, tương đương với nghiên cứu của Trương Hải Nhung [72]. Mức độ tăng ALT và AST trong mô hình này không cao như mô hình gây viêm gan cấp bằng PAR đã trình bày ở trên, phù hợp với đặc điểm của viêm gan mạn tính và xơ gan là tổn thương gan không mạnh, ồ ạt như viêm cấp. Mặc dù ba lô uống CTP, PĐE hoặc silymarin có làm giảm hoạt độ ALT và AST so với lô mô hình, trong đó lô uống PĐE có hoạt độ ALT và AST thấp nhất trong 3 lô, nhưng tác dụng này chưa rõ rệt, chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Gan là cơ quan thực hiện các chức năng quan trọng của cơ thể như chuyển hóa các chất, khử độc và tạo mật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành gây mô hình xơ gan bằng CCl_4 và đánh giá khả năng tổng hợp và chuyển hóa các chất của gan thông qua các thông số nồng độ albumin, cholesterol và bilirubin toàn phần trong máu chuột, qua đó đánh giá được tác dụng của các mẫu thử CTP và PĐE chống lại ảnh hưởng của CCl_4 đến chức năng gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm.

Khi gan bị suy giảm chức năng, nồng độ albumin huyết thanh sẽ giảm và hiện tượng này không xảy ra ngay vì thời gian bán hủy của albumin xấp xỉ 12 ngày. Chính vì vậy định lượng albumin huyết thanh có ý nghĩa trong đánh giá bệnh gan mạn tính hơn so với bệnh gan cấp tính [1]. Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.27 cho thấy nồng độ albumin trong máu chuột ở lô mô hình gây độc bằng CCl_4 đã giảm rõ rệt, tới 19,1%, so với lô chứng ($p < 0,05$). Mặc dù nồng độ albumin trong máu chuột ở các lô uống mẫu thử và silymarin đều cao hơn so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Gan tổng hợp phần lớn cholesterol huyết thanh thông qua hấp thu acid béo tự do từ thức ăn và thoái hóa thành các acetyl-CoA, các acetyl-CoA này chuyển hóa tạo thành cholesterol. Vì vậy, trong bệnh lý gan mạn tính khi tế bào gan bị tổn thương kéo dài, nồng độ cholesterol trong máu sẽ giảm [1],[29].

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.28 cho thấy nồng độ cholesterol trong máu chuột ở lô mô hình đã giảm rõ rệt, tới 29,4% so với lô chứng. Lô uống PĐE và silymarin có nồng độ cholesterol huyết thanh cao rõ rệt so với lô gây mô hình ($p < 0,05$), không khác biệt so với lô chứng ($p > 0,05$). Nồng độ cholesterol huyết thanh của lô uống CTP có tăng so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Như vậy, PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại có tác dụng bảo vệ gan tương tự silymarin, hạn chế được suy giảm chức năng tổng hợp cholesterol của gan trên mô hình gây xơ gan bằng CCl_4 .

Một trong những chức năng chính của gan là tạo mật và bài tiết mật. Thông qua định lượng nồng độ bilirubin huyết thanh ta có thể đánh giá được

chức năng này của gan, đồng thời đánh giá được khả năng viêm, tắc gây ứ mật. Trong viêm gan mạn tính, bilirubin thường tăng [29]. Kết quả ở bảng 3.29 cho thấy, nồng độ bilirubin toàn phần tại lô mô hình tăng cao rõ rệt so với lô chứng ($p<0,05$). Tất cả các lô uống CTP, PĐE và silymarin đều làm giảm rõ rệt nồng độ bilirubin toàn phần trong máu chuột so với lô mô hình ($p<0,05$), trong đó lô uống PĐE có tác dụng tốt nhất, thể hiện nồng độ bilirubin toàn phần trong máu thấp nhất, thấp hơn rõ rệt lô uống silymarin ($p<0,05$). Kết quả này cho thấy mẫu CTP và PĐE có tác dụng bảo vệ gan, hạn chế được suy giảm chức năng tạo mật và bài tiết mật của gan trên mô hình gây xơ gan bằng CCl_4 , trong đó mẫu PĐE có tác dụng tốt nhất, tốt hơn silymarin ($p<0,05$).

4.3.2.3. Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến các chỉ số huyết học trong máu chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4

Trong bệnh lý xơ gan, công thức máu có sự thay đổi, thường có thiếu máu nhược sắc, tiểu cầu giảm và bạch cầu thường tăng [29]. Kết quả ở bảng 3.30 cho thấy số lượng bạch cầu trong máu chuột sau gây độc bằng CCl_4 ở lô mô hình và các lô uống CTP và PĐE đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p<0,05$), chứng tỏ quá trình gây độc kéo dài đã gây ra tình trạng viêm mạn tính tại các lô gây độc. Số lượng bạch cầu ở lô uống PĐE và silymarin có giảm hơn so với lô mô hình, nhưng sự khác biệt chưa được thể hiện rõ. Kết quả này cho thấy lô uống PĐE có xu hướng hạn chế tình trạng tăng bạch cầu do CCl_4 gây ra trên mô hình gây xơ gan, trong khi CTP không thể hiện tác dụng này.

Kết quả xét nghiệm số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột ở bảng 3.31 cho thấy có sự giảm rõ rệt 2 chỉ số này ở lô mô hình gây độc gan bằng CCl_4 trong 18 tuần. Mặc dù số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố ở các lô dùng CTP, PĐE và silymarin có tăng so với lô mô hình, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Như vậy CTP và PĐE có xu hướng làm giảm ảnh hưởng của độc tính do CCl_4 gây ra trên cơ quan tạo máu trên mô hình gây xơ gan, nhưng tác dụng này chưa thực sự rõ rệt.

4.3.2.4. Ảnh hưởng của CTP và PDE đến các chỉ số đánh giá mức độ xơ gan trong gan chuột.

Sự kích hoạt các tế bào hình sao (hepatic stellate cells: HSC) khi gan bị nhiễm độc được cho là nguyên nhân chính của xơ hóa gan. Khi sự kích hoạt xảy ra, HSC được biến đổi từ tế bào dự trữ vitamin A thành các tế bào giống như nguyên bào sợi cơ có đặc tính tăng sinh và co bóp cùng với biểu hiện quá mức của các sợi collagen. Sự kích hoạt HSC tạo ra quá nhiều protein chất nền ngoại bào (ECM: extracellular matrix) như collagen, proteoglycan, fibronectin và laminin cùng với các chất ức chế enzym tiêu hủy cấu trúc nền (Matrix Metalloproteinases – MMPs) dẫn đến sự lắng đọng của các protein chất nền ngoại bào và sự mất cân bằng giữa quá trình xơ hóa với quá trình tiêu xơ [146],[147]. Sự lắng đọng quá mức chất nền ngoại bào là biểu hiện đặc trưng của quá trình xơ hóa mô gan, chính vì vậy những tế bào được tiết ra từ quá trình kích hoạt HSC đóng góp vai trò quan trọng trong tiến triển từ xơ hóa dẫn đến xơ gan [28],[148]. Theo một số tác giả, sự lắng đọng quá mức của các sợi collagen trong các mô liên kết gan là một dấu hiệu đặc trưng cho sự phát triển của bệnh xơ gan [27],[149], do đó định lượng hàm lượng collagen trong gan là phương pháp hữu ích trong đánh giá mức độ xơ hóa gan [146].

Hầu hết collagen là sản phẩm tổng hợp của nguyên bào sợi, sự hydroxyl hóa gốc prolin thành hydroxyprolin có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp collagen từ nguyên bào sợi. Sự hydroxyl hóa này giúp hình thành phân tử procollagen hoàn chỉnh trong giai đoạn nội bào và có vai trò ổn định cấu trúc xoắn ốc của sợi fibril [146]. Hydroxyprolin chiếm khoảng 10% của chuỗi α trong phân tử procollagen (thành phần phân tử cấu tạo nên collagen), là một acid amin đặc trưng của protein collagen và hầu như không có ở các protein khác của cơ thể. Sự thay đổi hàm lượng của acid amin này có sự tương quan đáng kể với tốc độ tổng hợp và thoái hóa của collagen [150]. Trong quá trình thoái hóa collagen, người ta đã chứng minh rằng hàm lượng

hydroxyprolin được giải phóng trong nước tiểu và huyết thanh có mối tương quan đáng kể với xơ hóa [151].

Thông qua định lượng collagen và hydroxyprolin có thể đánh giá được mức độ xơ hóa gan trên lâm sàng cũng như trên thực nghiệm. Gần đây phương pháp định lượng collagen bằng cách ước tính tỷ lệ diện tích collagen trong sinh thiết gan thu được từ phân tích hình ảnh kỹ thuật số đã được chứng minh có ưu điểm về tính chính xác cao nên đã được các tác giả áp dụng nhiều trong chẩn đoán xơ hóa gan [152].

Trong nghiên cứu này chúng tôi định lượng collagen type IV và hydroxyprolin trong gan chuột thí nghiệm trên mô hình gây xơ gan bằng CCl_4 để đánh giá khả năng ức chế sự xơ hóa gan của CTP và PDE, đồng thời mỗi lô chuột lấy ngẫu nhiên 50% mẫu bệnh phẩm làm tiêu bản cấu trúc vi thể gan.

** Ảnh hưởng của CTP và PDE đến hàm lượng hydroxyprolin (Hyp) trong gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4 :*

Kết quả tại bảng 3.32 cho thấy hàm lượng hydroxyprolin trong gan chuột ở tất cả các lô gây mô hình không dùng thuốc, dùng mẫu thử CTP, PDE và dùng thuốc chuẩn silymarin đều tăng cao so với lô chứng ($p < 0,05$). Kết quả này cho thấy mô hình gây độc bằng CCl_4 trong 18 tuần đã gây xơ hóa gan chuột thực nghiệm. Các lô dùng CTP và silymarin mặc dù có hàm lượng hydroxyprolin trong gan chuột giảm so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Không có sự khác biệt về hàm lượng hydroxyprolin giữa các lô dùng thuốc thử với lô dùng thuốc chuẩn và các lô dùng thuốc thử với nhau.

** Ảnh hưởng của CTP và PDE đến lượng collagen type IV trong gan chuột trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl_4 :*

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.33 cho thấy sau 18 tuần gây độc bằng CCl_4 , lượng collagen type IV trong gan chuột ở lô mô hình cũng như tất cả các lô dùng mẫu thử và thuốc chuẩn đều tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học, phù hợp với hàm lượng hydroxyprolin trong gan chuột ở tất cả các lô đều tăng cao so với lô chứng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa và nồng độ collagen

type IV giữa các lô dùng thuốc thử, thuốc chuẩn và lô mô hình. Các lô dùng thuốc thử (CTP và PĐE) có xu hướng giảm lượng collagen type IV so với lô mô hình, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

** Ảnh hưởng của CTP và PĐE đến giải phẫu bệnh gan chuột:*

Kết quả giải phẫu bệnh là tiêu chuẩn vàng để đánh giá mức độ xơ hóa gan. Kết quả vi thể gan ở bảng 3.34 cho thấy ở lô mô hình (gây độc nhưng không dùng thuốc) có 4/5 mẫu có xơ hóa gan nhẹ đến xơ gan rõ rệt, chứng tỏ tiêm màng bụng CCl_4 trong 18 tuần đã gây được mô hình xơ hóa gan trên chuột, tuy nhiên tỷ lệ gây xơ gan chưa đạt được mức cao nhất. Các lô uống mẫu thử CTP và PĐE cũng như uống silymarin có hình ảnh vi thể gan đã cải thiện hơn so với lô mô hình. Lô sử dụng silymarin và CTP chỉ có 1/5 mẫu bệnh phẩm có xơ gan nhẹ, cục bộ, các mẫu còn lại không có xơ gan hoặc chỉ có xơ hóa nhẹ. Lô sử dụng PĐE tất cả các mẫu bệnh phẩm đều không có xơ gan, chỉ có xơ hóa nhẹ. Kết quả giải phẫu bệnh vi thể gan đã cho thấy CTP và đặc biệt là PĐE có tác dụng hạn chế sự xơ hóa gan khi gây độc gan dài ngày bằng CCl_4 .

4.4. Một số tác dụng dược lý liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ hóa gan của quả Dứa dại

Khi đánh giá tác dụng chống viêm gan, xơ gan của quả Dứa dại, bên cạnh việc đánh giá tác dụng chống viêm gan cấp (bảo vệ và phục hồi tế bào gan bị tổn thương) và mạn tính (chống xơ gan), chúng tôi tiến hành nghiên cứu một số tác dụng dược lý có liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ gan, bao gồm các tác dụng: lợi mật, tác dụng chống viêm, tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại.

4.4.1. Tác dụng lợi mật của CTP và PĐE

Mật được tiết ra từ những tế bào gan, đưa xuống túi mật qua ống dẫn mật. Khi gan bị tổn thương sẽ ảnh hưởng đến quá trình tạo mật và bài xuất mật, ảnh hưởng đến tiêu hóa, hấp thu lipid, các vitamin tan trong dầu và ảnh hưởng đến việc đào thải một số chất độc theo đường mật [1]. Khi lưu lượng

dòng mật giảm, thành phần dịch mật bị thay đổi sẽ tạo điều kiện cho quá trình viêm nhiễm ở đường mật, túi mật. Để tránh các hậu quả đó, trong điều trị người ta thường dùng các thuốc lợi mật [40].

Thuốc lợi mật có 2 loại là *thuốc lợi mật nước* (secretin, thuốc cường phó giao cảm) làm tăng bài tiết nước, điện giải của tế bào biểu mô đường mật, gây tăng tiết mật loãng và *thuốc lợi mật thực thụ* có tác dụng kích thích tế bào gan tăng bài tiết mật giống như mật sinh lý. Tùy theo nguồn gốc, thuốc lợi mật thực thụ được chia làm 3 loại: thuốc lợi mật có nguồn gốc động vật (các muối mật, acid mật hoặc mật toàn phần đã loại bỏ sắc tố và cholesterol), thuốc lợi mật có nguồn gốc thực vật (nghệ, actiso, boldo) và thuốc lợi mật tổng hợp (cyclovalon, anéthol trithion) [40]. Hiện nay, các thuốc lợi mật có nguồn gốc thực vật thường được chọn lựa vì có hiệu quả tốt, ít độc mà giá thành lại không cao.

Trong nghiên cứu này, bên cạnh việc đánh giá tác dụng chống viêm gan cấp của CTP và PĐE, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng lợi mật. Khi gan bị gây độc bằng PAR, nếu CTP và PĐE có tác dụng chống viêm gan sẽ có thể làm giảm được sự suy giảm chức năng tạo mật của gan. Hơn nữa, nếu quả Dứa dại vừa có tác dụng bảo vệ gan, vừa có tác dụng lợi mật, kích thích tế bào gan bài tiết mật, thì sẽ tăng tính hiệu quả trong điều trị. Khi thuốc có tác dụng lợi mật sẽ làm tăng đào thải chất độc qua mật, cũng góp phần chứng minh cơ chế bảo vệ gan của thuốc.

Tác dụng lợi mật được tiến hành theo hướng dẫn phương pháp nghiên cứu dược lý thuốc có tác dụng lợi mật và sinh mật [22].

Thuốc chứng dương được sử dụng là actiso dạng ống uống - một thuốc lợi mật có nguồn gốc thực vật, để so sánh tác dụng lợi mật của CTP và PĐE. Actiso là thảo dược đã được dùng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới để chữa các bệnh về gan, có tác dụng tăng tiết lượng mật gấp 4 lần sau 2 – 3 giờ sử dụng [74]. Trong một nghiên cứu về tác dụng của actiso, Đỗ Kim Sơn đã kết luận “Actiso có tác dụng lợi mật tốt ở tất cả các bệnh nhân có bệnh lý sỏi đường mật và nhiễm khuẩn đường mật đã mổ” [153]. Gebhardt R. (2002)

thấy actiso có tác dụng ức chế quá trình sinh tổng hợp cholesterol ở gan và có tác dụng chống ứ mật mạnh [154]. Vì vậy chúng tôi đã chọn actiso là thuốc chứng dương trong nghiên cứu này.

Trước khi đánh giá tác dụng lợi mật, chuột được gây độc bằng PAR. Sau khi gây độc 2 ngày và 4 ngày, đánh giá tác dụng của CTP và PĐE lên trọng lượng dịch mật trong túi mật của chuột.

** Tác dụng lợi mật của CTP và PĐE tại thời điểm 2 ngày sau gây độc gan bằng PAR:*

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.35 cho thấy sau gây độc bằng PAR 2 ngày, ở lô gây mô hình (gây độc nhưng không được dùng thuốc) trọng lượng dịch mật giảm đáng kể so với lô chứng ($p < 0,01$), chứng tỏ paracetamol gây viêm gan cấp đã ảnh hưởng tới chức năng tạo mật của gan chuột. Vào thời điểm này, lô uống actiso có tác dụng lợi mật tốt, làm tăng rõ rệt trọng lượng dịch mật so với lô mô hình và tăng cao hơn so với các lô uống CTP và PĐE ($p < 0,01$ và $p < 0,05$), độ lợi mật là 2,9% so với lô chứng (không gây độc bằng PAR). Kết quả này phù hợp với nhận xét về khả năng lợi mật gấp 4 lần sau 2 - 3 giờ sử dụng của actiso [74], nhưng trong thí nghiệm này độ lợi mật thấp hơn do chuột đã bị gây độc bằng PAR.

Ở các lô uống CTP và PĐE (cả 2 liều), trọng lượng dịch mật đã tăng lên so với lô mô hình, theo thứ tự ở các lô 4, 5, 6 và 7 là 15,5%, 20,4%, 12,2% và 15,8%, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Mặc dù độ lợi mật của các lô uống CTP và PĐE so với lô chứng vẫn ở số âm, nhưng trọng lượng dịch mật không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng ($p > 0,05$). Không có sự khác biệt về trọng lượng dịch mật giữa các lô dùng CTP và PĐE ($p > 0,05$).

Theo Đào Văn Phan, khi ngộ độc PAR thường không có triệu chứng trong 12 đến 24 giờ đầu [141]. B N Dhawan cho rằng thời điểm 48 giờ sau khi gây độc bằng PAR là thời điểm có thể đánh giá rõ được mức độ gây tổn thương gan của PAR [155]. Trong nghiên cứu tác dụng bảo vệ và phục hồi

tổn thương gan của chúng tôi, sau 2 ngày gây độc bằng PAR, tổn thương gan đã thể hiện rất rõ trên lô mô hình.

Kết quả nghiên cứu tại thời điểm sau gây độc 2 ngày cho thấy trọng lượng dịch mật của các lô uống mẫu thử CTP và PĐE có xu hướng tăng nhưng chưa rõ rệt, đây là thời điểm PAR gây tổn thương gan nặng nề nhất. Tuy tác dụng lợi mật của các lô uống mẫu thử chưa bằng thuốc chuẩn actiso, nhưng đã cho thấy CTP và PĐE có tác dụng nhất định trong việc làm tăng trọng lượng dịch mật trong túi mật, độ lợi mật đã giảm mức âm so với lô mô hình. Kết quả này phù hợp với tác dụng bảo vệ gan và phục hồi tổn thương gan của CTP và PĐE đã trình bày ở trên.

** Tác dụng lợi mật của CTP và PĐE tại thời điểm 4 ngày sau gây độc gan bằng PAR:*

Theo Đào Văn Phan, trong trường hợp ngộ độc PAR không nặng lắm, chức phận gan sẽ trở về bình thường sau 5 ngày [141], vì vậy chúng tôi lấy thời điểm sau gây độc 4 ngày để đánh giá tác dụng lợi mật của CTP và PĐE. Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.36 cho thấy ở lô mô hình (gây độc nhưng không dùng thuốc), trọng lượng dịch mật vẫn giảm hơn rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,05$). Cả bốn lô uống CTP và PĐE (mỗi lô 2 liều) và lô uống actiso đều có trọng lượng dịch mật tăng rõ rệt so với lô mô hình, với ý nghĩa thống kê cao ($p < 0,001$). Trọng lượng dịch mật ở các lô 10, 11, 12 và 13 (uống CTP và PĐE) tăng lần lượt 63,0%, 68,2 %, 50,3 % và 122,1% so với lô mô hình. Lô uống actiso trọng lượng dịch mật tăng ít hơn, chỉ tăng 39,4%.

Kết quả này phù hợp với kết quả làm tăng phục hồi tổn thương gan do PAR của CTP và PĐE. Sau 4 ngày uống mẫu thử, xét nghiệm đánh giá mức độ tổn thương gan (ALT, AST) và mô bệnh học của hai lô uống CTP và PĐE đã trở về gần như lô chứng. Đặc biệt hơn, trọng lượng dịch mật ở các lô uống CTP và PĐE còn cao hơn rõ rệt so với lô chứng (không gây độc), độ lợi mật (so với lô chứng) tăng 22,8% đến 91,5%, cao nhất ở lô uống PĐE liều cao và cao hơn cả lô uống actiso (lợi mật 13,9%). Điều đó chứng tỏ rằng CTP và

PĐE có tác dụng lợi mật, kích thích gan tăng bài tiết mật, nên trọng lượng dịch mật không chỉ về bình thường như lô chứng khi tổn thương gan đã phục hồi, mà còn tăng hơn nhiều so với lô chứng.

Cho đến nay chúng tôi chưa tìm thấy có nghiên cứu nào tại Việt nam và trên thế giới công bố về tác dụng lợi mật của quả Dứa dại, vì vậy chưa có tài liệu để so sánh được tác dụng lợi mật với nghiên cứu khác.

4.4.2. Tác dụng chống viêm cấp của CTP và PĐE

Viêm là một phản ứng không đặc hiệu của cơ thể tại mô liên kết - một mô có mặt tại mọi cơ quan trong cơ thể - do bị sự tấn công của các yếu tố hóa học, vật lý hay sinh học. Trong thành phần các yếu tố tấn công, thường có yếu tố miễn dịch hay vi sinh vật. Quá trình viêm biểu hiện bằng sự thực bào tại chỗ, có tác dụng loại trừ các tác nhân gây viêm và sửa chữa tổn thương, đồng thời kèm theo các biểu hiện bệnh lý. Phản ứng viêm tiến triển thành 2 giai đoạn. Giai đoạn thứ nhất tiến triển rất nhanh, là giai đoạn cấp tính. Giai đoạn thứ 2 bao gồm những hiện tượng phức tạp, là sự phối hợp của những hiện tượng viêm và những quá trình sửa chữa được gọi là giai đoạn viêm mạn tính [2],[22].

Giai đoạn viêm cấp tính gồm những hiện tượng về mạch máu và phản ứng tế bào xuất hiện sớm. Những hiện tượng cấp tính này là do sự can thiệp của 2 yếu tố: yếu tố thần kinh (sự tê liệt của các dây thần kinh co mạch ở các mao mạch) và yếu tố thể dịch (sự giải phóng các chất trung gian hóa học như histamin, serotonin, bradykinin..) [22]. Hai yếu tố thần kinh và thể dịch trên đã gây ra các triệu chứng đặc trưng của viêm cấp trên lâm sàng là: sưng, nóng, đỏ và đau.

Khi gan bị nhiễm độc thường có quá trình viêm. Trong và sau quá trình viêm gan sẽ có sự sửa chữa của tế bào với các thương tổn. Đánh giá tác dụng chống viêm của thuốc sẽ góp phần giải thích cho cơ chế bảo vệ và làm tăng phục hồi tổn thương gan của thuốc nghiên cứu.

Để đánh giá tác dụng chống viêm cấp của thuốc nghiên cứu trên thực nghiệm, hiện nay thường sử dụng 2 mô hình là đánh giá tác dụng của thuốc trên mô hình gây phù chân chuột và trên mô hình gây viêm màng bụng.

4.4.2.1. Tác dụng chống viêm cấp của CTP và PDE trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin

Chất gây viêm sử dụng trong nghiên cứu này là carrageenin (một loại polysacarid sunfat hóa có nguồn gốc từ tảo đỏ *Chondrus Crispus*) [156]. Bản chất carrageenin là polysacarid có cấu trúc giống với cấu trúc vỏ vi khuẩn, vì vậy đáp ứng miễn dịch của cơ thể chủ yếu là đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với sự tham gia chủ yếu của đại thực bào, bạch cầu đa nhân trung tính. Cơ chế gây viêm chính của carrageenin là thông qua quá trình phân giải protein với sự hình thành các chất trung gian hóa học giống như kinin. Biểu hiện của quá trình viêm này là giãn mạch, bạch cầu xuyên mạch, tăng tiết các chất trung gian hóa học như prostaglandin, histamin, leucotrien, bradykinin, biểu hiện quan sát thấy chủ yếu là triệu chứng phù tại mô viêm [156],[157].

Aspirin (acid acetylsalicylic) là thuốc thuộc nhóm chống viêm không steroid, có cơ chế tác dụng chống viêm rõ và thường được sử dụng để chống viêm trên lâm sàng [40]. Charles A. Winter (1962) đã chứng minh aspirin có tác dụng ức chế phù chân chuột cống trắng rất tốt khi gây phù bằng carrageenin [157]. Vì lý do đó, chúng tôi đã sử dụng aspirin làm thuốc chứng dương trong các nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của quả Dứa dại.

Mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin đã được rất nhiều tác giả trên thế giới và trong nước áp dụng trong nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của thuốc trên thực nghiệm [158],[159],[160],[161],[162].

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở lô chứng, tại thời điểm 4 giờ sau khi gây viêm, thể tích chân chuột tăng nhiều nhất (47,94 %). Sau đó độ tăng thể tích chân chuột giảm dần (bảng 3.37). Kết quả này phù hợp với nhận xét của một số tác giả khi tiến hành nghiên cứu tác dụng gây viêm cấp của carrageenin trên mô hình gây phù chân chuột: mức độ sưng phù chân chuột cao nhất

thường ở thời điểm 2 giờ 30 đến 4 giờ sau khi gây viêm [157],[163].

Kết quả ở bảng 3.37 và 3.38 cho thấy, *tại thời điểm 2 giờ* sau gây viêm bằng carrageenin, hai lô uống PĐE và lô uống CTP liều cao đã bắt đầu thể hiện tác dụng chống viêm, ức chế được phản ứng phù viêm theo thứ tự là 27,82%, 35,09% và 38,60% so với lô chứng ($p < 0,05$). Lô uống CTP liều 1 có xu hướng ức chế phản ứng phù viêm so với lô chứng (7,15%) nhưng không rõ rệt. Tác dụng chống viêm cấp tiếp tục được duy trì đến *thời điểm 4 giờ* sau khi gây viêm với khả năng ức chế phản ứng phù tương ứng ở 2 lô uống PĐE và CTP là 20,39% , 33,02% và 24,06% so với lô chứng.

Aspirin thể hiện tác dụng chống viêm mạnh nhất tại thời điểm 2 giờ sau khi gây viêm, phù hợp với đặc điểm dược động học và tác dụng của aspirin. Mức độ ức chế phản ứng phù tại thời điểm 2 giờ là 49,9%, cao hơn cả 4 lô uống thuốc thử CTP và PĐE. Sau đó, mức độ ức chế phản ứng phù của aspirin giảm dần ở các thời điểm sau. Trong khi đó, ở thời điểm 4 giờ sau khi gây viêm, PĐE liều 2 thể hiện mức độ ức chế phản ứng phù mạnh nhất (33,02%)

Tại thời điểm 6 giờ sau khi gây viêm, độ tăng thể tích chân chuột ở tất cả các lô uống thuốc thử và thuốc chứng dương có thấp hơn so với lô chứng, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Tại thời điểm 24 giờ sau khi gây viêm, không có sự khác biệt về độ tăng thể tích chân chuột giữa tất cả các lô nghiên cứu ($p > 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy CTP liều 2 và cả 2 liều PĐE có tác dụng chống viêm cấp rõ rệt trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin. PĐE liều cao thể hiện mức độ ức chế phản ứng phù mạnh nhất từ thời điểm 4 giờ (bảng 3.37). Riêng lô uống CTP liều 1 chưa thể hiện tác dụng chống viêm cấp.

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của lá cây Dứa dại trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin của Ramesh Londonkar tiến hành năm 2010 [87]. Theo tác giả này, tỷ lệ ức chế phù chân chuột của các lô dùng cao chiết methanol từ lá Dứa dại tại thời điểm 3 giờ sau gây viêm tương đương với diclofenac. Ở các liều uống cao chiết lá

Dứa dại khác nhau từ 25 mg/kg đến 100 mg/kg, tỷ lệ ức chế phù chân chuột từ 35% đến 67%. Kết quả này cho thấy cây Dứa dại với nhiều bộ phận dùng khác nhau đều có thể có tác dụng chống viêm cấp trên thực nghiệm.

4.4.2.2. Tác dụng chống viêm cấp của CTP và PĐE trên mô hình gây viêm màng bụng bằng carrageenin

Trên mô hình gây viêm màng bụng, ngoài việc dùng kháng nguyên là carrageenin còn dùng thêm formaldehyd nồng độ thấp, vì vậy mô hình này sẽ khởi động các quá trình viêm cấp với sự đáp ứng của các tế bào miễn dịch là các bạch cầu đa nhân trung tính và tăng tiết dịch vào vị trí gây viêm [157]. Khi xảy ra phản ứng viêm, tại ổ viêm có bộ ba biến đổi chủ yếu là rối loạn tuần hoàn, rối loạn chuyển hóa và tổn thương mô kèm theo tăng sinh tế bào. Rối loạn tuần hoàn tại ổ viêm thường xảy ra sớm (ngay khi yếu tố gây viêm tác động lên cơ thể) và dễ thấy nhất. Các hiện tượng có thể thấy khi rối loạn tuần hoàn tại ổ viêm là: rối loạn vận mạch, tạo dịch rỉ viêm, bạch cầu xuyên mạch và hiện tượng thực bào [2].

Thông qua việc đánh giá hiện tượng tạo dịch rỉ viêm trong rối loạn tuần hoàn để đánh giá tác dụng chống viêm cấp của thuốc nghiên cứu. Dịch rỉ viêm gồm 2 thành phần chính: các thành phần từ máu thoát ra (nước, protein huyết tương ...) và thành phần hữu hình (hồng cầu, tiểu cầu và chủ yếu là bạch cầu). Trong nghiên cứu này chúng tôi đo thể tích dịch rỉ viêm, đếm số lượng bạch cầu và định lượng protein trong dịch rỉ viêm để chứng minh tác dụng chống viêm cấp của CTP và PĐE trên mô hình gây viêm màng bụng bằng carrageenin.

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.39 cho thấy: Lô uống aspirin liều 200 mg/kg, lô CTP liều 2 cũng như cả 2 lô uống PĐE có tác dụng làm giảm rõ rệt thể tích dịch rỉ viêm so với lô chứng ($p < 0,001$, $p < 0,01$ và $p < 0,05$), trong đó lô uống PĐE, đặc biệt PĐE liều cao có tác dụng rõ nhất. Riêng lô CTP liều 1 có thể tích dịch rỉ viêm ít hơn so với lô chứng nhưng sự khác biệt không rõ rệt.

Aspirin liều 200 mg/kg, CTP liều 2 cũng như 2 liều PDE đồng thời có tác dụng làm giảm rõ rệt số lượng bạch cầu và hàm lượng protein trong dịch màng bụng chuột so với lô chứng ($p < 0,001$, $p < 0,01$ và $p < 0,05$).

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy CTP liều 2 và 2 liều PDE có tác dụng chống viêm cấp rõ rệt trên mô hình gây viêm màng bụng bằng carrageenin. So với aspirin - một thuốc thường được chỉ định trong các trường hợp viêm cấp trên lâm sàng, CTP liều cao và cả 2 liều PDE có tác dụng tương đương (thể tích dịch rỉ viêm và số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm) hoặc kém hơn (hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm). Tác dụng chống viêm cấp của CTP liều cao và 2 liều PDE không có sự khác biệt.

Riêng lô CTP liều 1, tác dụng chống viêm cấp trên mô hình này không rõ rệt. Điều này phù hợp với kết quả tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin mà chúng tôi đã thực hiện và trình bày tại mục 4.4.2.1.

4.4.3. Tác dụng chống viêm mạn của CTP và PDE

Khi những triệu chứng xuất hiện sớm của phản ứng viêm đã giảm đi, ổ viêm bị xâm chiếm bởi những tế bào di động từ máu và từ mô liên kết ở kề bên tới như những tế bào của mô lưới. Chúng tạo thành một khối tế bào non rất hoạt động, làm 2 nhiệm vụ là thực bào và tập trung quanh những vùng hoại tử và những vật lạ, gây nên sự tăng sinh nguyên bào sợi và sự tạo thành mô hạt. Trong nghiên cứu thực nghiệm, người ta có thể tạo thành mô hạt bằng cách cấy dưới da động vật những vật lạ hoặc chất kích ứng không hấp thu được. Những vật lạ và chất kích ứng này đều gây ra một phản ứng với mô bào lưới và tạo thành u hạt [22].

Mô hình gây viêm mạn sử dụng các kháng nguyên phụ thuộc tuyến ức (như amiant, protein, virus). Khi cấy amiant là một vật lạ không tiêu vào dưới da gáy của chuột sẽ khởi động quá trình đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào là phương thức miễn dịch thứ hai bên cạnh đáp ứng miễn dịch dịch thể nhằm loại trừ kháng nguyên lạ, carrageenin có bản chất là polysaccharid, có

khả năng kích thích quá trình viêm [156]. Cây amiant đã nhúng carrageenin vào dưới da chuột sẽ kích thích quá trình viêm mạnh hơn chỉ cây amiant đơn thuần. Khi đó cơ thể chuột sẽ phản ứng viêm bằng cách tập trung nhiều tế bào, tạo ra mô bào lưới, nguyên bào sợi bao quanh vật lạ, tạo nên hình ảnh u hạt của mô hình viêm mạn trên thực nghiệm [164],[165].

Methylprednisolon là thuốc chống viêm steroid kinh điển, thường được sử dụng trong lâm sàng, tác dụng chủ yếu chống viêm mạn tính do ức chế đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào do các lympho T đảm nhận. Tác dụng này thông qua ức chế sự tăng sinh các tế bào lympho T do làm giảm sản xuất interleukin 1 và interleukin 2, giảm hoạt tính gây độc của các tế bào lympho T và các tế bào NK (natural killer: tế bào diệt tự nhiên) [40]. Vì vậy methylprednisolon được dùng làm thuốc chứng dương trên mô hình gây viêm mạn tính.

Thuốc nghiên cứu có tác dụng chống viêm mạn sẽ ức chế sự tạo thành u hạt, làm giảm khối lượng u hạt tạo thành so với nhóm chứng không dùng thuốc. Thông qua việc so sánh trọng lượng u hạt giữa lô gây mô hình viêm mạn nhưng không dùng thuốc và các lô uống thuốc thử và thuốc đối chứng, có thể đánh giá được thuốc có tác dụng chống viêm mạn hay không.

Kết quả ở bảng 3.40 cho thấy hai lô uống CTP liều 2 và PĐE liều 2 đều có tác dụng ức chế sự tạo thành u hạt sau khi gây viêm rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,05$ và $p < 0,01$) và tương đương với lô uống methylprednisolon, Tỷ lệ giảm trọng lượng u hạt ở lô uống CTP liều 2 là 24,5%, PĐE liều 2 là 24,0% và methylprednisolon là 33,5%. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa trọng lượng u hạt của các lô uống thuốc thử so với nhau và so với lô uống methylprednisolon ($p > 0,05$).

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy CTP và PĐE liều tương đương với 14,4 g dược liệu khô/kg có tác dụng chống viêm mạn rõ rệt, tương đương với methylprednisolon 15 mg/kg trên thực nghiệm.

Cho đến thời điểm hiện tại, chúng tôi chỉ tìm thấy một nghiên cứu duy nhất về tác dụng chống viêm của cây Dứa dại *Pandanus odoratissimus* L.f.

trên thực nghiệm [87]. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã sử dụng 3 phương pháp nghiên cứu khác nhau để đánh giá tác dụng chống viêm bao gồm: gây phù chân chuột bằng carrageenin (đã trình bày ở phần trên), gây viêm cấp trên da chuột (phù da) bằng dầu croton (chiết xuất từ hạt của cây bã đậu *Croton tiglium* có chứa thành phần 12-O-Tetra Decanoyl Phorbol-13-Acetate (TPA)- một chất gây viêm) và nghiên cứu tác dụng chống viêm trên mô hình sử dụng formalin 2% gây phù chân chuột.

Kết quả nghiên cứu tác dụng chống viêm của chiết xuất lá đại *Pandanus odoratissimus* L.f. bằng phương pháp gây phù chân chuột bằng formalin 2% cho thấy cao chiết lá Dứa đại ở các liều 25, 50 và 100 mg/kg có tác dụng ức chế phản ứng phù tương ứng là 42,2%, 52,3% và 64,2%, tương đương với diclofenac. Kết quả này đã cho thấy tác dụng chống viêm của chiết xuất từ lá Dứa đại *Pandanus odoratissimus* L. f. trên thực nghiệm, đồng thời góp phần minh chứng rõ hơn tác dụng chống viêm của CTP và PDE trên thực nghiệm.

4.4.4. Tác dụng chống oxy hóa in vitro

Gốc tự do là những tiểu phân hóa học, có thể là nguyên tử, phân tử, các ion (anion và cation) mà lớp điện tử ngoài cùng có chứa điện tử không cặp đôi (điện tử cô độc hoặc hóa trị tự do). Số lượng điện tử không cặp đôi có thể là một hoặc nhiều. Gốc tự do có thể là nguyên tử ($\text{Cl} \cdot$, $\text{O}_2 \cdot^-$), là nhóm nguyên tử ($\text{CH}_3 \cdot$, $\cdot\text{OH}$), là phân tử (NO_2 , NO) [21]. Hầu như tất cả các trạng thái bệnh lý quan trọng đều do các gốc tự do có chứa oxy (ROS: Reactive oxygen species: các dạng oxy phản ứng) gây ra, bao gồm gốc hydroxyl, gốc anion superoxid, hydro peroxid, hypochlorit, oxy đơn bội, gốc oxit nitric và gốc peroxynitrit. Các gốc tự do này có thể tác động tới màng hoặc nhân tế bào, gây ra các phản ứng sinh học có hại cho phân tử DNA, protein, carbohydrat và lipid [24]. Các gốc tự do tấn công các đại phân tử quan trọng dẫn đến tổn thương tế bào và phá vỡ cân bằng nội môi gây ra chết tế bào [25].

Trong cơ thể luôn có sự cân bằng nội môi giữa ROS và các chất chống oxy hóa. Khi cơ thể nhiễm chất độc, stress tâm lý, viêm, nhiễm khuẩn ... làm

tăng cao số lượng các ROS trong cơ thể dẫn đến sự mất cân bằng giữa các chất chống oxy hóa với các ROS gọi là stress oxy hóa [23]. Stress oxy hóa gây ra rất nhiều bệnh lý cho cơ thể như liên quan đến quá trình lão hóa [19], bệnh lý tim mạch [17], biến chứng mạch máu trên bệnh nhân đái tháo đường [18], viêm phổi tắc nghẽn mạn tính [166], bệnh thận mạn tính [167], hư hại DNA gây ung thư [168].....

Stress oxy hóa có vai trò lớn trong phát sinh bệnh lý tại gan. Hiện nay các nhà khoa học trên thế giới đã chứng minh được vai trò của stress oxy hóa trong bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu [169], bệnh gan do thiếu máu cục bộ [170], bệnh gan do rượu [171], trong xơ hóa gan [172],[173], viêm gan siêu vi và tổn thương gan do thuốc [174].

Chất chống oxy hóa là những chất có khả năng ngăn ngừa, chống lại và loại bỏ tác dụng độc hại của các ROS một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Các chất chống oxy hóa được chia thành 2 nhóm khác nhau bao gồm: các chất chống oxy hóa có bản chất enzym (như superoxid dismutase, glutathion peroxydase, catalase) và các chất chống oxy hóa không có bản chất enzym (có nguồn gốc nội sinh như vitamin A, glutathion, glycin, methionin ...hoặc có nguồn gốc ngoại sinh như các nhóm vitamin C, vitamin E, flavonoid, lignan, alkaloid, coumarin, terpen, carotenoid...có nhiều trong thực vật) [175]. Khi nguồn chất chống oxy hóa nội sinh không đáp ứng đủ nhu cầu của cơ thể, chúng ta cần đưa những chất chống oxy hóa có nguồn gốc ngoại sinh vào để bù đắp sự thiếu hụt này nhằm tăng cường khả năng bảo vệ của cơ thể chống lại các bệnh lý do stress oxy hóa gây ra. Vì vậy việc tìm ra các chất chống oxy hóa ngoại sinh có nguồn gốc thực vật để đáp ứng nhu cầu của cơ thể là rất quan trọng.

Hiện nay có rất nhiều mô hình nghiên cứu đánh giá tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của dược liệu đã được áp dụng như: khả năng dọn gốc tự do DPPH, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$, phương pháp xanthin oxydase, khả năng tạo chelat với kim loại, khả năng hấp thụ gốc tự do oxy, khả năng chống oxy hóa tương

đương với Trolox..., trong đó phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do đang được áp dụng nhiều vì dễ thực hiện và có giá thành thấp [176].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của CTP và PĐE nhằm chứng minh một phần cơ chế tác dụng của quả Dứa dại trong các bệnh lý gan theo phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH và anion superoxid.

4.4.4.1. Tác dụng chống oxy hóa invitro của CTP và PĐE thông qua phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) có đặc điểm là một gốc tự do có tính bền vững do hiệu lực của sự bất định xứ (delocalisation) của electron không cặp đôi trên toàn bộ phân tử, chính vì vậy phân tử không bị nhị trùng hóa (dimerise), đây là một đặc điểm khác với hầu hết các gốc tự do khác. Electron không cặp đôi ổn định này khi kết hợp với dung dịch methanol sinh ra phức chất có màu tím đậm khi đo độ hấp thụ quang ở bước sóng trong khoảng 517 - 520 nm. Khi phức chất giữa DPPH và methanol được hòa tan với các chất chống oxy hóa, màu tím của phức chất sẽ nhạt đi [105],[176].

Quercetin là một chất đã được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa tốt thông qua tác động làm giảm ROS và NO (nitric oxid) do nội độc tố LPS (lipopolysaccharid) gây ra [177]. Vì vậy chúng tôi sử dụng quercetin - một flavonoid có trong nhiều loại thực vật làm chất đối chứng trong nghiên cứu này.

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.41 cho thấy giá trị IC_{50} của các mẫu thử chiết xuất từ Dứa dại. Phân đoạn ethyl acetat (PĐE) có khả năng dọn gốc tự do DPPH tốt, với giá trị IC_{50} là 29,1 $\mu\text{g/ml}$, trong khi CTP có $IC_{50} > 200$ $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên khả năng dọn gốc tự do DPPH của PĐE còn kém hơn quercetin (IC_{50} là 1,88 $\mu\text{g/ml}$) là *một chất* chống oxy hóa rất tốt, được sử dụng làm thuốc chứng dương trong nhiều nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa *in vitro*. Trong phân đoạn PĐE chiết xuất từ Dứa dại có *nhiều chất* khác nhau, có chất có tác dụng chống oxy hóa nhưng cũng có chất không có tác dụng này. Vì vậy, theo chúng tôi, giá trị IC_{50} của PĐE mặc dù cao hơn quercetin, nhưng cũng

bước đầu cho thấy PDE có tác dụng chống oxy hóa tốt. Nếu có điều kiện nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ phân tích khả năng dọn gốc tự do DPPH của các *chất* có trong phân đoạn PDE như một nghiên cứu mà tác giả Trần Thị Anh đã thực hiện khi nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của cây Vằng trầu [178].

Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu về tác dụng dọn gốc tự do DPPH của quả Dứa dại của các tác giả Nguyễn Công Thùy Trâm [91] và J.M. Sasikumar [89]. Cao chiết ethyl acetat từ quả Dứa dại có giá trị SC_{50} (Scavenging Concentration at 50% - nồng độ trung hòa được 50% gốc tự do của DPPH) là 19,03 $\mu\text{g/ml}$ và $IC_{50} < 2 \text{ mg/ml}$. Trong một nghiên cứu khác, hoạt tính chống oxy hóa *invitro* của rễ cây Dứa dại cũng đã được chứng minh: Cao chiết methanol từ rễ Dứa dại có khả năng dọn gốc tự do DPPH với giá trị EC_{50} là 48,3 $\mu\text{g/ml}$ [90].

4.4.4.2. Tác dụng chống oxy hóa *invitro* của CTP và PDE thông qua phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do anion superoxid ($O_2^{\bullet-}$)

Gốc tự do anion superoxid ($O_2^{\bullet-}$) là sản phẩm trung gian được sinh ra trong quá trình hô hấp tế bào, thông qua phản ứng phụ Haber – Weiss xảy ra giữa gốc tự do superoxid $O_2^{\bullet-}$ và hydrogen peroxid (H_2O_2) tạo nên 2 gốc tự do mới có khả năng phản ứng mạnh và rất độc hại là hydroxyl ($HO^{\bullet}$) và oxygen đơn bội (singlet oxygen). Hai gốc tự do này là nguyên nhân chính gây ra các quá trình peroxid lipid màng tế bào dẫn đến tổn thương màng và gây chết tế bào [176],[179]. Thông qua việc đánh giá khả năng bắt gốc tự do anion superoxid $O_2^{\bullet-}$ có thể đánh giá tác dụng chống oxy hóa của các phân đoạn hoạt chất của quả Dứa dại.

Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.42 cho thấy CTP không có khả năng dọn gốc tự do anion superoxid ($IC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$), trong khi PDE có khả năng dọn gốc tự do anion superoxid khá tốt, $IC_{50} = 23,8 \mu\text{g/ml}$. Quercetin có tác dụng dọn gốc tự do anion superoxid rất mạnh, $IC_{50} = 2,6 \mu\text{g/ml}$. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa thông qua đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH mà chúng tôi đã trình bày ở mục 4.4.4.1.

Trong nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của lá Dứa dại thông qua phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do superoxid $O_2^{\bullet-}$, R. Londonkar và cộng sự đã kết luận cao chiết methanol lá Dứa dại đã ức chế 74,12% gốc tự do superoxid $O_2^{\bullet-}$ [88].

Kết quả nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa *in vitro* trên 2 mô hình trên cho thấy chỉ phân đoạn PĐE có tác dụng chống oxy hóa *in vitro* rõ rệt.

Khi nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa *in vitro*, chúng tôi cũng đã đánh giá thêm tác dụng của các phân đoạn khác chiết xuất từ quả Dứa dại là phân đoạn *n*-hexan (kém phân cực) và phân đoạn nước (phân cực cao). Kết quả cho thấy trong 4 mẫu đã thử tác dụng chống oxy hóa *in vitro* (CTP, PĐE, *n*-hexan và nước), mẫu PĐE thể hiện tác dụng tốt nhất, hơn hẳn các mẫu nghiên cứu khác. Đó cũng là một trong những lý do để chúng tôi định hướng lựa chọn mẫu PĐE trong các nghiên cứu tiếp theo.

Thêm vào đó, các kết quả nghiên cứu khác về tác dụng chống oxy hóa *in vivo*, *in vitro* [89],[92], đã góp phần minh chứng tác dụng chống oxy hóa của cây Dứa dại.

Tác dụng chống oxy hóa *in vitro*: Thông qua phương pháp đánh giá khả năng bắt nitric oxid và gốc hydroxyl: dịch chiết methanol của lá *Pandanus odoratissimus* L. f. đã ức chế 73,55% nitric oxid và ức chế 78,14% gốc hydroxyl [89].

Tác dụng chống oxy hóa *in vivo*: Gây tổn thương gan bằng CCl_4 trên chuột Wistar, cao chiết methanol *Pandanus odoratissimus* L. f. liều 50 và 100 mg/kg bên cạnh việc làm giảm có ý nghĩa ($p < 0,05$) transaminase (AST, ALT), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin, uric acid, còn làm giảm lipid peroxidation (LPO) và tăng có ý nghĩa superoxid dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion (GSH) [92].

Tóm lại, qua nghiên cứu về độc tính và tác dụng của 2 mẫu thử CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại trên thực nghiệm, các kết quả nghiên cứu trong luận án đã đánh giá được độc tính cấp và độc tính bán trường diễn, tác dụng chống tổn thương gan cấp trên mô hình gây viêm gan bằng PAR (tác dụng bảo

vệ gan và tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan), tác dụng chống xơ hóa gan trên mô hình gây xơ gan bằng CCl_4 . Đồng thời luận án đã đánh giá một số tác dụng dược lý liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ hóa gan là tác dụng lợi mật, chống viêm (cấp và mạn) và tác dụng chống oxy hóa *in vitro* để làm rõ hơn các tác dụng và góp phần chứng minh một phần cơ chế tác dụng của mẫu thử.

Các kết quả nghiên cứu tác dụng chống viêm gan, xơ hóa gan và một số tác dụng dược lý liên quan đã cho thấy mẫu PĐE thể hiện một số tác dụng *tốt hơn* mẫu CTP.

Hai liều CTP và PĐE đã dùng trong nghiên cứu (liều 1 tương đương 7,2 g dược liệu/ kg và liều 2 tương đương 14,4 g dược liệu/kg) thể hiện *tác dụng tương đương nhau* trong tác dụng bảo vệ gan. Liều thấp hơn (tương đương 7,2 g dược liệu/kg) đã thể hiện rõ tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan, tương đương silymarin. Vì vậy, theo chúng tôi, nên lựa chọn mẫu PĐE, chỉ với liều thấp hơn (tương đương 7,2 g dược liệu/kg - liều có tác dụng tương đương liều lâm sàng) để đánh giá tác dụng chống tổn thương gan cấp. Riêng tác dụng chống xơ hóa gan chưa thể hiện rõ với mức liều tương đương 7,2 g dược liệu/kg, nếu có điều kiện nên tiếp tục nghiên cứu với các mức liều cao hơn.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu về độc tính và tác dụng chống viêm gan, xơ gan của CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại trên thực nghiệm, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của CTP và PĐE

CTP và PĐE có tính an toàn cao trên thực nghiệm.

1.1. Độc tính cấp

Chưa xác định được độc tính cấp của CTP và PĐE trên chuột nhắt trắng theo đường uống khi cho chuột uống CTP đến liều tương đương 1035 g được liệu/kg/24 giờ và PĐE đến liều tương đương 6750 g được liệu/kg/24 giờ.

1.2. Độc tính bán trường diễn của PĐE

PĐE liều tương đương 4,2 g được liệu/kg/ngày và 12,6 g được liệu/kg/ngày, uống liên tục trong 8 tuần không gây độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng thực nghiệm.

2. Tác dụng chống tổn thương gan cấp, xơ gan và một số tác dụng liên quan

2.1. Tác dụng chống tổn thương gan cấp

- *Tác dụng bảo vệ gan:* CTP và PĐE với 2 liều tương đương 7,2 g được liệu/kg/ngày và 14,4 g được liệu/kg/ngày có tác dụng bảo vệ gan trên chuột nhắt trắng khi gây độc bằng PAR 400 mg/kg.

- *Tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan:* CTP và PĐE với liều tương đương 7,2 g được liệu/kg/ngày có tác dụng làm tăng phục hồi tổn thương gan trên chuột nhắt trắng khi gây độc bằng PAR 400 mg/kg.

2.2. Tác dụng chống xơ hóa gan

- CTP và PĐE liều tương đương 7,2 g được liệu/kg có xu hướng làm hạn chế tổn thương xơ hóa gan trên chuột nhắt trắng khi gây độc bằng CCl₄ dài ngày.

- PĐE thể hiện tác dụng tốt hơn CTP trong nghiên cứu tác dụng chống xơ hóa gan.

2.3. Một số tác dụng liên quan đến tác dụng chống viêm gan, xơ hóa gan

- *Tác dụng lợi mật*: CTP và PĐE với 2 liều tương đương 7,2 g được liệu/kg/ngày và 14,4 g được liệu/kg/ngày đều có tác dụng lợi mật. PĐE liều 14,4 g được liệu/kg/ngày có tác dụng lợi mật tốt hơn actiso.

- *Tác dụng chống viêm*:

▪ *Tác dụng chống viêm cấp*: CTP liều tương đương 8,4 g được liệu/kg/ngày và cả 2 liều PĐE (liều tương đương 4,2 g được liệu/kg/ngày và 8,4 g được liệu/kg/ngày) có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột và gây viêm màng bụng chuột cống trắng thực nghiệm.

▪ *Tác dụng chống viêm mạn*: CTP và PĐE liều tương đương với 14,4 g được liệu/kg/ngày có tác dụng chống viêm mạn rõ rệt trên mô hình gây viêm thực nghiệm bằng amiant ở chuột nhắt trắng.

- *Tác dụng chống oxy hóa in vitro*: PĐE có tác dụng chống oxy hóa *in vitro*, thông qua khả năng dọn gốc tự do DPPH với giá trị IC₅₀ là 29,1 µg/ml và khả năng dọn gốc tự do anion superoxid với giá trị IC₅₀= 23,8 µg/ml.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu về độc tính và tác dụng của 2 mẫu thử CTP và PĐE chiết xuất từ quả Dứa dại trên thực nghiệm, chúng tôi đề xuất một số kiến nghị sau:

- Lựa chọn mẫu PĐE để tiếp tục các bước nghiên cứu tiếp theo.
- Khuyến cáo chỉ cần dùng liều tương đương liều dự kiến dùng trên người, không cần dùng liều cao hơn trong điều trị viêm gan cấp.
- Riêng tác dụng chống xơ hóa gan chưa thể hiện rõ ở mức liều tương đương liều dự kiến dùng trên người, nên tiếp tục nghiên cứu với các mức liều cao hơn có thể thấy rõ tác dụng hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tạ Thành Văn (2018). *Hóa sinh*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 353 - 365.
2. Nguyễn Ngọc Lanh, Văn Đình Hoa, Phan Thị Thu Anh và các cộng sự (2019). *Sinh lý bệnh học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 209-229, 390-409.
3. Vũ Bằng Đình, Đặng Kim Thanh (2005). *Viêm gan virus và những hậu quả*, Nhà xuất bản Y học, 382 - 400.
4. R G Gish, Tam D Bui, Chuc TK Nguyen et al (2012). "Liver disease in Viet Nam: Screening, surveillance, management and education: A 5-year plan and call to action", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27(2), 238-247.
5. Tran Huu Bich, Pham Thi Quynh Nga, La Ngoc Quang et al (2009). "Patterns of alcohol consumption in diverse rural populations in the Asian region", *Global health action*, 2(1), 28-34.
6. Ngoan Tran Le, Lua Thi Nguyen and Hang Thi Minh Lai (2007). "Cancer mortality pattern in Viet Nam", *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 8(4), 535-538.
7. Đỗ Huy Bích, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm và các cộng sự (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tập 1, 401 - 403, 416 - 423, 700 - 701, 746 - 747.
8. Viện Dược Liệu (2016), *Danh lục cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 326.
9. Nguyễn Văn Hưng và cộng sự (2018). *Giải phẫu bệnh học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 345-363.
10. Các bộ môn nội Trường Đại học Y Hà Nội (2004). *Bài giảng bệnh học nội khoa*, Nhà xuất bản Y học, Hà nội, tập 2, 154-169.
11. A I Cederbaum (2012). "Alcohol metabolism", *Clinics in liver disease*, 16(4), 667-685.
12. CS Lieber (1990). "Mechanism of ethanol induced hepatic injury", *Pharmacology & therapeutics*, 46(1), 1-41.

13. R Teschke, (2019). "Microsomal Ethanol-Oxidizing System: Success Over 50 Years and an Encouraging Future", *Alcohol Clin Exp Res*, 43(3), 386-400.
14. PM Dansette, E Bonierbale, C Minoletti et al (1998). "Drug-induced immunotoxicity", *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 23(4), 443-451.
15. D Larrey (2000). "Drug-induced liver diseases", *Journal of hepatology*, 32, 77-88.
16. WM Lee (2003). "Drug-induced hepatotoxicity", *New England Journal of Medicine*, 349(5), 474-485.
17. P Abete, C Napoli, G Santoro et al (1999), "Age-related decrease in cardiac tolerance to oxidative stress", *J Mol Cell Cardiol*, 31(1), 227-236.
18. R D Cristofaro, B Rocca, E Vitacolonna et al (2003). "Lipid and protein oxidation contribute to a prothrombotic state in patients with type 2 diabetes mellitus", *J Thromb Haemost*, 1(2), 250-256.
19. A Pole, M Dimri and G P Dimri (2016). "Oxidative stress, cellular senescence and ageing", *AIMS Molecular Science*, 3(3).
20. K H Cheeseman and T F Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry", *Br Med Bull*, 49(3), 481-493.
21. Nguyễn Thị Hà (1999). *Gốc tự do và các chất chống oxy hóa, những vấn đề hóa sinh học hiện đại*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 195-217.
22. Nguyễn Thượng Dong và cộng sự (2006). *Phương pháp nghiên cứu tác dụng của thuốc từ dược thảo*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 139-150, 171-196, 279-286, 311-320.
23. G J Burton and E Jauniaux (2011). "Oxidative stress", *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 25(3), 287-299.
24. I S Young and J V Woodside (2001). "Antioxidants in health and disease", *J Clin Pathol*, 54(3), 176-86.

25. V Lobo, A Patil, A Phatak et al (2010). "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health", *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
26. Nguyễn Sào Trung và cộng sự (2015). *Bài giảng lý thuyết giải phẫu bệnh*, Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch TP Hồ Chí Minh, 175-193, 271-282.
27. D Li and S L Friedman (1999). "Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 14(7), 618-633.
28. S Lotersztajn, B Julien, F Teixeira-Clerc et al (2005), "Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets", *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 605-628.
29. Lê Xuân Trường (2015). *Hóa sinh lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Thành phố Hồ Chí Minh, 105-141.
30. Nguyễn Lâm Việt Ngô Quý Châu, Nguyễn Đạt Anh và cộng sự (2018). *Bệnh học nội khoa*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tập 2, 9-17.
31. Bộ Y Tế (2016), *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh viêm gan virus C*, Quyết định số 5012/QĐ-BYT ngày 20/09/2016 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
32. Y Yu, Y Mao, C Chen et al (2017). "CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury", *Hepatology international*, 11(3), 221-241.
33. Bộ Y Tế (2019), *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh viêm gan virus B*, Quyết định số 3310/QĐ-BYT ngày 29/7/2019 của Bộ trưởng Bộ Y tế.
34. T M Rahman and H J F Hodgson (2000). "Animal models of acute hepatic failure", *International journal of experimental pathology*, 81(2), 145-157.
35. Hoàng Thái Hoa Cương (2009). *Nghiên cứu tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan của rễ cây Mạ Mân (Aganope balansae (Ganepain) P. K. Loc, Fabaceae) trên thực nghiệm*, Luận văn thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
36. JC Mossanen and F Tacke (2015). "Acetaminophen-induced acute liver injury in mice", *Laboratory animals*, 49(1), 30-36.

37. P N Newsome, N C Henderson, L J Nelson et al (2010). "Development of an invasively monitored porcine model of acetaminophen-induced acute liver failure", *BMC gastroenterology*, 10(1), 34.
38. M Maes, M Vinken and H Jaeschke (2016). "Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure", *Toxicology and applied pharmacology*, 290, 86-97.
39. P Ichai and D Samuel (2011). "Epidemiology of liver failure", *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 35(10), 610-617.
40. Đào Văn Phan (2018). *Dược lý học*, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam, 141-159, 353-354, 447-454.
41. J A Hinson, D W Roberts and L P James (2010). "Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis", *Adverse drug reactions*, Springer, 369-405.
42. M A Tirmenstein and S D Nelson (1989). "Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver", *Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9814-9819.
43. L L Meyers, W P Beierschmitt, E A Khairallah et al (1988). "Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice", *Toxicol Appl Pharmacol*, 93(3), 378-387.
44. M R McGill, M R Sharpe, C D Williams et al (2012). "The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation", *J Clin Invest*, 122(4), 1574-1583.
45. L P James, L Letzig, P M Simpson et al (2009). "Pharmacokinetics of acetaminophen-protein adducts in adults with acetaminophen overdose and acute liver failure", *Drug Metabolism and Disposition*, 37(8), 1779-1784.

46. A Ramachandran and H Jaeschke (2019). "Acetaminophen hepatotoxicity: A mitochondrial perspective", *Adv Pharmacol*, 85, 195-219.
47. C Saito, J J Lemasters and H Jaeschke (2010). "c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity", *Toxicology and applied pharmacology*, 246(1-2), 8-17.
48. C Latchoumycandane, C W Goh, M M K Ong et al (2007), "Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury", *Hepatology*, 45(2), 412-421.
49. M Shinohara, N Hanawa, B Saberi et al (2008), "Role of JNK Translocation to Mitochondria Leading to Inhibition of Mitochondria Bioenergetics in Acetaminophen-Induced Liver Injury", *Gastroenterology*, 134(4), 766.
50. Y Masubuchi, C Suda and T Horie (2005). "Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice", *J Hepatol*, 42(1), 110-116.
51. M L Bajt, C Cover, J J Lemasters et al (2006). "Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury", *Toxicological Sciences*, 94(1), 217-225.
52. C Cover, A Mansouri, T R Knight et al (2005). "Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(2), 879-887.
53. S U Ruepp, R P Tonge, J Shaw et al (2002). "Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver", *Toxicological sciences*, 65(1), 135-150.
54. A F Mohamed, A G A Hasan, M I Hamamy et al (2005). "Antioxidant and hepatoprotective effects of *Eucalyptus maculata*", *Med Sci Monit*, 11(11), 426-431.

55. Nguyễn Mạnh Cường và các cộng sự (2016). "Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của rễ cây Xáo tam phân (*Paramingya trimera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng paracetamol", *Tạp chí Khoa học và công nghệ*, 54, 37-45.
56. Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Trọng Thông và các cộng sự (2014). "Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa của cao sói Nhật trên thực nghiệm", *Tạp chí Dược học*, 462, 26-36.
57. D K Ingawale, S K Mandlik and S R Naik (2014). "Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion", *Environ Toxicol Pharmacol*, 37(1), 118-133.
58. S C Yanguas, B Cogliati, J Willebrords et al (2016). "Experimental models of liver fibrosis", *Archives of toxicology*, 90(5), 1025-1048.
59. R C Zangar, J M Benson, V L Burnett et al (2000). "Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes", *Chem Biol Interact*, 125(3), 233-243.
60. L W D Weber, M Boll and A Stampfl (2003). "Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model", *Critical reviews in toxicology*, 33(2), 105-136.
61. S Basu (2003). "Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients", *Toxicology*, 189(1-2), 113-127.
62. B A Mico and L R Pohl (1983), "Reductive oxygenation of carbon tetrachloride: trichloromethylperoxyl radical as a possible intermediate in the conversion of carbon tetrachloride to electrophilic chlorine", *Arch Biochem Biophys*, 225(2), 596-609.
63. M Parola, E Albano, R Autelli et al (1990). "Inhibition of the high affinity Ca²⁺(+)-ATPase activity in rat liver plasma membranes following carbon tetrachloride intoxication", *Chem Biol Interact*, 73(1), 103-119.
64. P Morel, C Tallineau, R Pontcharraud et al (1998). "Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and

- Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes", *Neurochemistry international*, 33(6), 531-540.
65. M A Zamzami, O A S Baothman, F Samy et al (2019). "Amelioration of CCl₄-Induced Hepatotoxicity in Rabbits by *Lepidium sativum* Seeds", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1-17.
 66. Y Lee, I J Cho, J W Kim et al (2019). "Hepatoprotective effects of blue honeysuckle on CCl₄-induced acute liver damaged mice", *Food science & nutrition*, 7(1), 322-338.
 67. M Nirmala, K Girija, K Lakshman et al (2012). "Hepatoprotective activity of *Musa paradisiaca* on experimental animal models", *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(1), 11-15.
 68. K D Thrall, M E Vucelick, R A Gies et al (2000). "Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling", *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 60(8), 531-548.
 69. C Constandinou, N Henderson and J P Iredale (2005). "Modeling liver fibrosis in rodents", *Fibrosis Research*, Springer, 237-250.
 70. L Walkin, S E Herrick, A Summers et al (2013). "The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review", *Fibrogenesis & tissue repair*, 6(1), 18.
 71. M Domenicali, P Caraceni, F Giannone et al (2009). "A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse", *J Hepatol*, 51(6), 991-999.
 72. Truong Hai Nhung, Nguyen Hai Nam, Nguyen Thi Kim Nguyen et al (2014). "Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research", *Biomedical Research and Therapy*, 1(2), 43-49.
 73. R Saller, R Meier and R Brignoli (2001). "The use of silymarin in the treatment of liver diseases", *Drugs*, 61(14), 2035-2063.

74. Đỗ Tất Lợi (2006). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 227-230, 261, 625-629.
75. Trần Thuý, Trương Việt Bình và Hồ Hải Nam (1997). “Nghiên cứu tác dụng bài thuốc Nhân trần cao thang gia vị vào điều trị viêm gan, *Kỷ yếu công trình nghiên cứu Y học Viện Y học cổ truyền Việt Nam*, 27-34.
76. Nguyễn Nhượng Kim và Mai Thị Kim Loan (1999). "Góp phần đánh giá hiệu quả điều trị bệnh Viêm gan mạn tính và xơ gan giai đoạn còn bù bằng bài thuốc nghiệm phương YHCT", *Tạp chí Y học Cổ Truyền Việt Nam*, 302, 14-17.
77. Phạm Đức Dương (2001). “Đánh giá tác dụng điều trị của thuốc VG99 đối với một số chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng trên bệnh nhân viêm gan B mạn tính”, Luận văn tốt nghiệp bác sĩ nội trú bệnh viện, Trường Đại học Y Hà Nội.
78. Nguyễn Thị Tuyết Mai (2006). “Nghiên cứu tác dụng bảo vệ và phục hồi tổn thương gan cấp của curcuminoid trên thực nghiệm”, Luận văn Thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
79. Đặng Kim Thanh, Vũ Bằng Đình, Mai Tất Tố (2000). “Tác dụng của nước sắc lá chàm tía (*Strobilanthes cusia*. *Acanthaceae*) trên những bệnh nhân viêm gan virus cấp”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 1, 59-64.
80. Phạm Thị Cẩm Yên (2006). “Nghiên cứu thực nghiệm tác dụng bảo vệ gan và một số tác dụng dược lý liên quan của chế phẩm AH”, Luận văn Thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
81. Dương Thị Ly Hương (2004). “Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và độc tính cấp của củ tam thất trên súc vật thực nghiệm”, Luận văn Thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
82. Đỗ Huy Bích (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 1,700.
83. Võ Văn Chi (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 1, 834.

84. X Zhang, P Guo, G Sun et al (2012). "Phenolic compounds and flavonoids from the fruits of *Pandanus tectorius* Soland", *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(13), 2622-2626.
85. Nguyễn Mạnh Cường và các cộng sự (2015). "Chiết tách một số chất thuộc nhóm phenolic từ quả cây dứa dại *Pandanus odoratissimus* L.f ", *Tạp chí Hóa Học*, 53(4), 432-435.
86. P P Adkar and V H Bhaskar (2014), "Pandanus odoratissimus (Kewda): A review on ethnopharmacology, phytochemistry, and nutritional aspects", *Advances in pharmacological sciences*, 2014, 1-19.
87. R Londonkar et al (2010), "Anti-inflammatory activity of *Pandanus odoratissimus* extract", *International Journal of Pharmacology*, 6(3), 311-314.
88. R Londonkar and A Kamble (2009), "Evaluation of free radical scavenging activity of *Pandanus odoratissimus*", *International journal of pharmacology*, 5(6), 377-380.
89. Y Andriani, N M Ramli, D F Syamsumir et al (2019), "Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial and cytotoxicity properties of keys and cores part of *Pandanus tectorius* fruits", *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3555-3564.
90. J M Sasikumar, U Jinu and R Shamna (2009). "Antioxidant activity and HPTLC analysis of *Pandanus odoratissimus* L. root", *European Journal of Biological Sciences*, **1(2)**, 17-22.
91. Nguyễn Công Thùy Trâm và cộng sự (2017), "Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa in vitro của một số phân đoạn chiết và hợp chất phân lập từ quả cây Dứa dại (*Pandanus odoratissimus* L. f.)", *Tạp chí Y Dược học quân sự*, 6, 5-12.
92. R Londonkar and A Kamble (2011). "Hepatotoxic and invivo antioxidant potential of *Pandanus odoratissimus* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats", *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 11(4), 229-234.

93. A E Shaibany et al (2016). "Hepatoprotective effect of Pandanus odoratissimus l inflorescence extracts in acetaminophen-treated guinea pigs", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(2), 259-267.
94. G Mishra et al (2015). "Hepatoprotective potential of ethanolic extract of Pandanus odoratissimus root against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats", *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 7(1), 45.
95. R Ilanchezhian và R Joseph (2006), "Hepatoprotective and hepatocurative activity of the traditional medicine ketaki (Pandanus odoratissimus Roxb.)", *Asian Journal of Traditional Medicines*, 5(6), 212-218.
96. X Zhang, C Wu, H Wu et al (2013). "Anti-hyperlipidemic effects and potential mechanisms of action of the caffeoylquinic acid-rich Pandanus tectorius fruit extract in hamsters fed a high fat-diet", *PloS one*, 8(4), 1-12.
97. D S Kumar, S Kumar, J Singh et al (2010), "Antimicrobial and preliminary phytochemical screening of crude leaf extract of pandanus odoratissimus l", *Pharmacologyonline*, 2, 600-610.
98. S Raju, N V Subbaiah, K S Reddy et al (2011). "Potential of Pandanus odoratissimus as a CNS depressant in Swiss albino mice", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(3), 629-634.
99. S Venkatesh, R Kusuma, V Sateesh et al (2012). "Antidiabetic activity of pandanus odoratissimus root extract", *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 46(4), 340-345.
100. World Health Organization (2000). *Working group on the safety and efficacy of herbal medicine*, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization.
101. Bộ Y Tế (2015). *Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y và thuốc từ dược liệu*, Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27 tháng 10 năm 2015 của Cục khoa học công nghệ và đào tạo Bộ Y Tế.
102. Đỗ Trung Đàm (2015). *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, 101-112.

103. Phuong Thien Thuong, Nguyen Duy Su, Tran Minh Ngoc et al (2009). "Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea *Ilex kudingcha*", *Food Chemistry*, 113(1), 139-145.
104. S Gorinstein, R Haruenkit, Y S Park et al (2004). "Bioactive compounds and antioxidant potential in fresh and dried Jaffa® sweeties, a new kind of citrus fruit", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1459-1463.
105. S B Kedare and R P Singh (2011). "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay", *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
106. M R Boyd, K D Paull and L R Rubinstein (1992). "Data display and analysis strategies for the NCI disease-oriented in vitro antitumor drug screen", *Cytotoxic anticancer drugs: models and concepts for drug discovery and development*, Springer, 11-34.
107. Đỗ Trung Đàm (2000). "Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thực nghiệm", *Tạp chí Dược học*, 3, 8 - 9.
108. Đỗ Trung Phấn (2014), *Bài giảng huyết học truyền máu sau đại học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 83 - 90.
109. Trần Thị Liên Minh và Mai Phương Thảo (2017), *Một số chuyên đề sinh lý học*, Nhà xuất bản Y học, 53 - 93.
110. M T Bility, L Cheng, Z Zhang et al (2014). "Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: induction of human-specific liver fibrosis and M2-like macrophages", *PLoS Pathog*, 10(3), 1-14.
111. K D Bissig, S F Wieland, Phu Tran et al (2010). "Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment", *The Journal of clinical investigation*, 120(3), 924-930.
112. M L Washburn, M T Bility, L Zhang et al (2011). "A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease", *Gastroenterology*, 140(4), 1334-1344.

113. N Fausto (2001). "A mouse model for hepatitis C virus infection", *Nat Med*, 7(8), 890-891.
114. K Giersch, M Helbig, T Volz et al (2014). "Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection", *J Hepatol*, 60(3), 538-544.
115. E Thomas and T J Liang (2016). "Experimental models of hepatitis B and C—new insights and progress", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(6), 362-374.
116. L Hao, Y Xie, G Wu et al (2015), "Protective effect of *Herichium erinaceus* on alcohol induced hepatotoxicity in mice", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2015), 1-5.
117. Y Lee, D J Kwon, Y H Kim et al (2017). "HIMH0021 attenuates ethanol-induced liver injury and steatosis in mice", *PloS one*, 12(11), e0185134.
118. Y Mahmoodzadeh, M Mazani and L Rezagholizadeh (2017). "Hepatoprotective effect of methanolic *Tanacetum parthenium* extract on CCl₄-induced liver damage in rats", *Toxicology reports*, 4, 455-462.
119. M D Shah, U J A D'Souza and M Iqbal (2017). "The potential protective effect of *Commelina nudiflora* L. against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity in rats, mediated by suppression of oxidative stress and inflammation", *Environ Health Prev Med*, 22(1), 66-85.
120. Z Li, H Feng, Y Wang et al (2019). "Rosmarinic acid protects mice from lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury by inhibiting MAPKs/NF-kappaB and activating Nrf2/HO-1 signaling pathways", *Int Immunopharmacol*, 67, 465-472.
121. A Raslin, S Sathiya, C S Babu et al (2017). "Attenuation of Oxidative Stress and Hepatotoxicity Induced By D-Galactosamine by a Polyherbal Formulation Ambrex—in vivo and in vitro Studies", *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(4), 729-739.

122. S Venkateswaran, L Pari, P Viswanathan et al (1997). "Protective effect of Livex, a herbal formulation against erythromycin estolate induced hepatotoxicity in rats", *J Ethnopharmacol*, 57(3), 161-167.
123. L Pari and P Murugan (2004). "Protective role of tetrahydrocurcumin against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity", *Pharmacological research*, 49(5), 481-486.
124. A Jha, R Krithika, D Manjeet et al (2013). "Protective effect of black tea infusion on aflatoxin-induced hepatotoxicity in mice", *Journal of clinical and experimental hepatology*, 3(1), 29-36.
125. A N Ahmadabadi, F Tavakoli, G R Hasanzadeh et al (2011). "Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B1 induced liver toxicity in mice", *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19(4), 282-287.
126. T Marchyshak, T Yakovenko, I Shmarakov et al (2018). "The potential protective effect of oligoribonucleotides-d-mannitol complexes against thioacetamide-induced hepatotoxicity in mice", *Pharmaceuticals*, 11(3), 77-91.
127. G Ostapowicz, R J Fontana, F V Schiodt et al (2002). "Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States", *Ann Intern Med*, 137(12), 947-954.
128. Ngô Hữu Hà (2004), “*Nghiên cứu tình hình ngộ độc cấp các thuốc thường gặp tại trung tâm chống độc Bệnh viện Bạch Mai trong 2 năm 2002 -2003*”, Luận văn tốt nghiệp Bác sĩ chuyên khoa cấp II, Trường đại học Y Hà Nội.
129. A U Gilani and K H Janbaz (1995). "Studies on protective effect of *Cyperus scariosus* extract on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity", *Gen Pharmacol*, 26(3), 627-631.
130. G Sener, H Z Toklu, A O Sehirli et al (2006). "Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice", *Hepatol Res*, 35(1), 62-68.

131. A F Mohamed, A G A Hasan, M I Hamamy et al (2005), "Antioxidant and hepatoprotective effects of *Eucalyptus maculata*", *Medical science monitor*, 11(11), 426-431.
132. P Muriel, T Garciapina, V P Alvarez et al (1992). "Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage", *J Appl Toxicol*, 12(6), 439-442.
133. P Muriel and M Mourelle (1990). "Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage", *J Appl Toxicol*, 10(4), 275-279.
134. H Farghali, L Kamenikova, S Hynie et al (2000). "Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury", *Pharmacol Res*, 41(2), 231-237.
135. M P Miguez, I Anundi et al (1994). "Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1", *Chem Biol Interact*, 91(1), 51-63.
136. E Bosisio, C Benelli and O Pirola (1992). "Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes", *Pharmacol Res*, 25(2), 147-154.
137. N Dixit, S Baboota, K Kohli et al (2007). "Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches", *Indian journal of pharmacology*, 39(4), 172-179.
138. R Campos, A Garrido, R Guerra et al (1989). "Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver", *Planta Med*, 55(5), 417-419.
139. K M Juma'a, S A Hussain, I T Numan et al (2009). "Dose-dependent Anti-inflammatory Effect of Silymarin in Experimental Animal Model of Acute Inflammation", *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN: 1683-3597, E-ISSN: 2521-3512)*, 18(Suppl.), 14-18.

140. Đinh Thị Kim Chi (2007). “*Nghiên cứu tác dụng bảo vệ, phục hồi tổn thương gan cấp và độc tính của cây Cỏ mật (Eriochloa ramose (Retz.) Hack) trên thực nghiệm*”, Luận văn Thạc sỹ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
141. Đào Văn Phan (2004). *Các thuốc giảm đau chống viêm*, Nhà xuất bản Y học, 61-65.
142. G Kolios, V Valatas and E Kouroumalis (2006). "Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease", *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(46), 7413-7420.
143. K Iwaisako, C Jiang, M Zhang et al (2014). "Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(32), E3297-3305.
144. Z Shi, A E Wakil and D C Rockey (1997), "Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94(20)**, 10663-10668.
145. J H Tsai, J Y Liu, T T Wu et al (2008). "Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats", *Journal of viral hepatitis*, 15(7), 508-514.
146. S A Gabr, A H Alghadir, Y E Sherif et al (2016). "Hydroxyproline as a Biomarker in Liver ", *Biomarkers in liver disease*, (2016), 1-21.
147. T Tsuchida and S L Friedman (2017). "Mechanisms of hepatic stellate cell activation", *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14(7), 397-411.
148. D K Stalnikowitz and A B Weissbrod (2003). "Liver fibrosis and inflammation. A review", *Ann Hepatol*, 2(4), 159-163.
149. S L Friedman (2000). "Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury", *J Biol Chem*, 275(4), 2247-2250.

150. R J McAnulty and G J Laurent (1987), "Collagen synthesis and degradation in vivo. Evidence for rapid rates of collagen turnover with extensive degradation of newly synthesized collagen in tissues of the adult rat", *Coll Relat Res*, 7(2), 93-104.
151. O Laitinen, E A Nikkila and K. I. Kivirikko (1966). "Hydroxyproline in the serum and urine. Normal values and clinical significance", *Acta Med Scand*, 179(3), 275-284.
152. A Arjmand, M G Tsipouras, A T Tzallas et al (2020), "Quantification of Liver Fibrosis-A Comparative Study", *Applied Sciences*, 10(2), 447-481.
153. Đỗ Kim Sơn và cộng sự (1988). "Nghiên cứu tác dụng của actiso trong bệnh lý đường mật", *Tạp chí Y học Việt Nam*, 5(6), 19 -27.
154. R Gebhardt (2002). "Prevention of tauroolithocholate-induced hepatic bile canalicular distortions by HPLC-characterized extracts of artichoke (*Cynara scolymus*) leaves", *Planta Med*, 68(9), 776-779.
155. B N Dhawan (1997). Hepatoprotective activity of natural products experimental evaluation, *International workshop on medicinal plants their bioactivity, screening and evaluation*, Lucknow, L15.
156. M D Rosa and L Sorrentino (1968), "The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin", *Eur J Pharmacol*, 4(3), 340-342.
157. C A Winter (1962). "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs", *Proc Soc Exp Biol Med*, 111, 544-547.
158. A Sudhamadhuri and V Kalasker (2014). "Evaluation of anti-inflammatory effect of aqueous extract of *Boerhaavia diffusa* leaves in rats", *Int. J. Res. Health Sci*, 2, 517-521.
159. R R Parekar, S S Bolegave, P A Marathe et al (2015). "Experimental evaluation of analgesic, anti-inflammatory and anti-platelet potential of Dashamoola", *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 6(1), 11-18.

160. R Kumar, Y K Gupta, S Singh et al (2016), "Anti-inflammatory Effect of *Picrorhiza kurroa* in Experimental Models of Inflammation", *Planta Med*, 82(16), 1403-1409.
161. J Zhao, A Maitituersun, C Li et al (2018), "Evaluation on Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Total Flavonoids from *Juniperus sabina*", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-9.
162. Z Ou, J Zhao, L Zhu et al (2019). "Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on lambda-carrageenan-induced paw edema in mice", *Biomed Pharmacother*, 118, 109347.
163. Đỗ Trung Đàm (1997), "Đánh giá mô hình gây phù thực nghiệm bằng cao lạnh và carragenin để nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của thuốc", *Tạp chí Dược học*, 12, 12-18.
164. D L Gardner (1960). "Production of arthritis in the rabbit by the local injection of the mucopolysaccharide caragheenin", *Annals of the rheumatic diseases*, 19(4), 369-376 .
165. G Williams (1957). "A histological study of the connective tissue reaction to carrageenin", *Journal of pathology and bacteriology*, 73, 557-563.
166. G Choudhury and W MacNee (2017). "Role of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathology of Ageing in COPD: Potential Therapeutic Interventions", *Copd*, 14(1), 122-135.
167. A Y Putri and M Thaha (2014). "Role of oxidative stress on chronic kidney disease progression", *Acta Med Indones*, 46(3), 244-252.
168. R Olinski, A Siomek, R Rozalski et al (2007). "Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases", *Acta Biochim Pol*, 54(1), 11-26.
169. L A Videla, R Rodrigo, M Orellana et al (2004). "Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients", *Clinical science*, 106(3), 261-268.

170. L Y Guan, P Y Fu, P D Li (2014). "Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide", *World journal of gastrointestinal surgery*, 6(7), 122-128.
171. M G Moreno and G G Reyes (2014), "The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease", *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 79(2), 135-144.
172. T Luangmonkong, S Suriguga, H A M Mutsaers et al (2018). "Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis", *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 175, 71-102.
173. E C Molist and I Fabregat (2015). "Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis", *Redox Biol*, 6, 106-111.
174. P Muriel (2009). "Role of free radicals in liver diseases", *Hepatology international*, 3, 526-536.
175. V M Sardesai (1995). "Role of antioxidants in health maintenance", *Nutr Clin Pract*, 10(1), 19-25.
176. M N Alam, N J Bristi and M Rafiquzzaman (2013). "Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity", *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
177. M Zhang, S G Swarts, L Yin et al (2011). "Antioxidant properties of quercetin", *Adv Exp Med Biol*, 701, 283-289.
178. Trần Thị Anh và cộng sự (2011). "Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính kháng oxi của cao chiết axetat etyl cây Vàng Trâu *jasminum undulatum ker-gawl.*", *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 14, 50 - 56.
179. S Singh and R P Singh (2008). "In vitro methods of assay of antioxidants: an overview", *Food reviews international*, 24(4), 392-415.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ ĐƯỢC CÔNG
BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Hoàng Thái Hoa Cương, Vũ Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Duy Thuần (2017). “Tác dụng bảo vệ gan của quả dứa dại trên thực nghiệm”, *Tạp chí Y học thực hành*, **11** (1062), 60-63.
2. Hoàng Thái Hoa Cương, Vũ Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Duy Thuần (2017). “ Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng chống viêm mạn của quả dứa dại trên thực nghiệm”. *Tạp chí khoa học công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, **117** (11), 129-133.
3. Hoàng Thái Hoa Cương, Vũ Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Duy Thuần (2018). “Tác dụng lợi mật của quả Dứa dại trên thực nghiệm”. *Tạp chí Y học Việt nam*, **472** (11), 575-580.
4. Hoàng Thái Hoa Cương, Vũ Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Duy Thuần, Nguyễn Phương Thanh (2020). “Nghiên cứu tác dụng chống xơ gan của quả dứa dại trên thực nghiệm”, *Tạp chí Y học thực hành*, **1140** (7), 109-114.

PHỤ LỤC I

GIẤY CHỨNG NHẬN MẪU NGHIÊN CỨU

DƯỢC LIỆU QUẢ DỨA DẠI