

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



ĐINH THỊ LAM

**NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN, TÁC DỤNG
CHỐNG VIÊM, GIẢM ĐAU CỦA CAO XOA BÁCH XÀ
TRÊN THỰC NGHIỆM VÀ LÂM SÀNG
BỆNH VIÊM KHỚP DẠNG THẤP**

Chuyên ngành : Y học cổ truyền

Mã số : 62720201

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2017

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Đỗ Thị Phương

2. PGS.TS. Nguyễn Trần Thị Giáng Hương

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Minh Hà

Phản biện 2: GS.TS. Hoàng Kim Huyền

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sỹ
cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2017

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc gia

Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Viêm khớp dạng thấp (VKDT) (Rheumatoid Arthritis - RA) là bệnh lý tự miễn điển hình, diễn biến mạn tính với các biểu hiện tại khớp, ngoài khớp và toàn thân ở nhiều mức độ khác nhau, diễn biến phức tạp, cho tới nay nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của bệnh vẫn chưa được biết rõ, nên việc điều trị còn gặp nhiều khó khăn. Mặc dù Y học đã áp dụng rất nhiều phương pháp, sử dụng nhiều loại thuốc, và ngày càng có nhiều loại thuốc mới ra đời, nhưng cho đến nay vẫn chưa có một loại thuốc, hay một phương pháp nào có thể chữa khỏi hẳn bệnh. Các thuốc của Y học hiện đại (YHHĐ) điều trị VKDT, khi dùng kéo dài có nhiều tác dụng không mong muốn. Theo Y học cổ truyền (YHCT), VKDT thuộc phạm vi chứng Tý. Từ xưa YHCT đã có rất nhiều phương thuốc để chữa chứng Tý nói chung và VKDT nói riêng, cho hiệu quả tốt và tính an toàn cao. Tuy nhiên các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung nghiên cứu các vị thuốc và bài thuốc YHCT uống trong, để điều trị bệnh VKDT. Có rất ít các nghiên cứu về chế phẩm thuốc dùng ngoài dùng trong điều trị bệnh VKDT. Trong những năm gần đây cùng với sự phát triển vượt bậc của công nghiệp dược và bào chế YHCT, các chế phẩm YHCT dùng ngoài đã được đưa vào nghiên cứu, sản xuất và cung cấp phục vụ cho công tác điều trị. Cao xoa Bách xà là một chế phẩm dùng ngoài của YHCT có thành phần: nọc rắn hổ mang khô, methyl salicylat, menthol, camphor, tinh dầu quế, tinh dầu bạc hà. Để có bằng chứng khoa học về tác dụng điều trị cũng như tính an toàn của chế phẩm, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài với 2 mục tiêu:

2. Mục tiêu

1. *Nghiên cứu độc tính cấp, bán trường diễn, kích ứng da và tác dụng chống viêm, giảm đau của cao xoa Bách xà trên thực nghiệm*
2. *Đánh giá tác dụng của cao xoa Bách xà kết hợp bài thuốc Quế chi thực dược trị mẫu thang trên bệnh nhân viêm khớp dạng thấp giai đoạn I, II (thể hàn nhiệt tắc tấp).*

3. Ý nghĩa thực tiễn và những đóng góp mới của luận án

Đề tài đã nghiên cứu một cách hệ thống và khoa học về tác dụng của cao xoa Bách xà, một chế phẩm thuốc Y học cổ truyền dưới dạng cao xoa dùng ngoài, có thành phần chính là nọc rắn hổ mang, bằng

các phương pháp nghiên cứu khoa học của Y học hiện đại. Như vậy đề tài đã góp phần vào việc hiện đại hóa YHCT. Đây là một đề tài vừa mang tính cơ bản, vừa mang tính ứng dụng, tạo được cầu nối giữa nghiên cứu trong phòng thí nghiệm với việc sử dụng thuốc trên lâm sàng. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm cho thấy: Cao xoa Bách xà không có độc tính cấp ở liều 5g/kg đường tiêm dưới da trên chuột nhắt trắng và chưa xác định được độc tính bán trường diễn trên thỏ theo đường bôi ngoài da trên động vật thực nghiệm. Khả năng kích ứng da ở mức độ nhẹ và vừa. Cao xoa Bách xà có tác dụng giảm đau theo cơ chế giảm đau ngoại vi và có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu trên lâm sàng cho thấy: cao xoa Bách xà xoa ngoài kết hợp với bài thuốc uống trong Qué chi thực được trị mẫu thang có tác dụng tốt trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp giai đoạn I, II (thể hàn nhiệt tắc tấp), thông qua tác dụng giảm đau và sưng khớp, cải thiện mức độ hoạt động bệnh với mức cải thiện chỉ số HAQ trung bình là $0,79 \pm 0,29$, chỉ số DAS 28 - CRP trung bình là $2,03 \pm 0,63$, chỉ số ACR20 là 91,67%, chỉ số ACR50 là 33,33%. Mức cải thiện các chỉ số trên ở nhóm nghiên cứu cao hơn rõ rệt so với nhóm chứng ở mức có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), thuốc không gây tác dụng không mong muốn trên lâm sàng và cận lâm sàng trong quá trình điều trị. Những kết quả này là những minh chứng khoa học, rõ ràng về tính an toàn và hiệu quả chống viêm giảm đau của cao xoa Bách xà trong điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp.

4. Cấu trúc của luận án: Ngoài phần đặt vấn đề và kết luận, luận án có 4 chương

Chương 1: Tổng quan tài liệu 37 trang

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 23 trang

Chương 3: Kết quả nghiên cứu 41 trang

Chương 4: Bàn luận 37 trang

Và 45 bảng, 12 biểu đồ, 12 ảnh, 3 sơ đồ, 6 phụ lục, 140 tài liệu tham khảo (tiếng Việt 57, tiếng Anh 60, tiếng Trung 23)

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Quan niệm của Y học hiện đại về bệnh viêm khớp dạng thấp

1.1.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

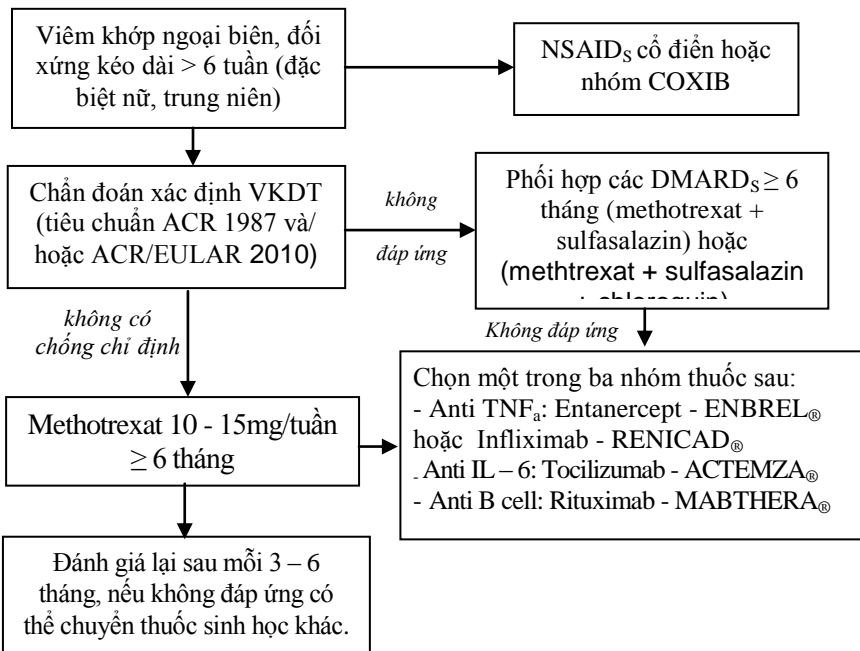
VKDT là một bệnh khớp mạn tính, tự miễn với sự tham gia của nhiều yếu tố như nhiễm khuẩn hoặc di truyền. Các nghiên cứu cho

thấy các phản ứng miễn dịch xảy ra ở màng hoạt dịch đóng vai trò cơ bản trong bệnh VKDT, trong đó các tế bào lympho T đóng vai trò then chốt

1.1.2. **Chẩn đoán VKDT:** theo ACR 1987 của Hội thấp khớp Mỹ

1.1.3. **Điều trị viêm khớp dạng thấp**

Tùy từng giai đoạn bệnh VKDT mà chọn phương pháp điều trị thích hợp như điều trị toàn thân, điều trị tại chỗ, điều trị phục hồi chức năng và điều trị ngoại khoa. Điều trị toàn thân VKDT cần phối hợp nhiều nhóm thuốc. Việc phối hợp các nhóm thuốc theo nguyên tắc sau:



Sơ đồ 1.2. Tóm tắt phác đồ điều trị VKDT

1.2. Quan niệm của Y học cổ truyền về VKDT

1.2.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

VKDT thuộc phạm vi chứng tý của YHCT. Nguyên nhân gây chứng tý bao gồm ngoại nhân, nội thương và bất nội ngoại nhân.

Cơ chế bệnh sinh là do tiên thiên bất túc, can thận hư, dinh vệ đều hư, nhiều lần bị cảm phong hàn thấp nhiệt tà dẫn tới khí huyết ngưng trệ, kinh lạc bị tắc trở làm sưng đau các khớp cục bộ hoặc toàn thân.

1.2.2. Điều trị bệnh VKDT

Điều trị VKDT theo YHCT tùy thuộc vào từng thể lâm sàng mà có pháp điều trị và điều trị cụ thể. Tuy nhiên nguyên tắc chung là điều trị nguyên nhân kết hợp điều trị triệu chứng thông qua pháp điều trị hành khí hoạt huyết, thông kinh hoạt lạc nhằm làm giảm sưng, đau khớp. Trong các Y văn kinh điển, chứng tý được chia thành 2 thể lớn là phong hàn thấp tý và phong thấp nhiệt tý. Gần đây, để phản ánh đầy đủ chứng trạng đa dạng của chứng tý trên lâm sàng, một phân loại theo tài liệu Trung Y Nội khoa của Trung Quốc đã chia chứng tý thành 10 thể. Theo đó, pháp điều trị của các thể lâm sàng cụ thể như sau: Thể phong thấp tý với pháp điều trị khu phong, trừ thấp, thông lạc, chỉ thông. Thể hàn thấp tý với pháp điều trị ôn kinh, tán hàn, trừ thấp, thông lạc. Thể hàn nhiệt thác tạp với pháp điều trị ôn kinh, tán hàn, thanh nhiệt, trừ thấp. Thể thấp nhiệt tý với pháp điều trị thanh nhiệt, trừ thấp, tuyên tý, thông lạc. Thể nhiệt độc tý với pháp điều trị thanh nhiệt, giải độc, lương huyết, thông lạc. Thể huyết ú với pháp điều trị hoạt huyết, hóa ú, dưỡng cân, thông lạc. Thể đàm trọc với pháp điều trị hóa đàm, hành khí, thông lạc, tuyên tý. Thể đàm ú với pháp điều trị hoạt huyết hành ú, hóa đàm, thông lạc. Thể khí âm lưỡng hư với pháp điều trị ích khí, dưỡng âm, hoạt huyết, thông lạc. Thể can thận lưỡng hư với pháp điều trị tư bổ can thận.

1.3. Tổng quan về một số nghiên cứu điều trị VKDT bằng thuốc YHCT

Các nghiên cứu điều trị VKDT bằng thuốc YHCT bao gồm nghiên cứu trên thực nghiệm và trên lâm sàng. Một số bài thuốc như: Quế chi thược dược tri mẫu thang, Tam tý thang gia giảm, Quyên tý thang gia giảm hay các vị thuốc như: cầu tích, thổ phục linh, cốt toái bồ, hay các chế phẩm cao thấp khớp II đã được nghiên cứu trên thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng thuốc YHCT có tác dụng giảm đau, chống viêm trên thực nghiệm. Tuy nhiên các nghiên cứu trên thực nghiệm còn chưa nhiều. Bên cạnh đó, nghiên cứu về các bài thuốc, chế phẩm thuốc, vị thuốc YHCT trên lâm sàng cũng đã được triển khai. Trước đây, nghiên cứu tập trung vào sử dụng điều trị VKDT bằng các bài thuốc, vị thuốc YHCT (Xúc tý thang, Quế chi thược dược tri mẫu thang, Độc hoạt tang ký sinh thang, Quyên tý thang, Ô đầu thang, Tam tý thang, Việt tý thang, Tý thống thang gia

giảm...) và các chế phẩm YHCT (cao thấp khớp II, viên nang Phong tê thấp, viên nang thấp khớp, viên Hy đan...) Trong những năm gần đây công nghệ dược và bào chế YHCT đã có những bước phát triển vượt bậc, các chế phẩm YHCT dùng ngoài đã được đưa vào nghiên cứu, sản xuất và cung cấp phục vụ cho công tác điều trị như: Osapain cream, cồn đắp Boneal Cốt thống linh, cao dán Hero, cồn xoa bóp, cao xoa Cobratox của Công ty Đông dược Cửu Long, cao xoa Hồng Linh cốt do Công ty Dược phẩm Quảng Bình, chế phẩm Najatox do Công ty cổ phần Hóa - Dược phẩm Mekorpha sản xuất... Gần đây, các nhà khoa học đã quan tâm nghiên cứu sự kết hợp trong điều trị đó là sử dụng phương pháp kết hợp thuốc YHCT uống trong với các phương pháp dùng ngoài như: xoa, đắp, dán, ngâm, chườm... Sự kết hợp này làm tăng hiệu quả điều trị, tăng tính khoa học. Tuy nhiên, các nghiên cứu về thuốc dùng ngoài cho đến nay còn rất khiêm tốn.

1.4. Tổng quan về cao xoa Bách xà

* **Xuất xứ:** từ những kinh nghiệm trong dân gian sử dụng nọc rắn hổ mang trong điều trị các bệnh lý cơ xương khớp, qua những minh chứng về tác dụng chống viêm, giảm đau của nọc rắn hổ mang trên thực nghiệm cũng như trên lâm sàng, với nhiều công trình nghiên cứu khoa học ở trong nước cũng như trên thế giới đã giúp ngành công nghiệp Dược đưa ra trên thị trường một số chế phẩm thuốc xoa ngoài có thành phần chính là nọc rắn hổ mang khô với thành phần nọc rắn và dược chất phối hợp rất khác nhau như cao xoa Najatox, Cobratox... Năm 2012, Công ty Nam Dược đã nghiên cứu và tìm ra một công thức thuốc xoa ngoài có thành phần chính là nọc rắn hổ mang kết hợp với một số dược chất và lấy tên là cao xoa Bách xà.

* **Thành phần, tác dụng của cao xoa Bách xà:** Nọc rắn hổ mang khô: 0,06 mg, methyl salicylat: 2,4g, camphor: 2,1g, tinh dầu bạc hà: 1,32g, menthol: 0,72g, tinh dầu quế: 0,3g.

+ **Methyl salicylat:** Có tác dụng chống viêm, giảm đau, thường được phối hợp với các loại tinh dầu khác, dùng làm thuốc bôi ngoài.

+ **Camphor:** Được chiết từ tinh dầu của cây long não - cinamomum camphora. Công dụng: Thuốc kích thích da, giãn mạch, giảm đau, chống ngứa.

+ **Tinh dầu Bạc hà (oleum menthae):** được lấy từ các bộ phận trên mặt đất của cây Bạc hà (mentha arvensis L). Tác dụng dược lý: Tinh dầu bạc hà bốc hơi rất nhanh gây cảm giác mát và tê tại chỗ dùng trong một số trường hợp đau dây thần kinh, đau xương khớp, đau cơ.

+ **Tinh dầu quế (Oleum Cinnamomi):** được lấy từ vỏ thân hoặc vỏ cành quế (cinamomum cassia Pres l), là chất lỏng trong, màu vàng

đến nâu đỏ, mùi thơm, vị cay nóng. Tác dụng: Phát hãn giải cơ, ôn kinh, thông dương, kích thích làm tăng tuần hoàn máu lưu thông. Công dụng: chế cùng cao xoa để chữa các chứng đau về cơ bắp, chứng chuột rút, đau khớp xương, đau dây thần kinh, co cứng các cơ do lạnh.

+ **Nọc rắn hổ mang** : Nọc được lấy từ loài rắn Hổ mang. Thành phần hóa học của nọc rắn rất phức tạp, gồm nhiều protein, enzym khác nhau, các độc tố thần kinh, độc tố đối với tim, chất gây tiêu huyết, chất gây chảy máu, chất gây đông máu, các chất chống đông, các chất gây dị ứng, kháng thể. Trong nọc rắn hổ mang còn chứa chất crotoalotoxin, cobratoxin, alcaloit (monocrotalin), ngoài ra trong nọc rắn còn có lượng rất cao chất kẽm. Tác dụng chữa bệnh của nọc rắn: Theo YHCT, rắn (không kể phủ tạng), có tính âm, vị ngọt, tác động vào can kinh và tý kinh. Nọc rắn hổ mang có tác dụng: khu phong, trừ thấp, tiêu viêm, chỉ thống. Cho tới nay nọc rắn đã được sử dụng như một dược liệu quý hiếm. Thông dụng hơn cả, nọc rắn hổ mang được sử dụng để sản xuất một số loại thuốc xoa bóp ngoài da có tác dụng điều trị đau dây thần kinh, viêm cơ, các bệnh lý về khớp.

Chương 2

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. CHẤT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nghiên cứu trên thực nghiệm: Cao xoa Bách xà có thành phần: Nọc rắn hổ mang khô: 0,06mg, methyl salicylat: 2,4g, camphor: 2,1g, tinh dầu bạc hà: 1,32g, menthol: 0,72g, tinh dầu quế: 0,3g, được bào chế tại Công ty Nam Dược, thuốc đạt tiêu chuẩn cơ sở.

2.1.2. Nghiên cứu trên lâm sàng: Thuốc dùng để xoa ngoài là cao xoa Bách xà có thành phần như đã nêu ở phần 2.1.1 (dùng cho nhóm nghiên cứu); cao xoa đối chứng có thành phần: methyl salicylat: 0,72g, camphor: 0,36g, tinh dầu chổi: 0,36g (dùng cho nhóm chứng), được bào chế tại Công ty Nam Dược, thuốc đạt tiêu chuẩn cơ sở. Thuốc uống trong là bài thuốc cổ phương Quế chi thực dược chi mẫu thang có thành phần: Quế chi 8g, chích cam thảo 8g, bạch truật 12g, phòng phong 12g, sinh khương 4g, bạch thực 12g, ma hoàng 8g, tri mẫu 12g, phụ tử chế 8g. các vị thuốc trong bài thuốc đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV.

2.2. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 10/2014 đến tháng 12/2016

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu thực nghiệm: Chuột nhắt trắng chủng Swiss và chuột cống trắng Wistar. Thỏ chủng Newzeland White, do trung tâm chăn nuôi dê và thỏ Tây Sơn, Viện vệ sinh dịch tễ trung ương, Học viện Quân Y cung cấp.

Địa điểm nghiên cứu thực nghiệm tại Bộ môn Dược lý - Đại học Y Hà Nội.

2.2.2. Đối tượng nghiên cứu lâm sàng: Cỡ mẫu tính theo công thức nghiên cứu lâm sàng của Tổ chức Y tế Thế giới. Nghiên cứu tiến hành trên 72 bệnh nhân VKDT chia làm 2 nhóm: nhóm nghiên cứu 36 bệnh nhân, nhóm chứng 36 bệnh nhân.

Địa điểm nghiên cứu lâm sàng: Khoa Y học dân tộc - bệnh viện đa khoa Đống Đa.

* **Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân:** Chọn bệnh nhân được chẩn đoán VKDT theo tiêu chuẩn của Hội thập khớp học Mỹ (American college of Rheumatology - ACR) năm 1987), giai đoạn I, II, ở giai đoạn bệnh hoạt động, thể hoạt động nhẹ và trung bình theo công thức DAS 28 (disease activity score base on 28 joints - DAS 28): bệnh hoạt động mức độ nhẹ ($2,6 \leq \text{DAS } 28 < 3,2$) và trung bình ($3,2 \leq \text{DAS } 28 \leq 5,1$), tuổi ≥ 18 , không phân biệt giới, nghề nghiệp, tình nguyện tham gia nghiên cứu.

* **Tiêu chuẩn loại trừ bệnh nhân:** bệnh nhân mắc các bệnh nhiễm khuẩn ngoài da, vết thương trên da, lở loét da, viêm da dị ứng hoặc da dễ bị kích ứng, bệnh nhân bị rối loạn cảm giác, mắc các bệnh mạn tính về tim mạch, suy gan, thận, bệnh truyền nhiễm, bệnh của cơ quan tạo máu, ung thư, phụ nữ có thai, không tuân thủ yêu cầu của nghiên cứu.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nghiên cứu trên thực nghiệm: Thiết kế nghiên cứu thực nghiệm có đối chứng, quy trình thực nghiệm được tiến hành theo các bước sau:

2.3.1.1. Nghiên cứu độc tính cấp, bán trường diễn và kích ứng da của cao xoa Bách xà:

* **Độc tính cấp:** Được thử trên chuột nhắt trắng phương pháp Litchfield - Wilcoxon, hướng dẫn của OECD và WHO: Chuột được tiêm dưới da gáy 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. Chuột được theo dõi tỷ lệ chết trong 72 giờ và tình trạng chung về hoạt động, tiêu hóa, sống, chết trong suốt 7 ngày sau khi tiêm thuốc.

* **Độc tính bán trường diễn:** Được tiến hành trên thỏ với liều bôi 0,75g/kg/lần, 2 lần/ngày (tương đương với liều trên lâm sàng) và 1,5g/kg/lần, 2 lần/ngày (gấp 2 liều trên) trong 4 tuần. Theo dõi cân nặng, ăn ngủ, hoạt động, tiêu hóa, huyết học, hóa sinh chức năng gan thận, mô bệnh học gan và thận thỏ. So sánh trước sau điều trị và so sánh với chứng.

* **Kích ứng da:** Được tiến hành trên thỏ theo hướng dẫn của OECD. Thỏ được cạo lông ở phần lưng và hông. Chia phần da cạo lông làm 2 phần, chọn mỗi phần có diện tích khoảng 6 cm² (2,5 cm x 2,5 cm) trên mỗi thỏ được sử dụng để bôi 0,5g chế phẩm nghiên cứu, phần da không bôi thuốc được sử dụng làm đối chứng: bôi tá dược 0,5 g. Đánh giá và tính điểm các chỉ số về ban đỏ (erythema), phù nề (oedema) tại thời điểm 1 giờ, 24, 48, 72 giờ sau khi loại bỏ thuốc. Nếu có tổn thương, theo dõi thỏ 14 ngày để đánh giá khả năng phục hồi.

2.3.1.2. Tác dụng chống viêm cấp

* **Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột cống bằng carrageenin:** Chuột được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, lô 1 (chứng sinh học) không tác động gì, lô 2 bôi tá dược 0,2g/1 chân chuột, lô 3 bôi Voltaren 0,2g/1 chân chuột, lô 4 bôi cao Bách xà 0,2g/1 chân chuột, chuột được bôi thuốc 5 lần trong 3 ngày liên tục. Ngày thứ nhất, sau khi bôi thuốc thứ 1 giờ, sau đó gây viêm bằng carrageenin 1%. Đo thể tích và độ dày chân chuột tại các thời điểm trước khi gây viêm (V0); sau khi gây viêm 1 giờ (V1), 2giờ (V2), 4giờ (V3) và 6 giờ (V4), 24 giờ (V5), 30 giờ (V6) và 48giờ (V7).

* **Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây viêm tai bằng dầu Croton:** 60 chuột nhất trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con. Lô 1 (Mô hình): Gây mô hình ở tai phải. Lô 2 (clobetason): Gây mô hình + Bôi clobetason liều 0,02 g/lần 1 lần ở tai phải sau khi gây mô hình 1giờ. Lô 3 (Bách xà 1 lần): gây mô hình + bôi cao Bách xà liều 0,02 g/lần ở tai phải 1 lần tại thời điểm sau khi gây mô hình 1giờ. Lô 4 (Tá dược 1 lần): gây mô hình + bôi thuốc tá dược liều 0,02 g/lần ở tai phải 1 lần tại thời điểm sau khi gây mô hình 1giờ. Lô 5 (Bách xà 3 lần): gây mô hình + bôi Bách xà liều 0,02 g/lần ở tai phải tại thời điểm 2 ngày trước nghiên cứu, 1 lần/ngày và sau gây mô hình 1giờ. Lô 6 (Tá dược 3 lần): n = 10: gây mô hình + bôi thuốc tá dược 0,02 g/lần ở tai phải tại thời điểm 2 ngày trước nghiên cứu, 1 lần/ngày và sau gây mô hình 1giờ. Ở tất cả các chuột, tai trái không gây mô hình và không bôi thuốc gì. Trước khi gây mô hình bằng dung dịch dầu croton (trong aceton), chuột được đo chiều dày tai ở tất cả các lô. Đo chiều dày tai tại vị trí sát đỉnh của tai cách xa chóp sụn vành tai.

Chỉ một nghiên cứu viên tiến hành đo chiều dày tai để hạn chế sai số. 6 giờ sau khi gây mô hình, chuột được giết bằng cách làm chệch đốt sống cổ, tai chuột được đo lại chiều dày, sau đó cắt ở phần trung tâm với đường kính 7 mm bằng dụng cụ sinh thiết để đo cân nặng.

2.3.1.4. Nghiên cứu tác dụng giảm đau:

* **Mô hình mâm nóng” (hot plate):** Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con: lô 1 (Chứng sinh học): Không bôi gì vào 2 chân chuột. Lô 2 (Tá dược): Bôi tá dược vào toàn bộ 2 gan bàn chân chuột. Lô 3 (Chứng Salonpas): Bôi Salonpas Gel vào toàn bộ 2 gan bàn chân chuột. Lô 4 (Voltaren): Bôi Voltarel vào toàn bộ 2 gan bàn chân chuột. Lô 5 (Lidocain): Bôi lidocain vào toàn bộ 2 gan bàn chân chuột. Lô 6 (Cao Bách xà): Bôi cao Bách xà vào toàn bộ 2 gan bàn chân chuột. Đo thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột sau khi bôi thuốc thử 30 phút.

* **Mô hình tail - flick (vẫy đuôi) và mô hình rê kim:** Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con: Lô 1 Chứng sinh học. Lô 2 bôi tá dược. Lô 3 bôi Salonpas Gel. Lô 4 bôi Voltarel. Lô 5 bôi cao Bách xà. Trong mô hình tail - flick. Bôi thuốc thử vào đuôi chuột, đưa đuôi chuột tiếp xúc với nguồn bức xạ nhiệt, khi xuất hiện phản xạ vẫy đuôi, máy đo tự động, xác định thời gian phản ứng của chuột với nguồn nhiệt. Trong mô hình rê kim, bôi thuốc thử vào chân chuột, rê kim (cảm ứng) sao cho đầu kim chạm vào giữa gan bàn chân chuột, bấm nút để thực hiện việc đo, máy tự động đo thời gian phản ứng với đau của chân chuột. Đánh giá phản ứng đau của chuột tại thời điểm 30 phút sau khi bôi.

* **Mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin 1%:** Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 6 lô, mỗi lô 10 con. Lô 1 (chứng sinh học), không gây phù viêm, không bôi gì. Lô 2 (mô hình), tiêm phù chân chuột, không bôi gì. Lô 3 (Tá dược), tiêm phù chân, bôi tá dược. Lô 4 (Chứng dương Voltaren): tiêm phù chân, bôi Voltaren. Lô 5 (Chứng dương Salonpas Gel), tiêm phù chân, bôi Salonpas. Lô 6 (Bách xà), tiêm phù chân, bôi Bách xà. Chuột được tiêm phù viêm bằng cách tiêm 0,2 mL dung dịch carragenin 0,1%. Sau khi gây phù viêm 1h30 phút, chuột được bôi hoặc tá dược tương ứng với từng lô. 30 phút sau khi bôi thuốc, chuột được đo ngưỡng đau bằng phương pháp rê kim. Đánh giá phản ứng đau của chuột tại thời điểm 30 phút sau khi bôi.

2.3.2. Nghiên cứu trên lâm sàng:

2.3.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Theo phương pháp tiến cứu, can thiệp lâm sàng, có đối chứng, mù kép.

2.3.2.2. Quy trình nghiên cứu:

Các bệnh nhân VKDT sau khi được khám, đủ tiêu chuẩn sẽ được lựa chọn vào nghiên cứu. Một nghiên cứu viên độc lập sẽ tiến hành phân nhóm BN vào 2 nhóm đảm bảo tính tương đồng về tuổi, giới, giai đoạn bệnh, mức độ hoạt động bệnh trước khi tiến hành nghiên cứu và tiến hành dán nhãn, mã hóa cho mỗi BN trên bệnh án nghiên cứu. Tất cả BN và nghiên cứu viên trực tiếp điều trị cho BN đều không biết được đâu là nhóm nghiên cứu và đâu là nhóm chứng. Dạng trình bày của thuốc nghiên cứu và thuốc đối chứng là như nhau về cảm quan, mùi...

Nhóm chứng gồm 36 bệnh nhân, dùng cao xoa đối chứng xoa ngoài. Nhóm nghiên cứu gồm 36 bệnh nhân, dùng cao xoa Bách xà xoa ngoài. Liệu trình xoa thuốc cho cả 2 nhóm như sau: xoa 5 ngày nghỉ 2 ngày và lại tiếp tục dùng theo liệu trình trên cho đến hết 30 ngày điều trị nội trú tại bệnh viện. Như vậy, tổng số ngày điều trị bằng cao xoa Bách xà xoa ngoài là 20 ngày. Bài thuốc uống trong cho cả 2 nhóm là bài thuốc Qué chi thực được chi mẫu thang, uống liên tục trong 30 ngày, ngày uống 2 lần, mỗi lần 100ml thuốc sắc. Kết thúc quá trình nghiên cứu, khi đó mới tiến hành mở nhãn và nhập số liệu, xử lý số liệu và báo cáo kết quả.

2.3.2.3. Các chỉ tiêu nghiên cứu

Các chỉ tiêu nghiên cứu trên lâm sàng: thời gian cứng khớp buổi sáng, số khớp đau, VAS (Visual Analog Scale), chỉ số Ritchie, số khớp sưng, mức độ cải thiện bệnh theo chức năng vận động (Health Assessment Questionnaire - HAQ), DAS 28 - CRP, cải thiện bệnh theo ACR. Các chỉ tiêu lâm sàng được lượng giá vào ngày đầu tiên (D_0) và ngày thứ 30 (D_{30}) của đợt điều trị. Các tác dụng không mong muốn được theo dõi thường xuyên trong suốt quá trình điều trị 30 ngày.

Các chỉ tiêu cận lâm sàng: số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, huyết sắc tố, glucose, cholesterol, triglycerid, tốc độ máu lắng, Protein C phản ứng (CRP- C - reaction protein) và các xét nghiệm về chức năng gan, thận như ure, creatinin, AST, ALT được đánh giá vào thời điểm D_0 và D_{30} của đợt điều trị.

2.3.2.4. Phương pháp đánh giá kết quả

- Đánh giá hiệu quả điều trị: Đánh giá mức cải thiện 20%, 50%, 70% theo tiêu chuẩn ACR. Đánh giá mức cải thiện hoạt động bệnh theo tiêu chuẩn Châu Âu (EULAR - 2010): so sánh DAS 28 trước và sau điều trị (Hiệu số $< 0,6$: bệnh không cải thiện, $1,2 >$ Hiệu số $\geq 0,6$: bệnh cải thiện trung bình, Hiệu số $\geq 1,2$: bệnh cải thiện tốt).

- Theo dõi các tác dụng không mong muốn trên lâm sàng và cận lâm sàng.

2.3.2.5. Xử lý số liệu: Các số liệu thu thập được xử lý theo thuật toán thống kê Y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 18.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.3.2.6. Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức Y sinh học Trường Đại học Y Hà Nội, được Hội đồng khoa học bệnh viện đa khoa Đống Đa chấp thuận, cho phép nghiên cứu tại bệnh viện.

Chương 3 **KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TRÊN THỰC NGHIỆM

3.1.1. Thử độc tính cấp và bán trường diễn và kích ứng da của cao xoa Bách xà

* **Độc tính cấp:** Cho chuột tiêm dưới da cao Bách xà với liều tăng dần từ 5ml/kg đến 25ml/kg thể trọng chuột, là mức liều tối đa mà chuột có thể dung nạp được. Kết quả cho thấy khi tiêm liều 5ml/kg không có độc tính cấp, nhưng từ liều 7,5ml/kg thấy có hiện tượng chuột chết, sau 72 giờ không có hiện tượng chuột chết. từ đó xác định được liều chết 50%: $LD_{50} = 14,543 (16,311 - 11,007) \text{ g/kg}$.

* **Độc tính bán trường diễn:** Trong thời gian thí nghiệm, thỏ ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô. Sau 4 tuần dùng thuốc liên tục với liều 0,75g/kg/lần và 1,5g/kg/lần cân nặng thỏ không gây độc tính trên cơ quan tạo máu và không làm thay đổi chức năng gan thận thỏ trên xét nghiệm sinh hóa cũng như mô bệnh học.

* **Kích ứng da của cao xoa Bách xà:** Kết quả cho thấy: thời điểm 1 giờ sau khi loại bỏ thuốc thử: Tổng điểm kích ứng là $1,7 + 1,3 = 3,0$: Xếp loại thuốc mức độ kích ứng vừa. Thời điểm 24 giờ: Tổng điểm kích ứng là 1,7: Thuộc mức độ kích ứng nhẹ. Thời điểm 48 giờ: Tổng điểm kích ứng thời điểm 48 giờ là 1,0: Thuộc mức độ kích ứng nhẹ. Thời điểm 72 giờ: Tổng điểm kích ứng của thuốc Bách xà ở thời điểm 72 giờ là 1,0: Thuộc mức độ kích ứng da nhẹ. Ở phần da dùng làm chứng (bôi tá dược) cho thấy tại tất cả các thời điểm đều không có biểu hiện kích ứng.

3.1.2. Tác dụng chống viêm cấp

** Tác dụng chống viêm cấp của cao xoa Bách xà trên mô hình gây phù chân chuột cống:*

Bảng 3.17. Tác dụng chống viêm cấp của Cao xoa Bách xà trên mô hình gây phù chân chuột cống qua chỉ số độ phù chân chuột

Lô	Độ phù (%)						
	Sau 1h	Sau 2h	Sau 4h	Sau 6h	Sau 24h	Sau 30h	Sau 48h
Lô 1 Chứng sinh học	15,22 ± 4,19	36,96 ±12,13	48,35 ± 10,12	28,65 ± 11,34	14,86 ± 9,57	17,54 ± 9,89	16,3 ± 6,73
Lô 2 Bôi tá dược 0,2g/1chân	15,69 ± 6,55 <i>p₂₋₁</i> >0,05	31,97± 10,58 <i>p₂₋₁</i> >0,05	40,88 ± 12,28 <i>p₂₋₁</i> >0,05	21,26± 6,96 <i>p₂₋₁</i> >0,05	13,88 ± 6,85 <i>p₂₋₁</i> >0,05	12,6 ± 6,55 <i>p₂₋₁</i> >0,05	10,72 ± 4,87 <i>p₂₋₁</i> >0,05
Lô 3: Bôi Voltaren 0,2g/1 chân	4,49 ± 1,71 <i>p₃₋₁</i> <0,001	7,18 ± 3,75 <i>p₃₋₁</i> <0,001	23,79 ± 10,58 <i>p₃₋₁</i> <0,001	9,47 ± 4,17 <i>p₃₋₁</i> <0,001	6,47 ± 2,19 <i>p₃₋₁</i> <0,001	5,02 ± 2,12 <i>p₃₋₁</i> <0,001	2,57 ± 1,28 <i>p₃₋₁</i> <0,001
Lô 4 : Bôi Cao xoa Bách xà 0,2g/1 chân	11,01 ± 3,45 <i>p₄₋₁</i> <0,05	15,07 ± 4,57 <i>p₄₋₁</i> <0,05	26,16 ± 8,96 <i>p₄₋₁</i> <0,05	12,43 ± 4,27 <i>p₄₋₁</i> <0,05	8,71 ± 3,27 <i>p₄₋₁</i> <0,05	7,23 ± 3,27 <i>p₄₋₁</i> <0,05	5,78 ± 2,13 <i>p₄₋₁</i> <0,05

Bảng 3.18. Tác dụng chống viêm cấp của Cao xoa Bách xà trên mô hình gây phù chân chuột cống qua chỉ số độ dày chân chuột.

Lô	Độ dày (%)						
	Sau 1h	Sau 2h	Sau 4h	Sau 6h	Sau 24h	Sau 30h	Sau 48h
Lô 1 Chứng sinh học	86,77 ± 14,84	98,67 ± 14,58	109,34 ± 13,56	91,7 ± 11,8	70,00 ± 9,02	61,56 ± 7,84	31,79 ± 12,45
Lô 2 Bôi tá dược 0,2g/1chân	74,94 ± 24,03 <i>p₂₋₁</i> >0,05	96,17 ± 20,34 <i>p₂₋₁</i> >0,05	98,83 ± 18,8 <i>p₂₋₁</i> >0,05	85,43 ± 19,56 <i>p₂₋₁</i> >0,05	67,46 ± 12,3 <i>p₂₋₁</i> >0,05	51,44 ± 12,4 <i>p₂₋₁</i> >0,05	24,23 ± 8,16 <i>p₂₋₁</i> >0,05
Lô 3: Bôi Voltaren 0,2g/1 chân	58,8 ± 18,16 <i>p₃₋₁</i> <0,05	62,14 ± 17,72 <i>p₃₋₁</i> <0,05	69,26 ± 17,11 <i>p₃₋₁</i> <0,05	59,34 ± 18,26 <i>p₃₋₁</i> <0,05	50,35 ± 20,4 <i>p₃₋₁</i> <0,05	40,8 ± 17,75 <i>p₃₋₁</i> <0,05	16,71 ± 8,8 <i>p₃₋₁</i> <0,05
Lô 4: Bôi Cao xoa Bách xà 0,2g/1 chân	81,79 ± 22,91 <i>p₄₋₁</i> <0,05	83,78 ± 18,37 <i>p₄₋₁</i> <0,05	90,25 ± 17,11 <i>p₄₋₁</i> <0,05	81,43 ± 16,91 <i>p₄₋₁</i> <0,05	58,43 ± 10,5 <i>p₄₋₁</i> <0,05	46,23 ± 11,95 <i>p₄₋₁</i> <0,05	17,76 ± 6,4 <i>p₄₋₁</i> <0,05

Kết quả ở bảng 3.17 và bảng 3.18 cho thấy: Cả 2 chỉ số về thể tích chân chuột và độ dày chân chuột đều cho kết quả tương đồng: giảm thể tích chân chuột, giảm độ dày chân chuột của lô bôi voltaren và Cao xoa Bách xà. Như vậy, cao xoa Bách xà có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây viêm bằng carrageenin chân chuột cống trắng.

*** Tác dụng chống viêm cấp của cao xoa Bách xà trên mô hình gây viêm tai chuột bằng dầu Croton:** Kết quả cho thấy cao xoa Bách xà với liều lượng 0,02 g/lần bôi 1 lần và 3 lần không có tác dụng ức chế viêm trên mô hình viêm tai cấp tại chỗ bằng dầu croton.

3.1.3. Tác dụng giảm đau

*** Tác dụng giảm đau trung ương:** Cao xoa Bách xà không có tác dụng giảm đau trung ương khi nghiên cứu trên mô hình mâm nóng và mô hình tail - flick (vẫy đuôi).

*** Tác dụng giảm đau ngoại biên**

- Nghiên cứu tác dụng giảm đau của cao xoa Bách xà bằng phương pháp rê kim

Bảng 3.22. Tác dụng giảm đau của cao xoa Bách xà trên chuột nhắt trắng bằng máy rê kim

Lô chuột	N	Thời gian phản ứng đau (giây) $\bar{X} \pm SD$	p so với nhóm chứng sinh học
Lô 1 (chứng sinh học)	10	1,46 ± 0,40	
Lô 2 (Tá dược)	10	1,76 ± 0,22	> 0,05
Lô 3 (Salonpas gel)	10	2,15 ± 0,66	< 0,05
Lô 4 (Voltaren)	10	1,60 ± 0,17	> 0,05
Lô 5 (Cao xoa Bách Xà)	10	2,40 ± 0,60	< 0,001

Kết quả bảng 3.22. cho thấy: Cao xoa Bách xà làm kéo dài rõ rệt thời gian phản ứng đau so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Điều này chứng tỏ: Cao xoa Bách xà có tác dụng giảm đau trên mô hình rê kim.

*** Nghiên cứu tác dụng giảm đau của cao xoa Bách xà trên mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin**

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của cao xoa Bách xà lên thời gian phản ứng đau

Lô chuột	n	Thời gian phản ứng đau (giây) ($\bar{X} \pm SD$)
Lô 1 (chứng sinh học)	10	1,49 ± 0,21
Lô 2 (Mô hình)	10	1,59 ± 0,28
p_{2-1}		> 0,05
Lô 3 (Tá dược)	10	1,53 ± 0,38
p_{3-2}		> 0,05
Lô 4 (Salonpas gel)	10	1,56 ± 0,27
p_{4-2}		> 0,05
Lô 5 (Voltaren)	10	2,00 ± 0,40
p_{5-2}		< 0,05
Lô 6 (Cao xoa Bách Xà)	10	1,88 ± 0,33
p_{6-2}		< 0,05

Kết quả bảng 3.23. cho thấy: Cao xoa Bách xà làm kéo dài thời gian đáp ứng đau so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Điều này chứng tỏ: Cao xoa Bách xà có tác dụng giảm đau trên mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin.

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TRÊN LÂM SÀNG

3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

Các đặc điểm về tuổi, giới, nghề nghiệp, chiều cao, cân nặng, mức độ bệnh của 2 nhóm trước điều trị như thời gian cứng khớp buổi sáng, chỉ số khớp sưng, khớp đau, chỉ số Ritchie, VAS, tốc độ máu lắng, DAS 28, HAQ của 2 nhóm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.2. Kết quả điều trị

3.2.2.1. Tác dụng giảm đau

* **Cải thiện thời gian cứng khớp buổi sáng** : Sau điều trị thời gian cứng khớp buổi sáng trung bình ở cả 2 nhóm đều giảm so với trước điều trị, nhóm nghiên cứu giảm thời gian cứng khớp buổi sáng từ $69,72 \pm 15,44$ (phút) xuống còn $15,47 \pm 14,29$ (phút), ($p < 0,05$). Nhóm chứng giảm từ $64,44 \pm 11,51$ (phút) xuống còn $42,69 \pm 13,41$ (phút). Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

* Cải thiện số khớp đau trung bình

Bảng 3.28: Hiệu quả cải thiện số khớp đau trung bình

Số khớp đau trung bình	Nhóm nghiên cứu (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm chứng (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	$8,80 \pm 1,54$	$9,80 \pm 3,19$	$> 0,05$
D ₃₀	$5,30 \pm 1,60$	$6,91 \pm 3,28$	$< 0,05$
Cải thiện trung bình (D ₃₀ - D ₀)	$-3,50 \pm 1,90$	$-2,89 \pm 2,07$	$< 0,05$
p(D ₀ - D ₃₀)	$< 0,05$	$< 0,05$	

Theo số liệu tại bảng 3.28 cho thấy: Sau điều trị số khớp đau trung bình của 2 nhóm giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị ($p < 0,05$). Tuy nhiên nhóm nghiên cứu có số khớp đau trung bình giảm nhiều hơn so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

* Cải thiện chỉ số Ritchie trung bình

Bảng 3.29: Cải thiện chỉ số Ritchie trung bình

Chỉ số Ritchie (điểm)	Nhóm nghiên cứu (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm chứng (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	$15,19 \pm 2,08$	$15,75 \pm 1,83$	$> 0,05$
D ₃₀	$5,92 \pm 3,79$	$10,36 \pm 3,26$	$< 0,05$
Cải thiện trung bình (D ₃₀ - D ₀)	$-9,28 \pm 4,05$	$-5,39 \pm 3,88$	$< 0,05$
p(D ₀ - D ₃₀)	$< 0,05$	$< 0,05$	

Số liệu tại bảng 3.29 cho thấy: Sau điều trị, chỉ số Ritchie trung bình của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng đều giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị ($p < 0,05$), mức cải thiện ở nhóm nghiên cứu cao hơn rõ rệt so với nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

* **Cải thiện mức độ đau trung bình theo thang điểm VAS** (VAS₁, VAS₂, VAS₃) sau điều trị ở nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2.2.2. Tác dụng chống viêm

Bảng 3.33: Hiệu quả cải thiện số khớp sưng trung bình

Số khớp sưng trung bình	Nhóm nghiên cứu (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm chứng (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	8,05 ± 2,27	8,25 ± 3,02	> 0,05
D ₃₀	2,50 ± 2,06	5,14 ± 2,13	< 0,05
Cải thiện trung bình (D ₃₀ - D ₀)	-5,55 ± 2,28	-3,11 ± 2,47	< 0,05
p(D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Số liệu tại bảng 3.33 cho thấy: Có sự cải thiện rõ rệt số khớp sưng trung bình ở cả 2 nhóm sau 1 tháng điều trị, tuy nhiên nhóm nghiên cứu có mức giảm số khớp sưng nhiều hơn nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 3.34: Cải thiện tốc độ máu lắng trung bình

Máu lắng giờ đầu trung bình (mm/giờ)	Nhóm nghiên cứu (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm chứng (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	42,39 ± 13,79	39,92 ± 10,44	> 0,05
D ₃₀	35,83 ± 16,02	40,67 ± 13,15	> 0,05
Cải thiện trung bình (D ₃₀ - D ₀)	-6,56 ± 16,13	0,75 ± 10,90	< 0,05
p (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	> 0,05	

Số liệu tại bảng 3.34 cho thấy: Sau điều trị, tốc độ máu lắng trung bình của nhóm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị với $p < 0,05$. Tốc độ máu lắng trung bình của nhóm chứng sau điều trị không khác biệt so với trước điều trị ($p > 0,05$).

Bảng 3.35: Cải thiện CRP trung bình của hai nhóm

CRP trung bình(mg//dl)	Nhóm nghiên cứu (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm chứng (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	10,46 ± 22,41	4,25 ± 6,62	> 0,05
D ₃₀	4,03 ± 5,37	5,98 ± 10,61	> 0,05
Cải thiện trung bình (D ₃₀ - D ₀)	-6,42 ± 20,83	1,74 ± 6,26	< 0,05
p (D ₀ - D ₃₀)	> 0,05	> 0,05	

Số liệu tại bảng 3.35 cho thấy: Sau điều trị, CRP trung bình của cả nhóm nghiên cứu và nhóm chứng đều chưa có sự thay đổi ở mức có ý nghĩa thống kê.

3.2.2.3. Tác dụng cải thiện hoạt động bệnh

* Cải thiện chức năng vận động theo HAQ

Bảng 3.36: Hiệu quả cải thiện chức năng vận động trung bình đánh giá theo bộ câu hỏi (HAQ)

HAQ	Nhóm nghiên cứu (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm chứng (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	2,31 ± 0,25	2,30 ± 0,28	> 0,05
D ₃₀	1,51 ± 0,17	1,95 ± 0,20	< 0,05
Cải thiện trung bình (D ₃₀ - D ₀)	-0,79 ± 0,29	-0,35 ± 0,18	< 0,05
p(D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Số liệu tại bảng 3.36 cho thấy: Sau điều trị chức năng vận động trung bình đánh giá theo bộ câu hỏi HAQ của cả 2 nhóm đều giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị ($p < 0,05$). Tuy nhiên mức giảm của nhóm nghiên cứu cao hơn so với nhóm chứng. sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

*** Đánh giá cải thiện bệnh theo tiêu chuẩn EULAR**

Bảng 3.37: Hiệu quả cải thiện chỉ số DAS 28 - CRP trung bình

Chỉ số DAS 28 - CRP	Nhóm nghiên cứu (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm chứng (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	4,79 ± 0,34	4,80 ± 0,51	> 0,05
D ₃₀	2,76 ± 0,63	4,18 ± 0,68	< 0,05
Cải thiện trung bình (D ₃₀ - D ₀)	-2,03 ± 0,63	-0,61 ± 0,52	< 0,05
P (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Theo số liệu tại bảng 3.37 cho thấy: Sau điều trị, chỉ số DAS 28 - CRP trung bình của 2 nhóm đều giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị với $p < 0,05$. Hiệu quả cải thiện ở nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng với ($p < 0,05$).

*** Đánh giá cải thiện bệnh theo tiêu chuẩn ACR**

Bảng 3.40: Tỷ lệ BN cải thiện ACR 20%, 50% và 70% theo tiêu chuẩn ACR

Đánh giá	Nhóm nghiên cứu (n=36)		Nhóm chứng (n=36)		p
	BN	%	BN	%	
Không cải thiện	3	8,33	15	41,67	< 0,05
Cải thiện ACR 20	33	91,67	21	58,33	
Cải thiện ACR 50	12	33,33	0	0	
Cải thiện ACR 70	0	0	0	0	

Số liệu tại bảng 3.40 cho thấy: Tỷ lệ BN ở nhóm nghiên cứu cải thiện theo tiêu chuẩn ACR lần lượt là: ACR 20 là 91,67%, ACR 50 là 33,33% cao hơn nhóm chứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong đó ở nhóm chứng không có BN nào đạt mức cải thiện ACR 50 và ACR 70.

3.3. TÁC DỤNG KHÔNG MONG MUỐN:

- Trên lâm sàng: Chưa thấy tác dụng không mong muốn của cao xoa Bách xà trên lâm sàng trong thời gian nghiên cứu của đề tài.

- Trên cận lâm sàng: Một số chỉ số về huyết học, sinh hóa như: số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hemoglobin, TĐML giờ đầu, CRP, ure, creatinin, glucose, ALT, AST, cholesterol, triglycerit, cũng như cấu trúc đại thể và vi thể gan thận thỏ sau điều trị thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị và so với nhóm chứng ($p > 0,05$).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Bàn luận về kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm

4.1.1. Độc tính cấp, bán trường diễn và kích ứng da

- **Độc tính cấp:** Kết quả là đã xác định được liều chết 50%: LD50 = 14,543 (16,311 - 11,007) g/kg, kết quả này cho thấy: Cao xoa Bách xà không có độc tính cấp ở liều 5g/kg đường tiêm dưới da trên chuột nhắt trắng và dùng an toàn trong 72 giờ. Do đó có thể dùng cao xoa Bách Xà trong các bệnh lý mạn tính.

- **Độc tính bán trường diễn:** Theo kết quả nghiên cứu, dùng cao xoa Bách xà liều tương đương lâm sàng và gấp 2 lần liều lâm sàng không làm ảnh hưởng đến chức năng gan thận và không làm thay đổi mô bệnh học gan thận thỏ. Như vậy cao xoa Bách xà không gây độc tính bán trường diễn trên thỏ theo đường bôi ngoài da.

- **Kích ứng da của cao xoa Bách xà:** Kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm cao xoa Bách xà với hàm lượng 0,5g bôi trên da thô diện tích 2,5 cm²: gây kích ứng mức độ vừa tại thời điểm 1 giờ sau khi loại bỏ thuốc, kích ứng mức độ nhẹ tại các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Thời gian phục hồi tổn thương hoàn toàn là sau tối đa 6 ngày. Như vậy theo hướng dẫn OECD, cao xoa Bách xà được phép sử dụng bôi ngoài da.

4.1.2. Tác dụng giảm đau và chống viêm

- **Tác dụng giảm đau:** Cao xoa Bách xà không có tác dụng giảm đau theo cơ chế trung ương mà có tác dụng giảm đau theo cơ chế ngoại vi trên mô hình rê kim và mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin. Đau thường có liên quan đến viêm. Quá trình viêm gây tổn thương các mô, kích thích giải phóng các chất trung gian gây viêm (prostaglandin, bradykinin, histamin, v.v...), các chất trung gian gây viêm này có thể kích thích đầu tận cùng thần kinh cảm giác, và làm tăng nhạy cảm của các receptor nhận cảm cảm giác với các tác nhân gây đau. Cao xoa Bách xà có tác dụng giảm đau có lẽ do khả năng ức chế quá trình viêm, từ đó ức chế sự giải phóng các chất trung gian gây viêm do đó có tác dụng giảm đau.

- **Tác dụng chống viêm:** bôi 5 lần cao xoa Bách xà vào gan bàn chân sau của chuột với liều lượng 0,2 gam/lần có tác dụng ức chế viêm trên mô hình viêm cấp tại chỗ chân chuột công trắng bằng carrageenin, thể hiện ở tác dụng làm giảm thể tích và độ dày của chân chuột công ở tất cả các thời điểm nghiên cứu. Tác dụng chống viêm cấp tại chỗ của cao xoa Bách xà, với thành phần chính là nọc rắn hổ mang, trên mô hình nghiên cứu này là tương đương với diclofenac.

4.2. Bàn luận về kết quả nghiên cứu trên lâm sàng

4.2.1. Sự tương đồng của 2 nhóm nghiên cứu: 2 nhóm bệnh nhân có sự tương đồng về tuổi, giới, thời gian mắc bệnh, mức độ bệnh trước điều trị. Đây là một tiêu chí quan trọng trong nghiên cứu đối chứng nhằm đảm bảo tính khách quan của kết quả nghiên cứu.

4.2.2. Hiệu quả điều trị

4.2.2.1. Tác dụng giảm đau: Sau điều trị, thời gian cứng khớp trung bình, số khớp đau trung bình, điểm trung bình VAS₁, VAS₂, VAS₃ và chỉ số Ritchie của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng đều giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị ($p < 0,05$). Tuy nhiên, mức giảm của nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Nhóm nghiên cứu có thời gian cứng khớp buổi sáng trung bình giảm từ $69,72 \pm 15,44$ (phút) xuống còn $15,47 \pm 14,29$ (phút), ($p < 0,05$). Nhóm chứng giảm từ $64,44 \pm 11,51$ (phút) xuống còn $42,69 \pm 13,41$ (phút). Mức cải thiện số khớp đau trung bình ở nhóm nghiên cứu là $3,50 \pm 1,90$, nhóm chứng là $2,89 \pm 2,07$. Mức cải thiện trung bình chỉ số Ritchie ở nhóm nghiên cứu là $9,28 \pm 4,05$, nhóm chứng là $5,39 \pm 3,88$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tác dụng giảm đau của cao xoa Bách xà cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm. Theo kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm của chúng tôi ở bảng 3.22; 3.23: tác dụng giảm đau của cao xoa Bách xà được thể hiện trên mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin và mô hình rê kim, thể hiện bằng việc kéo dài thời gian xuất hiện phản xạ co chân trên máy đo đau bằng phương pháp rê kim và trên mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin.

4.2.2.2. Tác dụng chống viêm: Sau điều trị số khớp sưng trung bình, tốc độ máu lắng trung bình của nhóm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị với $p < 0,05$. Kết quả bảng 3.33 cho thấy

mức cải thiện số khớp sưng trung bình của nhóm nghiên cứu sau điều trị là $5,55 \pm 2,28$ (khớp) nhiều hơn nhóm chứng $3,11 \pm 2,47$ (khớp). Tác dụng chống viêm trên lâm sàng cũng phù hợp với kết quả chống viêm cấp trên thực nghiệm là cao xoa Bách xà có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột cống bằng carrageenin, thể hiện ở khả năng làm giảm thể tích và độ dày của chân chuột cống ở tất cả các thời điểm nghiên cứu. Một số nghiên cứu về tác dụng dược lý và độc tính của nọc rắn và chế phẩm dùng trong chống viêm, giảm đau đã bước đầu đưa ra kết luận: nọc rắn và chế phẩm có chứa nọc rắn hổ mang có tác dụng chống viêm, giảm đau trên thực nghiệm.

4.2.2.3. Tác dụng cải thiện hoạt động bệnh: Bảng 3.36 cho thấy mức cải thiện chức năng vận động trung bình theo bộ câu hỏi HAQ ở nhóm nghiên cứu là $0,79 \pm 0,29$, nhóm chứng là $0,35 \pm 0,18$. Sự khác biệt giữa 2 nhóm có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và mức độ cải thiện chức năng vận động HAQ tỷ lệ thuận với mức độ giảm đau và giảm sưng trên lâm sàng. Với kết quả nghiên cứu về tác dụng giảm đau và chống viêm trên lâm sàng cũng như trên thực nghiệm thì mức độ cải thiện chỉ số HAQ là hoàn toàn phù hợp. Bảng 3.37 cho thấy mức cải thiện trung bình DAS 28- CRP sau điều trị của nhóm nghiên cứu là $2,03 \pm 0,63$ (tương ứng - bệnh cải thiện tốt), nhóm chứng là $0,61 \pm 0,52$ (bệnh cải thiện trung bình). Bảng 3.40 cho thấy tỷ lệ bệnh nhân cải thiện ACR20% và 50% ở nhóm nghiên cứu lần lượt là 91,67% và 33,33%, nhóm chứng có 58,33% cải thiện ACR20 và không có cải thiện ACR 50%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

4.2.3. Tác dụng không mong muốn của cao xoa Bách xà:

Chưa thấy tác dụng không mong muốn của cao xoa Bách xà trên lâm sàng và cận lâm sàng trong thời gian nghiên cứu của đề tài.

KẾT LUẬN

1. Cao xoa Bách xà không có độc tính cấp ở liều 5g/kg đường tiêm dưới da trên chuột nhắt trắng và với liều từ 7,5g/kg trở lên đã xác định được liều chết 50% (LD_{50}). Chưa xác định được độc tính bán trường diễn trên thỏ theo đường bôi ngoài da trên động vật thực nghiệm. Khả năng gây kích ứng da ở mức độ nhẹ và vừa. Cao xoa Bách xà có tác dụng giảm đau theo cơ chế giảm đau ngoại vi và có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình động vật thực nghiệm.

- Trên chuột nhắt trắng với liều từ 7,5g/kg trở lên đã xác định được liều chết 50% $LD_{50} = 14,543 (16,311 - 11,007)$ g/kg.

- Cao xoa Bách xà với liều 0,75g/kg/lần, 2 lần/ngày bôi liên tục trong 4 tuần chưa thấy biến đổi các chỉ số cân nặng, tình trạng chung, huyết học, hóa sinh và không biến đổi hình thái đại thể và vi thể gan thận thỏ so với lô chứng ($p > 0,05$).

- Cao xoa Bách xà với liều 0,5g bôi trên da thỏ diện tích 2,5 cm² gây kích ứng da mức độ nhẹ đến vừa tùy thời điểm. Các kích ứng tự khỏi hoàn toàn sau 6 ngày.

- Cao xoa Bách xà có tác dụng ức chế viêm trên mô hình viêm cấp tại chỗ chân chuột cống trắng bằng carrageenin ($p < 0,05$). Tác dụng này tương đương với Voltaren.

- Cao xoa Bách xà bôi có tác dụng giảm đau rõ rệt trên mô hình rê kim và mô hình gây phù viêm bằng carrageenin ($p < 0,05$).

2. Cao xoa Bách xà xoa ngoài kết hợp với bài thuốc uống trong Quế chi thực dược tri mẫu thang có tác dụng tốt trong điều trị bệnh VKDT giai đoạn I, II, mức độ hoạt động bệnh nhẹ và trung bình trên lâm sàng (thể hàn nhiệt tắc tậ).

- Thời gian cứng khớp buổi sáng, số khớp đau trung bình, chỉ số Ritchie, VAS₁, VAS₂, VAS₃ sau điều trị đều giảm rõ rệt so với trước điều trị ($p < 0,05$).

- Số khớp sưng, TĐML trung bình của nhóm nghiên cứu sau điều trị đều giảm rõ rệt so với trước điều trị ($p < 0,05$).

- Mức độ hoạt động bệnh sau điều trị cải thiện tốt: cải thiện chỉ số HAQ trung bình là $0,79 \pm 0,29$, chỉ số DAS 28 - CRP trung bình là $2,03 \pm 0,63$, chỉ số ACR20 là 91,67%, chỉ số ACR50 là 33,33%.

Mức cải thiện các chỉ số trên đều cao hơn so với nhóm chứng ở mức có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Chưa thấy tác dụng không mong muốn của cao xoa Bách xà trên lâm sàng và cận lâm sàng trong 30 ngày điều trị bệnh nhân VKDT.

KIẾN NGHỊ

Bước đầu nghiên cứu trên lâm sàng cho thấy cao xoa Bách xà sử dụng an toàn, tiện lợi và có hiệu quả điều trị tốt trên bệnh nhân VKDT giai đoạn I, II. Vì vậy, nên được triển khai nghiên cứu với số lượng BN lớn hơn, thời gian nghiên cứu dài hơn.

Cần tiếp tục triển khai nghiên cứu, áp dụng điều trị trên một số bệnh lý khác trong nhóm bệnh lý cơ xương khớp và thần kinh.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC
GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN**

1. Đinh Thị Lam, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Đỗ Thị Phương, Phạm Thị Vân Anh, Mai Phương Thanh (2016), Độc tính bán trường diễn của cao xoa Bách xà trên độc vật thực nghiệm, *Tạp chí nghiên cứu Y học*, tập 99, số 1, 32 - 39.
2. Đinh Thị Lam, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Đỗ Thị Phương, Phạm Thị Vân Anh (2016), Xác định độc tính cấp và đánh giá khả năng gây kích ứng da của cao xoa Bách xà trên động vật thực nghiệm, *Tạp chí Y Dược học cổ truyền Việt Nam*, số 49, 50 - 55.
3. Dinh Thi Lam, Nguyen Tran Thi Giang Huong, Do Thi Phuong, Pham Thi Van Anh, Mai Phuong Thanh (2016), Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of bach xa balm, *Vietnam Journal of Medicine & Pharmacy*, 11(2), 28 – 36.
4. Đinh Thị Lam, Đỗ Thị Phương, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương (2017), Tác dụng của cao xoa bách xà trong hỗ trợ điều trị bệnh nhân viêm khớp dạng thấp, *Tạp chí Y học thực hành*, 6 (1049), tr. 139 – 141.

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF HEALTH
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

DINH THI LAM

**STUDYING THE SAFETY, ANTI-INFLAMMATORY,
AND ANALGESIC EFFECTS OF BACH XA BALM IN
EXPERIMENTAL AND CLINICAL CONDITIONS OF
RHEUMATOID ARTHRITIS STAGE I AND II**

Major : Traditional medicine

Code : 62720201

SUMMARY OF THESIS OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN MEDICINE

HANOI – 2017

**THE WORK HAS BEEN COMPLETED AT HANOI MEDICAL
UNIVERSITY**

Supervisor:

- 1. Assoc. Prof. PhD. Do Thi Phuong**
- 2. Assoc. Prof. PhD. Nguyen Tran Thi Giang Huong**

Opponent 1: Assoc. Prof. PhD. Nguyen Minh Ha

Opponent 2: Prof. PhD. Hoang Kim Huyen

Opponent 3: Assoc. Prof. PhD. Nguyen Thi Ngoc Lan

The thesis will be defended at Board of Examiners of Hanoi
Medical University.....

The thesis can be found at:

- 1. National library of Vietnam**
- 2. Library of Hanoi Medical University**

INTRODUCTION

1. The urgency of the study

Rheumatoid Arthritis (RA) is a typical long-term autoimmune disease that affects joints to different extent. RA also affects organs other than joints and even the whole body. The cause and pathogenesis of RA has not been thoroughly determined, and thus the treatment of this complicated disease still poses several challenges. Despite the fact that a number of treatment remedies and medications, as well as newly produced medications, have been used to treat RA, the cure for the disease remained to be identified. Long-term use of modern medications in the treatment of RA leads to several undesirable effects. According to traditional medicine, RA is categorised as “Bi “ Bi in general and RA in particular have long been treated with many traditional medicine remedies which showed high efficacy and safety. However, previous studies mainly focused on oral-administered traditional medications and remedies for RA. Studies investigating dermal absorption-administered traditional medications and remedies for RA have been scarce. In recent years, with the great development of pharmaceutical technology and traditional medication production, dermal absorption-administered traditional medications have been put into research, production and supply for treatment. Bach xa balm is a dermal absorption-administered traditional medicine product composed mainly of cobra venom, methyl salicylate, camphor, cinnamon and mint essential oils. In an attempt to investigate the treatment efficacy and safety of Bach xa balm, we conducted the research with two objectives.

2. Study objectives

1. *Studying the acute and subacute toxicity, skin irritation as well as the anti-inflammatory and analgesic effects of Bach xa balm in experimental conditions.*
2. *Evaluating the efficacy of the combined treatment of Bach xa balm and the ancient remedy Gui zhi shao yao zhi mu tang in patients with rheumatoid arthritis stage I and II (the type of mixed cold-heat according to traditional medicine point of view).*

3. Practical implications and new contributions of the thesis

The thesis aims to investigate the efficacy of Bach xa balm, a dermal absorption-administered traditional medicine product, of which the main component is cobra venom. The studies included in the thesis were performed systematically and scientifically. This thesis is both fundamental and applicable, creating a bridge between laboratory research and clinical uses of the product. Findings from

the experimental studies showed that Bach xa balm exerted no acute toxicity at the dose of 5 g/kg when administered by subcutaneous injection in white mice; and no subacute toxicity was found on experimental rabbits when administered this product by dermal absorption. Bach xa balm induced mild and moderate skin irritation. Bach xa balm showed peripheral analgesic and acute anti-inflammatory effects in experimental animal models. Findings from the clinical study showed that the combined treatment of dermal absorption-administered Bach xa balm and oral-administered ancient remedy Gui zhi shao yao zhi mu tang exerted good efficacy in treating rheumatoid arthritis stage I and II with active levels of mild and moderate (the type of mixed cold-heat according to traditional medicine point of view). Its efficacy were exposed through the effects on reducing pain and swollen joints, thus improving active level with an average improvement of 0.79 ± 0.29 in HAQ score, 2.03 ± 0.63 in DAS 28 – CRP score, 91.67% in ACR20 score, and 33.33% in ACR50 score. The improvement in these scores was statistically significantly higher in the study group as compared to the control group ($p < 0.05$). The use of Bach xa balm showed no clinical and sub-clinical adverse effect during the course of treatment. These findings are scientific indications of the safety and anti-inflammatory and analgesic effects of Bach xa blam in treating RA.

4. Thesis structure: Apart from the Introduction and Conclusions chapters, the thesis consists of four chapters

Chapter 1: Literature review	37 pages
Chapter 2: Study subjects and methods	23 pages
Chapter 3: Results	41 pages
Chapter 4: Discussion	37 pages

And 45 tables, 12 graphs, 12 images, 3 figures, 6 appendixes, and 140 references (57 Vietnamese references, 60 English references, 23 Chinese references).

Chapter 1

LITERATURE REVIEW

1.1. The concept of RA according to modern medicine

1.1.1. Cause and pathogenesis

RA is a chronic autoimmune disease of joints that is thought to be caused by the combination of several factors, including infection and genetic factors. Studies have shown that immune responses occurring

in the synovial membrane are essential in RA, in which T lymphocytes play a key role.

1.1.2. Diagnosis of RA: according to the ACR of 1987 established by the American Association of Rheumatology.

1.1.3. Treatment of RA

Depending on the stage of RA, the appropriate treatment is determined, including systemic treatment, on-site treatment, rehabilitation, and surgical treatment. Systemic treatment of RA should combine multiple drug groups. Below are the principles for combining different groups of drugs.

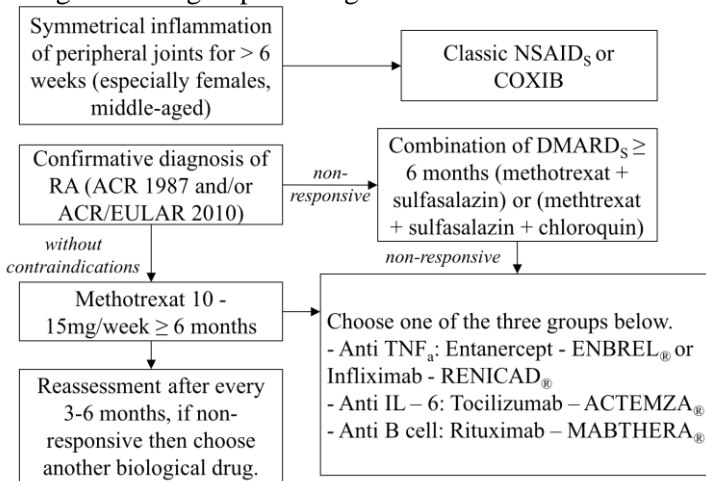


Figure 1.2. Summary of RA treatment

1.2. The concept of RA according to traditional medicine

1.2.1. Cause and pathogenesis

RA is categorized as traditional medicine. The causes of “Bi Zheng” include six emotional factors, and other pathogenic factors.

The pathogenesis mechanism is due to congenital deficiency, deficiency of the liver and kidney, or frequent invasion by wind, cold, damp, or heat, leading to stagnant condition of blood, qi and meridians. Such stagnancy causes painful, swelling joints partially or totally.

1.2.2. Treatment of RA

According to traditional medicine, the treatment of RA is dependent on RA clinical patterns to choose the appropriate treatment

principles and specific treatments. However, the general principle is to treat the cause combining with symptomatic treatment by circulating blood and qi to reduce joint pain and swelling. In classic medical literature has been classified into two major patterns, including wind cold damp impediment pattern and wind damp heat impediment pattern. Recently, in order to fully reflect the diversity of “Bi zhen gong” based on Chinese Internal Medicine has divided “Bi zhen gong” into . Accordingly, the treatment principles for each patterns are specified: For the wind damp impediment pattern, the principles consist of dispelling wind, eliminating dampness, circulating meridians and analgesic. For the wind cold impediment pattern, the principles include of warming meridian, scattering cold, eliminating dampness and circulating meridians. For the cold syndrome associated with heat syndrome pattern, the principles include of warming meridian, scattering cold, reducing heat, eliminating dampness. The principle of the damp heat impediment pattern is to reduce heat, eliminate dampness, analgesic and circulate meridians. The blood stagnation has the principle of circulating blood, dispelling stasis, nourishing tendon, circulating meridians. The principles of phfootm pattern include of transforming phfootm, circulating qi, circulating meridians, analgesic. The phfootm stasis has the principles of circulating blood, dispelling stasis, transforming phfootm and circulating meridians. The principles of qi and yin vacuity pattern consist of nourishing qi and yin, circulating blood and circulating meridians. The liver and kidney vacuity pattern has the principles of supplementing the liver and kidney.

1.3. Review on studies investigating the efficacy of traditional medications in the treatment of RA

Research on treating RA by traditional medications includes experimental and clinical studies. Some ancient remedies such as “San pi tang” (with addition and subtraction) or some medicinal plants, such as *Rhizoma Cibotii*, *Smilacis Glabrae*, *Rhizoma Drynariae fortunei*, and the like, have been studied experimentally. Research results indicated that traditional herbs have analgesic and anti-inflammatory effects in experimental conditions. However, so far there has not been a large number of experimental studies. Besides, studies of traditional medicine remedies, medicinal preparations, and traditional herbs,

have also been conducted clinically. In the past, some studies focused only on treating (Chai bi tang” ,Du hua ji sheng tang” ,Juan“bi tang” ,Wo dou tang” ,San pi tang”) and single traditional medicine products (Thap capsules” , “Thap capsules”). Recently, by the updated understanding of RA pathogenesis, a new trend of research on using medicinal plants combined with modern medications in the treatment RA has been concerned.

Some experimental and clinical studies have been performed with the aim to assess the efficacy of traditional medications in RA treatment. Some remedies, such as Gui zhi shao yao zhi mu tang, “San pi tang” (with additions and subtractions) or some medicinal plants, such as Rhizoma Cibotii, Smilacis Glabrae, and Rhizoma Drynariae fortunei, have been studied and shown to exert analgesic and anti-inflammatory effects in experimental conditions. However, there have been only a small number of experimental studies on these effects of traditional medications. Clinical studies on traditional medicine remedies, drug preparations and pharmacological ingredients have also been scarce. Previous studies have focused on oral-administered traditional medication remedies (Chu bi tang” , “Gui zhi shao yao zhi mu tang” ,Du hua ji sheng tang” ,Juan“bi tang” ,Wo dou tang” ,San pi tang” , Yué bi tang” , “Bi tong tang (with additions and subtractions) and preparations (Thap capsules” , “Thap capsules” , “Phong te” Thap capsules” , “Thap capsules” , “Thap capsules”). In recent years, the traditional medicine pharmaceutical technology has witnessed great development, leading to the production and availability of several dermal absorption-administered traditional medications for use in disease treatment, such as Osapain cream, ” Bone alcoholt l i n h alcohol used to put on skin, Hero patches, massaging alcohol, Cobratox balm (Cuu Long Easten Pharmaceutical company), Hong Linh balm (Quang Binh pharmaceutical company), and Najatox preparation (Makorpha Chemical and Pharmaceutical joint stock company). Recently, more attention has been paid to combining oral-administered traditional medications with traditional medications administered on the surface of the body, such as massaging, using patches, and soaking in order to increase treatment efficacy. However

The number of studies on traditional medications administered on the body surface has, however, been modest.

1.3. Review of Bach xa balm

* **Origin:** based on folk experience of using cobra venom in the treatment of musculoskeletal disorders, the evidence of the anti-inflammatory and analgesic effects of cobra venom in experimental and clinical conditions, and several scientific studies in Vietnam and abroad, the Pharmaceutical technology business has introduced to the market some dermal absorption-administered medications and drugs whose main component is dried cobra venom, and which consist of cobra venom and different pharmacological components, such as Najatox balm and Cobrattox balm. In 2012, Nam Duoc company carried out investigations and identified a formula for a dermal absorption-administered medication product composed mainly of cobra venom and some other components, which was named Bach xa balm.

* **Components and efficacy of Bach xa balm:** 0.06mg dried cobra venom, 2.4g methyl salicylate, 2.1g camphor, 1.32g mint essential oil, 0.72g methol, and 0.3g cinnamon essential oil.

+ **Methyl salicylate** possesses anti-inflammatory and analgesic properties, and is often combined with essential oils in dermal absorption-administered medications.

+ **Camphor** is extracted from essential oil of the cinamomum camphora. Camphor has skin stimulating, vasolidating, and antipruritic effects.

+ **Mint essential oil** (oleum menthae) is extracted from parts of the Mint plant (mentha arvensis L) that develop above the ground. Pharmacological efficacy: mint essential oil evaporates quickly and induces the feeling of local cool and numbness, and is frequently used for nerve, bone, and muscle pain.

+ **Cinnamon essential oil** (oleum cinnamoni) is extracted from the peel of cinnamon plants; this substance is in liquid form with a yellow or brown-reddish colour, has a pleasant scent and spicy flavour. Efficacy: cinnamon oil leads to sweating, warming up contracted muscles and the meridian, and stimulating blood flow. This substance is used in dermal absorption-administered traditional medications for treating muscle pain, muscle cramp, bone and joint pain, nerve pain, and muscle contraction due to cold.

+ **Cobra venom** is produced from Cobra snakes. The chemical composition of snake venom is highly complex, consisting of various

proteins, different enzymes, neurotoxins, cardio toxins, hemolytic substances, bleeding agents, blood coagulants, anticoagulants, allergens, and antibodies. Cobra venom also contains crotalotoxin, cobaltin, alcaloit (monocrotalin), and a very high amount of zinc. Use of cobra venom in disease treatment: according to traditional medicine, snakes (not including internal organs) has properties of warmth and sweetness, impacting the liver and spleen meridians. Cobra venom has effects on dispelling wind, eliminating dampness, reducing inflammation and pain. So far, snake venom has been considered as a valuable pharmacological agent. Most commonly, cobra venom is used to produce some dermal absorption-administered medications for the treatment of nerve pain, myositis, and joint diseases.

Chapter 2

STUDY MATERIALS, SUBJECTS AND METHODS

2.1. STUDY MATERIALS

2.1.1. Experimental studies: Bach xa balm with the composition of 0.06mg dried cobra venom, 2.4g methyl salicylate, 2.1g camphor, 1.32g mint essential oil, 0.72g methol, and 0.3g cinnamon essential oil. The balm is produced by Nam Duoc company and has been granted certification of basic-level standard.

2.1.2. Clinical studies: The dermal absorption-administered product is Bach xa balm with the components as described in 2.1.1 and is used for the study group. The placebo balm used for the control group has the composition of 0.72g methyl salicylate, 0.36g camphor, and 0.36g essential oil of herba baeckea; the placebo balm is produced by Nam Duoc company and has been granted certification of basic-level standard. The oral-administered in the study is the ancient remedy Gui zhi shao yao zhi mu tang composed of Qu chi (Ramulus Cinnamomi) 8g, chích cam th o (Radix Glycyrrhizae) 8g, b ch tru t (Rhizoma Atractylodis macrocephalae) 12g, phòng phong (Radix Ledebouriellae seseloidis) 12g, s i n (Rhizoma Zingiberis) 4g, b c h c t h (Radix Paeoniae) 12g, ma hoàng (Herba Ephedrae) 8g, tri m u (Rhizoma Anemarrhenae) 12g, ph t ch (Radix Aconiti praeparatus) 8g. These pharmacologically active ingredients have been standardised according to Vietnam's pharmacopoeia.

2.2. STUDY SUBJECTS

The studies were conducted from October 2014 to December 2016.

2.2.1. Subjects in experimental studies: Swiss white mice, Wistar white rats, and Newzealand White rabbits provided by Son Tay Goat and Rabbit Breeding Centre, National Institute for Hygiene and Epidemiology, and Vietnam Military Medical Academy.

Location of the experimental studies: Department of Pharmacology, Hanoi Medical University.

2.2.2. Subjects in clinical studies: The sample size was calculated according to formulas for clinical studies established by World Health Organisation. The study was performed on 72 patients with rheumatoid arthritis who were divided into two groups: 36 patients in the study group and 36 patients in the control group.

Location of the clinical studies: Department of National Medicine, Dong Da General Hospital.

* **Inclusion criteria:** All male and female subjects of all occupations who received a confirmative diagnosis of RA based on the ACR of 1987, stage I and II with active levels of mild and moderate based on DAS 28 formula (activity score based on 28 joints –DAS 28): mild activity (2.6 <math>DAS < 2</math>) and moderate activity (3.2 <math>DAS < 2.8</math> 5.1), of 18 years of age or above were included in the study. Informed consent was obtained from all subjects.

* **Exclusion criteria:** Subjects with skin infection, skin lesions, skin sores, atopic dermatitis, skin irritation, sensory disorders, chronic cardiovascular diseases, hepatic failure, renal failure, infectious diseases, diseases of blood-producing organs, cancers; pregnant women; and subjects violating the study protocol were excluded from the study.

2.3. STUDY METHODS

2.3.1. Experimental studies: We conducted an experimental controlled study with the following stages.

2.3.1.1. Investigating the acute and subacute toxicity and the skin irritation effects of Bach xa balm

* **Acute toxicity:** was assessed in white mice using Litchfield - Wilcoxon method based on OECD and WHO guidelines. The mice received the medication under investigation with increasing doses through subcutaneous injections on the back of neck. The aim was to identify the non-lethal highest dose (0%), the lethal lowest dose (100%) and the intermediate doses. The mice were observed for 72 hours to monitor their mortality rate and overall health condition; and

were observed for 7 days since medication administration to monitor mortality rate.

* **Subacute toxicity:** was assessed on rabbits given dermal absorption-administered medication with the dose of 0.75 g/kg/time x 2 times/day (corresponding to the clinical dose) and 1.5 g/kg/time x 2 times/day (which is two-fold higher than the original dose); the duration of medication administration was 4 weeks. We observed the rabbits to monitor their weight, eating, sleeping, activity, digestion, hematology, biochemistry, liver and kidney function, liver and kidney histopathology. Comparisons were made between pre- and post-treatment, and between the treatment and control groups.

* **Skin irritation:** was examined on rabbits based on OECD guideline. The rabbits were shaved at the back and hips. The shaved skin was divided into two sections, each having an area of approximately 6 cm² (2.5cm x 2.5cm) per rabbit, and was used to apply 0.5g of the study medication. The controlled skin area was applied with 0.5 g excipient. We performed evaluation and scoring of erythema, oedema at 1, 24, 48, 72 hours after elimination of the medication. If there were signs of skin damage, we followed up the rabbits for 14 days to assess their skin recovery.

2.3.1.2. Acute anti-inflammatory effects

* **Acute anti-inflammatory effects in rat foot oedema-inducing model using carrageenin:** The rats were randomised into 4 groups; Group 1 (biological control): no intervention was carried out, Group 2: treated with 0.2g excipient per foot, Group 3: treated with 0.2g Voltaren per foot, Group 4: treated with 0.2g Bach xa balm per foot. The rats received treatment 5 times per days for 3 successive days. In the first day, after 1 hour since the application of the reagents, rat foot inflammation was caused using carrageenin 1%. We measured the volume and thickness of the rat foot at the time before inflammation was caused (V0); 1 hour after inflammation was caused (V1), 2 hours (V2), 4 hours (V3) and 6 hours (V4), 24 hours (V5), 30 hours (V6) and 48 hours (V7) since the induction of inflammation.

* **Acute anti-inflammatory effects on ear inflammation-inducing model using Croton oil:** 60 white mice were randomised into 6 groups, each group including 10 mice. Group 1 (induction group) induction was carried out on the right ear. Group 2 (clobetason):

induction + Clobetason administered at the dose of 0.02 g/time x once on the right ear after 1 hour since induction. Group 3 (Bach xa, once): induction + Bach xa balm administered at the dose of 0.02 g/time x once on the right ear after 1 hour since induction. Group 4 (excipient, once): induction + excipient administered at the dose of 0.02 g/time x once on the right ear after 1 hour since induction. Group 5 (Bach xa, thrice): induction + Bach xa balm administered at the dose of 0.02g/time on the right ear, the first dose was administered 2 days before induction, the second dose was administered 1 day before induction, and the third dose was administered after 1 hour since induction. Group 6 (excipient, thrice): induction + excipient administered at the dose of 0.02 g/time on the right ear, the first dose was administered 2 days before induction, the second dose was administered 1 day before induction, and the third dose was administered after 1 hour since induction. Induction was not performed and no treatment was given to the left ears of all mice. Ear thickness was measured for all mice before induction with croton oil preserved in acetone. Ear thickness was measured at the location near the top of the ear, away from the tip of the cartilage. In order to limit errors, ear thickness measurement was conducted by only one study staff. Six hours after induction, the mice were killed by distal vertebrae, their ear thickness were re-measured, and after that a cut was made at the centre with a diameter of 7 mm using a biopsy instrument to measure weight.

2.3.1.4. Study of analgesic effects

* ***Hot plate model:*** White mice were randomised into 6 groups, each Group including 10 mice. Group 1 (biological control): no substance was applied on either of two foots. Plot 2 (Excipient): excipient was applied on both paws entirely. Group 3 (Salonpas Gel): Salonpas Gel was applied on both paws entirely. Group 4 (Voltaren): Voltarel was applied on both paws entirely. Group 5 (Lidocaine): lidocaine was applied on both paws entirely. Group 6 (Bach xa balm): Bach xa balm was applied on both paws entirely. The time of response to temperature among the mice was measured after 30 minutes since reagent application.

* ***Tail - flick and needle pricking models:*** White mice were randomised into 5 groups; Group 1 was the controlled group, Group 2 was given excipient, Group 3 was given Salonpas Gel, Group 4 was

given Voltarel, and Group 5 was given Bach xa balm. In the tail-flick model, the reagents were applied on the tails were placed near a heat source. When each mouse flicked its tail, a machine automatically measured response to the heat source. In the needle prickling model, the reagents were applied on the mice centre of each mouse's footpad. The button was the measurement, the machine automatically measured the time of the mouse's response. Each mouse's response was evaluated after 30 minutes since reagent application.

*** Mouse foot oedema-inducing model using carrageenin 1%:** White mice were randomised into 6 groups, each group including 10 mice. Group 1 (biological control): no intervention was conducted. Group 2 (induction): foot-oedema induced. Group 3 (Excipient): foot-oedema induced, treated with excipient. Group 4 (positive control Voltaren): foot-oedema induced, treated with Voltarel. Group 5 (positive control Salonpas Gel): foot-oedema induced, treated with Salonpas Gel. Group 6 (Bach xa balm): foot-oedema induced, treated with Bach xa balm. Foot-oedema was induced by injecting 0.2 mL of carrageenin solution 0.1%. After 90 minutes since foot-oedema induction, the mice in each group were treated with the excipient or reagent corresponding to their group. After 30 minutes since excipient or reagent application, needle prickling method was used to evaluate their pain threshold. Evaluation on the mice's reaction was carried out 30 minutes after applying the excipient or reagent.

2.3.2. Clinical studies:

2.3.2.1. Study design: Clinical intervention, prospective placebo-controlled double-blind study.

2.3.2.2. Study protocol:

After clinical examination, the patients who met the inclusion criteria were enrolled into the study. An independent study staff divided the study subjects into 2 groups who were comparable regarding age, sex, disease stage and active level. After that, each patient was encoded using a code attached to his/her medical record. The information whether the patients were in the study or control group was entirely unknown to all the patients and healthcare staff who were directly involved in the treatment of the

patients. The medication under investigation and the placebo were presented in the same format and flavour.

The control group consisted of 36 patients who were treated with the placebo balm. The study group consisted of 36 patients who were treated with dermal absorption-administered Bach xa balm. The treatment was as follows: the balm was administered for 5 days and then stopped for the next 2 days. The course of treatment lasted 30 days during which the patients were hospitalised. Thus, the balm was given to the patients for a total of 20 days. The oral-administered medication used in this study was the ancient remedy Gui zhi shao yao zhi mu tang, which was administered at the dose of 100ml per time x 2 times/day in 30 successive identical days. The patients were only revealed after the course of treatment was completed, and then data collection, analysis and report were carried out.

2.3.2.3. Study indicators

Clinical indicators: duration of morning joint stiffness, number of painful joints, VAS (Visual Analog Scale), Ritchie index, number of swollen joints, disease improvement based on physical function (Health Assessment Questionnaire - HAQ), DAS 28 - CRP, and disease improvement according to ACR. These clinical indicators were assessed in the first day (D_0) and the 30th day (D_{30}) of the treatment course. Adverse effects were monitored during the whole course of treatment.

Sub-clinical indicators: number of red blood cells, white blood cells, platelets, hemoglobin, glucose, cholesterol, triglyceride, Erythrocyte Sediment Rate (ESR) index, C-reactive protein (CRP) rate and laboratory tests of liver and kidney functions, such as urea, creatinine, AST, and ALT, were evaluated at the time of D_0 and D_{30} of the treatment course.

2.3.2.4. Methods for evaluation the results

- Evaluation of treatment efficacy: An improvement of 20%, 50%, and 70% was assessed according to ACR criteria. The improvement in disease active level was evaluated based on EULAR 2010 criteria: compare the DAS 28 index pre- and post-treatment (DAS 28

difference < 0.6 : no improvement
moderate improvement, the difference

- Clinical and sub-clinical adverse effects were monitored.

2.3.2.5. Statistical analyses: Data analyses were performed using SPSS 18.0. A p-value of < 0.05 was considered statistically significant.

2.3.2.6. Research ethics: The study was approved by the Medical Ethics Committee of Hanoi Medical University. Permission for the study to be conducted at Dong Da General Hospital was retrieved from the hospital's General Science

Chapter 3 STUDY RESULTS

3.1. RESULTS OF EXPERIMENTAL STUDIES

3.1.1. Investigation of the acute and subacute toxicity and skin irritation effects of Bach xa balm

* **Acute toxicity:** Bach xa balm was administered by subcutaneous injection with increasing doses from 5 ml/kg to 25 ml/kg, which is the highest dose tolerated by the mice. No acute intoxication was observed at the dose of 5 ml/kg; mouse death occurred at the dose of 7.5 ml/kg; and no death was registered after 72 hours. Based on these, the 50% lethal dose was calculated as: $LD_{50} = 14.543 (16.311 - 11.007) \text{ g/kg}$.

* **Subacute toxicity:** During the experiment, the rabbits in all 3 groups showed normal function, agility, smooth fur, normal eating activities, and dry stool. After 4 weeks of continuous administration at the dose of 0.75g/kg/dose and 1.5g/kg/dose, there was no hematopoietic toxicity and the liver and kidney function indicated by biochemical as well as histopathological tests.

* **Skin irritation effects of Bach xa balm:** We found that at 1 hour since the balm was removed, the total irritation index was $1.7 + 1.3 = 3.0$, indicating moderate irritation. At 24 hours: the total irritation index was 1.7, indicating mild irritation. At 48 hours: the total irritation index was 1.0, indicating mild irritation. At 72 hours: the total irritation index was 1.0, indicating mild irritation. There was no sign of skin irritation on the control skin area (treated with excipient).

The results shown in Tables 3.17 and 3.18 indicated a decrease in both two indices, foot oedema level and feet thickness, in rats treated with Voltaren and Bach xa balm. Hence, Bach xa balm exerted acute anti-inflammatory effects in white rat foot oedema-inducing model with the use of carrageenin.

* **Acute anti-inflammatory effects of Bach xa balm in ear infection-inducing model with the use of Croton oil:** Results indicated that Bach xa balm at the dose of 0.02g per administration x one administration and 0.02g per administration x three administrations did not exert acute anti-inflammatory effects in local ear acute infection-inducing model with the use of Croton oil.

3.1.3. Analgesic effects

* **Central analgesic effects:** No indication was found for the central analgesic effects of Bach xa balm in hot plate and tail - flick models.

* **Peripheral analgesic effects:**

- **Studying the peripheral analgesic effects of Bach xa balm in needle prickling model**

Table 3.22. Analgesic effects of Bach xa balm on white mice in needle prickling model

Mice group	N	Time to pain response (seconds) $\bar{X} \pm SD$	p (compared to the control group)
Group 1 (biological control)	10	1.46 \pm 0.40	
Group 2 (Exipient)	10	1.76 \pm 0.22	> 0,05
Group 3 (Salonpas gel)	10	2.15 \pm 0.66	< 0,05
Group 4 (Voltaren)	10	1.60 \pm 0.17	> 0,05
Group 5 (Bach Xa balm)	10	2.40 \pm 0.60	< 0,001

Table 3.22 showed that the time to pain response in mice treated with Bach xa balm was significantly higher than in the control group ($p < 0,001$), indicating that Bach xa balm exerted analgesic effects in needle prickling model.

* *Studying the analgesic effects of Bach xa balm in rat foot oedema-inducing model with the use of carrageenin*

Table 3.23. *Influences of Bach xa balm on time to pain response*

Mice group	N	Time to pain response (seconds) ($\bar{X} \pm SD$)
Group 1 (biological response)	10	1.49 ± 0.21
Group 2 (Induction)	10	1.59 ± 0.28
p ₂₋₁		> 0,05
Group 3 (Exipient)	10	1.53 ± 0.38
p ₃₋₂		> 0,05
Group 4 (Salonpas gel)	10	1.56 ± 0.27
p ₄₋₂		> 0,05
Group 5 (Voltaren)	10	2.00 ± 0.40
p ₅₋₂		< 0,05
Group 6 (Bach Xa balm)	10	1.88 ± 0.33
p ₆₋₂		< 0,05

Table 3.23 showed that the time to pain response in rats treated with Bach xa balm was significantly higher than that of the induction group ($p < 0,05$), indicating that Bach xa balm exerted analgesic effects in rat foot oedema-inducing model with the use of carrageenin.

3.2. RESULTS OF CLINICAL STUDY

3.2.1. Characteristics of study subjects

A comparison between the study group and the control group regarding age, sex, occupation, pre-treatment height, weight, disease severity indicated through duration of morning joint stiffness, number of swollen joints, Ritchie index, VAS, ESR index, DAS 28 and HAQ showed no significant difference ($p > 0,05$).

3.2.2. Treatment efficacy

3.2.2.1. Analgesic effects

* **Improvement in morning joint stiffness:** After treatment, the duration of morning joint stiffness reduced in both two groups as compared to pre-treatment. The duration decreased from 69.72 ± 15.44 (minutes) to 15.47 ± 14.29 (minutes) in the study group, and from 64.44 ± 11.51 (minutes) to 42.69 ± 13.41 (minutes) in the control group. The difference between the groups was statistically significant ($p < 0,05$).

*** Improvement in the number of painful joints**

Table 3.28: Improvement in the number of painful joints

Average number of painful joints	Study group (n=36) (\bar{X} ...SD)	Control group (n=36) (\bar{X} ...SD)	P
D ₀	8.80 ...1.54	9.80 ...3.19	> 0,05
D ₃₀	5.30 ...1.60	6.91 ...3.28	< 0,05
Average improvement (D ₃₀ - D ₀)	-3.50 ...1.90	-2.89 ...2.07	< 0,05
p(D ₃₀ - D ₀)	<0,05	<0,05	

After treatment, a statistically significant decrease in the average number of painful joints was found in both groups ($p < 0,05$), and the decrease in the study group was more pronounced than in the control group ($p < 0,05$).

*** Improvement in average Ritchie index**

Table 3.29: Improvement in average Ritchie index

Ritchie index (points)	Study group (n=36) (\bar{X} ...SD)	Control group (n=36) (\bar{X} ...SD)	p
D ₀	15.19 ...2.08	15.75 ...1.83	> 0,05
D ₃₀	5.92 ...3.79	10.36 ...3.26	< 0,05
Average improvement (D ₃₀ - D ₀)	-9.28 ...4.05	-5.39 ...3.88	< 0,05
p(D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

After treatment, the average Ritchie index decreased in both groups ($p < 0,05$), and the decrease in the study group was more pronounced than in the control group ($p < 0,05$).

*** Improvement in average pain level according to VAS classification** (VAS₁, VAS₂, VAS₃) post-treatment of the treatment group was higher than of the control group ($p < 0,05$).

3.2.2.2. Anti-inflammatory effects

Table 3.33: Improvement in the average number of swollen joints

Average number of swollen joints	Study group (n=36) (\bar{X} ..SD)	Control group (n=36) (\bar{X} ..SD)	p
D ₀	8.05 ...2.27	8.25 ...3.02	> 0,05
D ₃₀	2.50 ...2.06	5.14 ...2.13	< 0,05
Average improvement (D ₃₀ - D ₀)	-5.55 ...2.28	-3.11 ...2.47	< 0,05
p(D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Both two groups had improvement in the average number of swollen joints after one month of treatment, with the improvement in the study group being more pronounced than in the control group (p < 0,05).

Table 3.34: Average improvement in ESR index

Average first-hour ESR index (mm/hour)	Study group (n=36) (\bar{X} ..SD)	Control group (n=36) (\bar{X} ..SD)	p
D ₀	42.39 ...13.79	39.92 ...10.44	> 0,05
D ₃₀	35.83 ...16.02	40.67 ...13.15	> 0,05
Average improvement (D ₃₀ - D ₀)	-6.56 ...16.13	0.75 ...10.90	< 0,05
p(D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	> 0,05	

After treatment, the average first-hour ESR in the study group decreased significantly (p < 0,05). No significant decrease was found for the control group (p > 0,05).

Table 3.35: Improvement in CRP index

Average CRP (mg/dl)	Study group (n=36) (\bar{X} ..SD)	Control group (n=36) (\bar{X} ..SD)	p
D ₀	10.46 ...22.41	4.25 ...6.62	> 0,05
D ₃₀	4.03 ...5.37	5.98 ...10.61	> 0,05
Average improvement (D ₃₀ - D ₀)	-6.42 ...20.83	1.74 ...6.26	< 0,05
p(D ₀ - D ₃₀)	> 0,05	> 0,05	

No significant difference was seen in the average improvement in CRP index for both groups.

3.2.2.3. Improvement in disease severity

* Improvement in physical activity function according to HAQ

Table 3.36: Improvement in physical activity function according to HAQ

HAQ	Study group (n=36) (\bar{X} ..SD)	Control group (n=36) (\bar{X} ..SD)	p
D ₀	2.31 ..0.25	2.30 ..0.28	> 0,05
D ₃₀	1.51 ..0.17	1.95 ..0.20	< 0,05
Average improvement (D ₃₀ - D ₀)	-0.79 ...0.29	-0.35 ...0.18	< 0,05
p(D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Both two groups had statistically significant improvement in physical activity function according to HAQ ($p < 0,05$), with the improvement in the study group being more pronounced than in the control group ($p < 0,05$).

* Evaluation of disease improvement based on EULAR criteria

Table 3.37: Improvement in average DAS 28 - CRP index

DAS 28 – CRP index	Study group (n=36) (\bar{X} ..SD)	Control group (n=36) (\bar{X} ..SD)	p
D ₀	4.79 ± 0.34	4.80 ± 0.51	> 0,05
D ₃₀	2.76 ± 0.63	4.18 ± 0.68	< 0,05
Average improvement (D ₃₀ - D ₀)	-2.03 ± 0.63	-0.61 ± 0.52	< 0,05
p(D ₀ -D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

After treatment, the average DAS 28 - CRP index decreased in both groups ($p < 0,05$), and the decrease in the study group was more pronounced than in the control group ($p < 0,05$).

*** Evaluation of disease improvement according to ACR criteria**

Table 3.40: The percentage of patients with improvement in 20%, 50%, and 70% ACR according to ACR criteria

Classification	Study group (n=36)		Control group (n=36)		p
	N	%	N	%	
No improvement	3	8.33	15	41.67	< 0,05
ACR 20 improvement	33	91.67	21	58.33	
ACR 50 improvement	12	33.33	0	0	
ACR 70 improvement	0	0	0	0	

The percentage of patients in the study group who had an improvement in ACR 20 and ACR 50 according to ACR was 91.67% and 33.33%, respectively. These improvements in the study group were more significant as compared to the control group ($p < 0,05$). No patient in the control group had an improvement in ACR 50 and ACR 70 indice.

3.3. ADVERSE EFFECTS

- Clinical adverse effects: Bach xa balm did not exert any clinical adverse effects during the course of treatment.

- Sub-clinical adverse effects: there was no significant differences in the number of red blood cells, white blood cells, platelets, hemoglobin, glucose, cholesterol, triglyceride, ESR index, CRP-C and laboratory tests of liver and kidney functions, such as urea, creatinine, AST, and ALT between pre- and post-treatment, and between the two groups.

Chapter 4 DISCUSSION

4.1. Discussion on the findings of experimental studies

4.1.1. Acute and subacute toxicity and skin irritation effects

- **Acute toxicity:** We were able to determine the 50% lethal dose as $LD_{50} = 14.543 (16.311 - 11.007)$ g/kg, indicating that Bach xa balm exerted no acute toxicity at the dose of 5 g/kg when administered by subcutaneous injection in mice white, and was safe

to use within 72 hours. Bach xa balm could therefore be used in the treatment of chronic diseases.

- **Subacute toxicity:** According to our study results, treatment with Bach xa balm at the dose corresponding to the clinical dose and at the dose twice as high as the clinical dose did not affect liver and kidney functions and did not change macro- and micromorphological structure of the liver and kidney in rabbits. Thus, dermal absorption-administered Bach xa balm did not exert subacute toxicity.

- **Skin irritation effects of Bach xa balm:** The results indicated that Bach xa balm at the dose of 0.5g administered to 2.5cm² of rabbit skin exerted moderate skin irritation at 1 hour after removal of the balm, and mild skin irritation at 24, 48, and 72 hours. The duration to complete recovery was 6 days. Therefore, according to OECD guideline, Bach xa balm could be administered by dermal absorption.

4.1.2. Analgesic and anti-inflammatory effects

- **Analgesic effects:** Bach xa balm did not exert central analgesic effects, and only exerted peripheral analgesic effects in needle prickling model and rat foot oedema-inducing model with the use of carrageenin. Pain is usually associated with inflammation. The inflammation process damages the tissues, stimulates the release of inflammatory mediators, such as prostaglandins, bradykinins, and histamin. These inflammatory mediators stimulate sensory nerve endings, and hence increase the sensitivity of sensory receptors receiving signals from pain-inducing agents. The analgesic effects of Bach xa balm could potentially be due to its anti-inflammatory effects, thereby inhibiting the release of inflammatory mediators, which consequently leads to pain relief.

- **Anti-inflammatory effects:** Bach xa balm administered on the footpad of rats at the dose of 0.2g/time x 5 times/day exerted anti-inflammatory effects in white rat foot acute inflammation-inducing model with the use of carrageenin, indicated by the decrease in the volume and thickness of rat s' f investigation. The acute anti-inflammatory effects of Bach xa balm, composed mainly of cobra venom, in the present study is comparable to that of diclofenac.

4.2. Discussion on clinical study results

4.2.1. The comparability in the characteristics of two groups of patients: the age, sex, duration of having the disease, and pre-treatment disease severity were comparable between the study group

and control group. This is a major criterion in controlled experimental studies to ensure to objectivity of the study results.

4.2.2. Treatment efficacy

4.2.2.1. Analgesic effects: After treatment, the duration of morning joint stiffness, average number of painful joints, average VAS₁, VAS₂, VAS₃ points, and Ritchie index decreased significantly in both the study and control groups ($p < 0,05$). However, the decrease in the study group was more pronounced than the control group ($p < 0,05$). The duration decreased from 69.72 ± 15.44 (minutes) to 15.47 ± 14.29 (minutes) in the study group, and from 64.44 ± 11.51 (minutes) to 42.69 ± 13.41 (minutes) in the control group. The improvement in the average number of painful joints was 3.50 ± 1.90 in the study group, and 2.89 ± 2.07 in the control group. The improvement in the average Ritchie index was 9.28 ± 4.05 in the study group, and 5.39 ± 3.88 in the control group. The differences between the two groups were statistically significant ($p < 0,05$). The analgesic effects of Bach xa balm was comparable to results from the experimental studies. In Tables 3.22 and 3.23, Bach xa balm was shown to exert analgesic effects in rat foot oedema-inducing model and needle prickling model, which was indicated by the increase in the time from pain induction to foot contraction measured using the machine in the needle prickling model and rat foot oedema-inducing model with the use of carrageenin.

4.2.2.2. Anti-inflammatory effects: After treatment, the average number of swollen joints and ESR index decreased significantly in the study group ($p < 0,05$). Table 3.33 showed that the improvement in the average number of swollen joints was 5.55 ± 2.28 (joints) and 3.11 ± 2.47 (joints) in the study and control groups, respectively. The results of the clinical study were comparable to the experimental studies, both indicating that Bach xa balm has acute anti-inflammtory effects in rat foot oedema-inducing model with the use of carrageenin, which was indicated through the reduction in foot volume and thickness in the studied rats at all time points under investigation. Some studies on the pharmacological and toxic effects of snake venom and its preparations used for anti-inflammation and pain relief have shown that snake venom and snake venom-containing preparations possess anti-inflammatory and analgesic properties in experimental conditions.

4.2.2.3. Effects on disease active level: Table 3.36 showed the average improvement in physical activity function based on HAQ questionnaire was 0.79 ± 0.29 and 0.35 ± 0.18 in the study and control groups, respectively. The difference between the two groups was statistically significant ($p < 0,05$), and there was an association between the improvement in HAQ physical activity function and the magnitude of pain and swelling reduction. Given the results on the pain and swelling-reducing effects of Bach xa balm in experimental and clinical studies, the improvement in HAQ physical activity function was reasonable. Table 3.37 showed that the improvement in DAS 28 - CRP index was 2.03 ± 0.63 (classified as good improvement) in the study group, and 0.61 ± 0.52 (moderate improvement) in the control group. Table 3.40 showed that the percentages of patients with an improvement in ACR 20% and ACR 50% in the study group was 91.67% and 33.33%, respectively. In the control group, 58.33% of the patients had an improvement in ACR 20% and no patient had an improvement in ACR 50%. The differences between the two groups were statistically significant ($p < 0.05$).

4.2.3. Adverse effects of Bach xa balm:

Bach xa balm did not exert any clinical and sub-clinical adverse effects during the course of treatment.

CONCLUSIONS

1. Treatment with Bach xa balm showed no acute toxicity at the dose of 5 g/kg when administered by subcutaneous injection in white mice; The dose of 7.5 g/kg or higher in white mice: the 50% lethal dose was LD_{50} and no subacute toxicity was reported on experimental rabbits treated with this product when administered by dermal absorption. There were signs of mild and moderate skin irritation. Bach xa balm showed peripheral analgesic and acute anti-inflammatory effects in experimental animal models.

- The dose of 7.5 g/kg or higher in white mice: the 50% lethal dose was $LD_{50} = 14.543 (16.311 - 11.007)$ g/kg.

- Bach xa balm administered at the dose of 0.75 g/kg x twice/day for 4 successive weeks in rabbits: no change in weight, general condition, hematology, biochemistry, as well as macro- and micromorphological structure of the liver and kidney of the treatment group as compared to the control group ($p > 0,05$).

- Bach xa balm administered at the dose of 0.5g on an area of 2.5cm² on rabbit skin induced mild to moderate skin irritation depending on the moment of evaluation. The irritation disappeared without any intervention after 6 days.

- Bach xa balm exerted inflammation-suppressing effects on white rats with local foot acute inflammation induced using carrageenin ($p < 0,05$) . These effects are equivalent

- Dermal absorption-administered Bach xa balm exerted pain-reducing effects in needle prickling model and oedema-inducing model using carrageenin ($p < 0,05$).

2. The combined treatment of dermal absorption-administered Bach xa balm and oral-administered ancient remedy Gui zhi shao yao zhi mu tang had good efficacy in treating rheumatoid arthritis stage I and II with active levels of mild and moderate (the type of mixed cold-heat according to traditional medicine point of view).

- The post-treatment duration of morning joint stiffness, average number of painful joints, Ritchie index, VAS₁, VAS₂, and VAS₃ were significantly lower than before treatment ($p < 0,05$).

- The post-treatment number of swollen joints and average ESR rate were significantly lower than before treatment ($p < 0,05$).

- After treatment, the disease active level was remarkably improved: the average improvement was 0.79 ± 0.29 for HAQ index, 2.03 ± 0.63 for DAS 28 –CRP index, 91.67% for ACR20 index, and 33.33% for ACR50.

- The improvement in those indicators described above was significantly higher in the study group than in the control group ($p < 0,05$).

- Bach xa balm did not exert any clinical and sub-clinical adverse effects during the course of treatment.

RECOMMENDATIONS

Findings from this thesis indicated that Bach xa balm could potentially be used to treat patients with RA stage I and II (the type of mixed cold-heat according to traditional medicine point of view) with high safety and convenience. Therefore: The efficacy of Bach xa balm should be investigated on a larger number of patients with a longer duration of study .

The efficacy of Bach xa balm in the treatment of other musculoskeletal and neural diseases should be investigated.

**LIST OF PUBLICATIONS
IN RELATION TO THE DOCTORAL THESIS**

1. Dinh Thi Lam, Nguyen Tran Thi Giang Huong, Do Thi Phuong, Pham Thi Van Anh, Mai Phuong Thanh (2016), Subacute toxicity of Bach xa balm on experimental animals, *Journal of Medical Research*, volume 99, number 1, 32 - 39.
2. Dinh Thi Lam, Nguyen Tran Thi Giang Huong, Do Thi Phuong, Pham Thi Van Anh (2016), Determination of acute toxicity and evaluation of skin irritation effects of Bach xa balm on experimental animals, *Journal of Vietnam Traditional Medicine and Pharmacology*, number 49, 50 - 55.
3. Dinh Thi Lam, Nguyen Tran Thi Giang Huong, Do Thi Phuong, Pham Thi Van Anh, Mai Phuong Thanh (2016), Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of bach xa balm, *Vietnam Journal of Medicine & Pharmacy*, 11(2), 28 . 36.
4. Dinh Thi Lam, Do Thi Phuong, Nguyen Tran Thi Giang Huong (2017), The supporting effect of Bach Xa Balm in treating patients suffering rheumatoid arthritis, *Journal of Medical Practice*, 6 (1049), 139 - 141.