

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ HIỀN

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH VÀ HIỆU QUẢ  
CỦA ACNECA TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH TRÚNG  
CÁ THÔNG THƯỜNG THỂ VỪA**

Chuyên ngành: Da Liễu

Mã số: 62720152

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI – 2020**

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

**Người hướng dẫn khoa học:**

- 1. GS.TS. NGUYỄN HỮU SÁU**
- 2. TS. DƯƠNG MINH SƠN**

***Phản biện 1:***

***Phản biện 2:***

***Phản biện 3:***

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 2020*

***Có thể tìm luận án tại thư viện:***

Thư viện Quốc gia

Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Hữu Sáu, Trần Thanh Tùng, Dương Minh Sơn (2018). Xác định độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của cốm tan Ngũ vị tiêu độc ẩm gia giảm (ACNECA) trên động vật thực nghiệm. *Tạp chí Y học thực hành*, 11(1085), 24-27.
2. Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Hữu Sáu, Trần Thanh Tùng (2018). Tác dụng điều trị bệnh trứng cá do *Propionibacterium acnes* của cốm tan Ngũ vị tiêu độc ẩm gia giảm (ACNECA) trên động vật thực nghiệm. *Tạp chí nghiên cứu Y dược học cổ truyền Việt Nam*, 59, 50-60.
3. Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Hữu Sáu, Dương Minh Sơn (2018). Khái quát tình hình điều trị trứng cá thông thường bằng Y học cổ truyền. *Tạp chí nghiên cứu Y dược học cổ truyền Việt Nam*, 59, 83-91.
4. Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Hữu Sáu, Trần Thanh Tùng, Dương Minh Sơn (2019). Tác dụng kháng khuẩn và chống viêm của chế phẩm cốm tan Ngũ vị tiêu độc ẩm gia giảm (ACNECA). *Tạp chí Y học thực hành*, 4 (1095), 124-129.
5. Nguyễn Thị Hiền, Dương Minh Sơn, Nguyễn Hữu Sáu (2019). Hiệu quả điều trị bệnh trứng cá thông thường của cốm tan Ngũ vị tiêu độc ẩm gia giảm (ACNECA). *Tạp chí Y Dược lâm sàng* 108, 14 (4), 53-63.

## **Phần A: GIỚI THIỆU LUẬN ÁN**

### **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Bệnh trứng cá thông thường là một bệnh da mạn tính, bệnh rất phổ biến và thường hay gặp ở lứa tuổi thanh thiếu niên. Bệnh ít gây ảnh hưởng đến sức khỏe nhưng gây ảnh hưởng nhiều đến tâm lý và chất lượng cuộc sống. Điều trị trứng cá cần thời gian dài, sau giai đoạn điều trị tấn công phải tiếp tục điều trị duy trì phòng tái phát. Các phương pháp điều trị trứng cá bằng y học hiện đại bôi và uống hiện nay mang lại hiệu quả cao nhưng đều có những tác dụng không mong muốn như kích ứng da, rối loạn tiêu hóa, dị dạng thai nhi và việc điều trị trứng cá kéo dài có thể gây tâm lý lo lắng cho bệnh nhân, đặc biệt phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ, phụ nữ có thai, trẻ em, bệnh nhân không đáp ứng điều trị và thường xuyên tái phát. Các phương pháp điều trị trứng cá bằng thuốc y học cổ truyền hiện nay đã chứng minh được cơ chế tác dụng của thuốc lên bốn cơ chế hình thành mụn trứng cá của y học hiện đại cũng như chứng minh được tính an toàn và hiệu quả của thuốc qua nhiều nghiên cứu khoa học tại Việt Nam cũng như trên thế giới.

Chế phẩm ACNECA được ra đời nhằm đáp ứng nhu cầu sử dụng thuốc điều trị trứng cá từ thảo dược của bệnh nhân. ACNECA được cấu thành từ các vị thuốc có tác dụng điều trị bệnh trứng cá và không có độc tính. ACNECA là chế phẩm mới cần được chứng minh tính an toàn, cơ chế tác dụng và hiệu quả điều trị với bệnh trứng cá thông thường.

### **2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI**

Luận án tiến hành nghiên cứu với hai mục tiêu sau:

- *Xác định độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng điều trị bệnh trứng cá của ACNECA trên thực nghiệm.*

- *Đánh giá hiệu quả của ACNECA trên lâm sàng trong điều trị bệnh trứng cá thông thường mức độ vừa.*

### **3. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN**

- Đề tài cung cấp những chứng cứ khoa học về tác dụng điều trị trứng cá theo cơ chế bệnh sinh và tính an toàn của ACNECA.

- ACNECA cung cấp thêm lựa chọn cho bác sĩ lâm sàng trong việc kê đơn thuốc điều trị cho bệnh nhân trứng cá. Sử dụng ACNECA đáp ứng nhu cầu của bệnh nhân trong việc sử dụng thảo dược để điều trị bệnh trứng cá, đặc biệt là bệnh nhân nữ ở độ tuổi sinh đẻ.

- Chế phẩm ACNECA tiện sử dụng, dễ bảo quản, phù hợp với bệnh lý trứng cá cần điều trị lâu dài.

- Tận dụng nguồn thảo dược sẵn có để chăm sóc sức khỏe cho nhân dân phù hợp với phương châm Đảng chính phủ đề ra.

- Trong hoàn cảnh điều kiện kinh tế đất nước còn khó khăn, việc nghiên cứu, sản xuất các chế phẩm thuốc từ nguồn dược liệu có sẵn trong

nước nhằm phục vụ chăm sóc sức khỏe của cộng đồng là hướng đi đúng đắn và thiết thực cho phát triển kinh tế - xã hội.

#### **4. CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN**

Luận án gồm 141 trang, được chia làm 4 chương, trong đó Đặt vấn đề 2 trang; Tổng quan 37 trang; Chất liệu - đối tượng - phương pháp nghiên cứu 23 trang; Kết quả nghiên cứu 39 trang; Bàn luận 37 trang; Kết luận 1 trang; Kiến nghị 1 trang; Hạn chế đề tài 1 trang. Luận án có 35 bảng, 1 biểu đồ, 1 sơ đồ, 19 hình ảnh, 178 tài liệu tham khảo (tiếng Việt: 26; tiếng Anh: 126; tiếng Trung: 26, 57 tài liệu trong 5 năm gần đây) và 6 phụ lục liên quan.

### **PHẦN B: NỘI DUNG LUẬN ÁN**

#### **CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

##### **1.1. Trứng cá theo Y học hiện đại**

Theo tác giả Layton trứng cá là một bệnh viêm mạn tính, được đặc trưng bởi các sẩn (nhân mụn trứng cá), biểu hiện trên lâm sàng là các mụn đầu trắng, mụn đầu đen, sẩn đỏ, mụn mủ, cục, nang. Nguyên nhân gây ra mụn trứng cá gồm 4 yếu tố chính là: tăng tiết bã nhờn; tăng sừng hoá cổ nang lông, vi khuẩn *C.acnes* và viêm. Chẩn đoán xác định bệnh trứng cá thông thường chủ yếu dựa vào các triệu chứng lâm sàng. Chẩn đoán mức độ nặng trứng cá để lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp và theo dõi đánh giá hiệu quả trong quá trình điều trị. Các yếu tố liên quan đến bệnh trứng cá bao gồm tuổi, giới, yếu tố gia đình, yếu tố thời tiết, chủng tộc, yếu tố nghề nghiệp, yếu tố stress, các bệnh nội tiết, thuốc, một số nguyên nhân tại chỗ, chế độ ăn làm tăng đường máu, sữa, các chế phẩm từ sữa làm nặng hơn tình trạng mụn. Điều trị bệnh trứng cá bao gồm điều chỉnh lối sống (chế độ ăn uống và sinh hoạt), kiểm soát các yếu tố liên quan và dùng thuốc hoặc các biện pháp thay thế khác. Các thuốc điều trị trứng cá hiện nay gồm thuốc bôi tại chỗ và thuốc uống toàn thân. Thuốc bôi tại chỗ được khuyến cáo cho điều trị mụn trứng cá mức độ nhẹ hoặc trung bình. Các thuốc bôi được sử dụng nhiều nhất là kháng sinh, retinoid và các chất khác như bezoyl peroxide, axit azelaic, axit salicylic và dapsone. Các thuốc bôi này thường được phối hợp với nhau để điều trị nhằm giải quyết càng nhiều yếu tố trong cơ chế bệnh sinh càng tốt. Điều trị toàn thân thường được khuyến cáo ở những bệnh nhân có mụn trứng cá mức độ trung bình đến nặng, trứng cá kháng các phương pháp điều trị tại chỗ và trong trường hợp trứng cá có khả năng gây sẹo. Thuốc điều trị toàn thân cho mụn trứng cá bao gồm kháng sinh, isotretinoin và hormon. Các biện pháp thay thế bao gồm laser và ánh sáng sinh học như KTP laser, laser YAG 1320nm, đèn LED, Photodynamic therapy (PDT), thay da sinh học, chích rạch nhân mụn, điều trị mỹ phẩm....

##### **1.2. Trứng cá theo Y học cổ truyền**

Trứng cá theo YHCT có bệnh danh là Tọa Sang, Phần Thích. Theo Phạm Thụy Cường trong sách Trung Tây Y kết hợp lâm sàng bì phụ học năm 2002

cho rằng mụn trứng cá chủ yếu do thận âm bất túc, phế vị huyết nhiệt, đàm ứ giao kết và xung nhâm thất điều. Có nhiều cách phân thể trứng cá khác nhau trên lâm sàng nhưng khi tiến hành nghiên cứu, phần lớn các nhà khoa học Trung Quốc phân trứng cá làm 4 thể: phong nhiệt, thấp nhiệt, huyết ứ, xung nhâm thất điều (theo “Tiêu chuẩn quốc gia của Cộng hòa nhân dân Trung Hoa. Thuật ngữ lâm sàng chẩn trị Đông y”). Điều trị bao gồm thuốc bôi, thuốc uống, thuốc xông, thuốc đắp hoặc châm cứu.

### **1.3. Tình hình nghiên cứu bệnh trứng cá thông thường**

Trước kia, các nghiên cứu về phương pháp điều trị trứng cá bằng thuốc YHCT mới chỉ đánh giá hiệu quả trên lâm sàng mà chưa làm rõ cơ chế, thành phần dược lý của thuốc tác động lên cơ chế bệnh sinh hình thành mụn trứng cá. Đến nay, các chế phẩm YHCT dùng để điều trị trứng cá được bào chế với công nghệ hiện đại, phân tích được thành phần dược chất có trong chế phẩm và chứng minh được hiệu quả, an toàn, cơ chế tác dụng của thuốc lên cơ chế hình thành mụn trứng cá một cách khoa học, bài bản.

### **1.4. Tổng quan về ACNECA**

#### **1.4.1. Nguồn gốc, xuất xứ**

ACNECA có nguồn gốc từ bài thuốc “Ngũ vị tiêu độc ảm” trong “Y tông kim giám. Ngoại khoa tâm pháp yếu khuyết” của Ngô Khiêm. Để tăng tác dụng điều trị theo cơ chế bệnh sinh trứng cá y học hiện đại và tiện sử dụng chúng tôi gia giảm thêm vị thuốc thành bài thuốc mới, bào chế bài thuốc mới dưới dạng cốm tan, đặt tên là ACNECA. Tên gọi ACNECA là chữ viết tắt của hai cụm từ ACNE (Trứng cá) và CARE (Chăm sóc).

#### **1.4.2. Thành phần dược liệu bài thuốc ACNECA**

Công thức điều chế cho một đơn vị đóng gói gồm có 14 vị: Kim ngân hoa (*Flos Lonicera*) 1,28 g; Liên kiều (*Fructus Forsythiae suspensae*) 2,4 g; Hạ khô thảo (*Spica Prunellae*) 2,4 g; Bồ công anh (*Herba Lactucae indicae*) 1,6 g; Phúc bồn tử (*Herba Lactucae indicae*) 2,4 g; Thỏ ty tử (*Semen Cuscutae*) 2,4 g; Trinh nữ tử (*Radix Ligustri Lucidi*) 2,4 g; Cam thảo (*Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*) 0,96g; Đương quy (*Radix Angelicae sinensis*) 1,28g; Bạch thược (*Radix Paeoniae lactiflorae*) 1,6g; Đan sâm (*Radix Salviae miltiorrhizae*) 2,4g; Hoàng cầm (*Radix Scutellariae*) 1,6g; Đan bì (*Cortex Paeoniae suffruticosae*) 2,4 g; Sa nhân (*Fructus Amomi*) 0,64g.

#### **1.4.3. Cách bào chế các vị thuốc và chế phẩm ACNECA**

Các vị thuốc được chế biến theo phương pháp cổ truyền và chế phẩm ACNECA được bào chế theo phương pháp bào chế cốm tan. Cốm tan ACNECA hạt nhỏ màu nâu đồng, vị đắng thơm mùi dược liệu, đóng gói màng thiếc bạc, mỗi gói chứa 6gram cốm tan. ACNECA được sản xuất tại khoa Dược- Bệnh viện Y học cổ truyền Trung ương. Tất cả dược liệu đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam IV hoặc dược điển Trung Quốc 2009 và chế phẩm ACNECA tiêu chuẩn đạt tiêu chuẩn cơ sở.

#### **1.4.4. Tác dụng chung của ACNECA**

Tác dụng của ACNECA theo y học cổ truyền: thanh nhiệt giải độc, hoạt huyết tiêu viêm, tư bổ can thận.

Tác dụng ACNECA theo y học hiện đại: Trong chế phẩm ACNECA hầu hết các vị thuốc đều có tác dụng chống viêm, kháng khuẩn và đều thuộc nhóm thuốc điều trị các chứng nhiệt trong Đông y như Kim ngân hoa, Liên Kiều, Hoàng cầm, Cam thảo. Ngoài ra, Kim ngân hoa, Liên Kiều, Bồ công anh, Đan bì, Hạ khô thảo, Đan sâm, Bạch thực, Hoàng cầm còn có tác dụng chống viêm. Tác dụng kháng khuẩn làm tăng tác dụng chống viêm của thuốc y học cổ truyền. Sa nhân, Đan sâm, Cam thảo, Hoàng cầm đã được báo cáo là có tác dụng kháng androgen và có những tác dụng của phytoestrogen. Đương quy, Bạch thực đã được chứng minh rằng chiết xuất bôi tại chỗ hoặc uống đã làm tăng khả năng bảo vệ của hàng rào da, ngăn cản sự mất nước ở tế bào da, làm hạn chế viêm ở những bệnh nhân viêm da cơ địa, bệnh nhân bị mụn trứng cá. Trinh nữ tử, Phúc bồn tử, Thỏ ty tử nghiên cứu có tác dụng chống oxy hóa phù hợp với tình trạng viêm mạn tính của trứng cá.

## **CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU- ĐỐI TƯỢNG- PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1 Chất liệu nghiên cứu**

- ACNECA được bào chế dạng cốm tan, hạt nhỏ màu nâu đồng, vị đắng thơm mùi dược liệu, đóng gói màng thiếc bạc, mỗi gói chứa 6gram cốm tan.

- ACNECA được sản xuất tại khoa Dược- Bệnh viện Y học cổ truyền Trung ương.

- Tất cả dược liệu đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam IV hoặc dược điển Trung Quốc 2009 và chế phẩm ACNECA tiêu chuẩn đạt tiêu chuẩn cơ sở.

- Liều lâm sàng: 0,12g/kg/ngày.

- Cách dùng: Hòa tan cốm tan ACNECA vào nước cất hoặc nước lọc trước khi uống.

### **2.2. Đối tượng - Địa điểm nghiên cứu**

#### **2.2.1. Xác định độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng điều trị bệnh trứng cá của ACNECA trên thực nghiệm**

##### **2.2.1.1. Xác định độc tính cấp, bán trường diễn**

- Xác định độc tính cấp: 60 con chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng  $20 \pm 2g$  do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

- Xác định độc tính bán trường diễn: 30 con chuột cống trắng chủng *Wistar* cả hai giống khỏe mạnh trọng lượng  $160g \pm 20g$  do Trung tâm cung cấp động vật thí nghiệm Đan Phượng - Hà Tây cung cấp.

- Nghiên cứu xác định độc tính cấp, bán trường diễn được tiến hành tại Bộ môn Dược Lý trường Đại học Y Hà Nội từ tháng 3 năm 2016 đến tháng 8 năm 2016.

#### **2.2.1.2. Tác dụng điều trị bệnh trứng cá**

- Tác dụng kháng khuẩn: Các chủng vi khuẩn *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (*C. acnes*), *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (*S. epidermidis*) sản xuất bởi hãng Microbiologics - Mỹ có chủng chỉ ATCC (American Type Culture Collection - Ngân hàng chủng chuẩn Hoa Kỳ). Vi khuẩn được nuôi cấy và làm thí nghiệm tại khoa Vi khuẩn - Viện vệ sinh dịch tễ TW vào tháng 2 năm 2019.

- Tác dụng chống viêm trên mô hình phù tai chuột: 80 con chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, khỏe mạnh, cả hai giống, trọng lượng  $25 \pm 2$ g do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Nghiên cứu được tiến hành tại Bộ môn Dược Lý trường Đại học Y Hà Nội vào tháng 2 năm 2019.

- Tác dụng điều trị trên mô hình trứng cá động vật: 70 con chuột cống trắng chủng *Wistar* giống đực trưởng thành, khỏe mạnh (từ 10 đến 12 tuần tuổi, trọng lượng 180g - 220g) do Trung tâm cung cấp động vật thí nghiệm Đan Phượng - Hà Tây cung cấp. Nghiên cứu được tiến hành tại Bộ môn Dược Lý trường Đại học Y Hà Nội từ tháng 7 năm 2017 đến tháng 10 năm 2017.

#### **2.2.2. Đánh giá hiệu quả của ACNECA trên lâm sàng trong điều trị bệnh trứng cá thông thường mức độ vừa**

- Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu:  
+ Bệnh nhân được chẩn đoán trứng cá thể thông thường, mức độ vừa và tương ứng với thể thấp nhiệt theo Y học cổ truyền  
+ Đồng ý, tự nguyện tham gia nghiên cứu  
+ Bệnh nhân  $\geq 15$  tuổi (nếu từ 15 - 18 tuổi phải được sự đồng ý của bố mẹ hoặc người giám hộ)

- Tiêu chuẩn loại trừ:

+ Phụ nữ có thai hoặc đang cho con bú  
+ Dị ứng với bất cứ thành phần nào của thuốc  
+ Suy giảm nghiêm trọng chức năng gan, thận, rối loạn lipid máu.  
+ Không tuân thủ liệu trình điều trị

- Nghiên cứu được tiến hành tại Bệnh viện Da liễu TW và Bệnh viện Y học cổ truyền TW từ tháng 3 năm 2018 đến tháng 2 năm 2019.  
Bệnh nhân được khám và điều trị ngoại trú.

### **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.3.1. Xác định độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng điều trị bệnh trứng cá của ACNECA trên thực nghiệm**



### 2.3.1.1. *Xác định độc tính cấp, bán trường diễn*

#### ❖ *Xác định độc tính cấp*

Xác định độc tính cấp của ACNECA được tiến theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon. 60 con chuột nhắt trắng được nhện đói qua đêm, được chia thành 6 lô khác nhau, mỗi lô 10 con. Cho chuột uống ACNECA với liều tăng dần bằng kim cong đầu tù, uống 0,2ml/10g chuột/ngày để xác định liều thấp nhất gây chết 100% chuột và liều cao nhất không gây chết chuột.

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tình trạng chung của chuột, dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, bài tiết...) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống ACNECA. Tất cả chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể. Xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD50 của thuốc thử. Chuột còn sống được tiếp tục theo dõi đến hết ngày thứ 14 sau khi uống thuốc thử.

#### ❖ *Xác định độc tính bán trường diễn*

Xác định độc tính bán trường diễn được thực hiện theo hướng dẫn Tổ chức Y tế Thế giới. 30 con chuột cống trắng chủng Wistar được chia ngẫu nhiên làm 3 lô:

- Lô 1 (Chứng sinh học) n=10: Uống nước cất 1ml/100g chuột/ngày.
- Lô 2 (ACNECA liều 0,72 g/kg/ngày) n=10: Uống ACNECA liều 0,72g/kg/ngày, tương đương với liều lâm sàng, tính theo hệ số 6, uống 1ml/100g chuột/ngày.
- Lô 3 (ACNECA liều 2,16 g/kg/ngày) n=10: Uống ACNECA liều 2,16 g/kg/ngày liều gấp 3 liều lâm sàng, tính theo hệ số 6, uống 1ml/100g chuột/ngày.

Chuột được uống nước cất hoặc ACNECA 90 ngày liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

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

- Tình trạng chung của chuột và cân nặng của chuột
- Chức năng tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.
- Các chỉ số đánh giá chức năng gan thông qua định lượng hoạt độ enzym ALT và AST trong máu.
- Các chỉ số đánh giá chức năng thận thông qua định lượng nồng độ creatinin huyết thanh.
- Mô bệnh học bao gồm hình ảnh đại thể toàn thể các cơ quan và cấu trúc vi thể gan, thận.

Các chỉ tiêu theo dõi trên được kiểm tra vào lúc trước khi uống, sau 30 ngày, sau 60 ngày và sau 90 ngày uống nước cất hoặc thuốc thử. Riêng chỉ tiêu mô bệnh học được đánh giá sau 90 ngày uống thuốc. Khi đó chuột được

mở để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan và kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số chuột ở mỗi lô.

#### 2.3.1.2. Tác dụng điều trị bệnh trùng cá

##### ❖ Tác dụng kháng khuẩn

- Nguyên tắc: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên các đĩa thạch Brucella HK có bổ sung nồng độ thuốc thử khác nhau. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) được xác định ở đĩa môi trường mà khuẩn lạc vi khuẩn thay đổi về hình thái (kích thước khuẩn lạc) và/hoặc giảm đáng kể về mật độ. Nồng độ thấp nhất có tác dụng diệt khuẩn (MBC, minimal bactericidal concentration) được xác định ở đĩa môi trường mà tại đó các vi khuẩn bị tiêu diệt hoàn toàn (không có vi khuẩn mọc).

##### ❖ Tác dụng chống viêm trên mô hình phù tai chuột

Tác dụng chống viêm được nghiên cứu trên mô hình viêm cấp và bán cấp bằng dầu croton tại tai chuột nhắt trắng theo mô hình của Andre Barbosa năm 2017.

##### - Tác dụng chống viêm cấp

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con, được gây mô hình và dùng thuốc như sau:

+ Lô 1 (Mô hình) n = 10: Gây mô hình bằng cách bôi 20 $\mu$ L dầu croton đã pha lên tai phải, uống nước cất 0,2mL/10g chuột.

+ Lô 2 (Chứng dương) n = 10: Gây mô hình bằng cách bôi 20 $\mu$ L dầu croton đã pha lên tai phải chuột và uống methylprednisolone liều 6 mg/kg/ngày, uống 0,2mL/10g chuột.

+ Lô 3 (ACNECA liều 1,44g/kg/ngày) n = 10: Gây mô hình bằng cách bôi 20 $\mu$ L dầu croton đã pha lên tai phải chuột và uống ACNECA liều 1,44g/kg/ngày (liều tương đương lâm sàng, tính theo hệ số 12), uống 0,2mL/10g chuột.

+ Lô 4 (ACNECA liều 4,32g/kg/ngày) n = 10: Gây mô hình bằng cách bôi 20 $\mu$ L dầu croton đã pha lên tai phải và uống ACNECA liều 4,32g/kg/ngày (liều gấp 3 lâm sàng, tính theo hệ số 12), uống 0,2mL/10g chuột.

Ở tất cả các chuột, tai trái không gây mô hình (không bôi croton).

Trước khi gây mô hình, đo chiều dày tai phải chuột ở tất cả các lô. Sau khi bôi 20 $\mu$ L dầu croton pha trong acetone vào 2 mặt của tai phải, sau 1h bôi croton cho chuột uống thuốc. Sau 6h, đo lại chiều dày tai phải chuột, lấy tổ chức da ở phần trung tâm hai tai với đường kính 7 mm bằng dụng cụ sinh thiết để đo cân nặng.

##### - Tác dụng chống viêm bán cấp

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con, được gây mô hình và dùng thuốc như sau:

- Lô 1 (Mô hình) n = 10: Gây mô hình bằng bôi 20  $\mu$ L dung dịch croton đã pha lên tai phải chuột vào ngày 1, 3, 5, 7 và uống nước cất 0,2mL/10g chuột/ngày.

- Lô 2 (Chứng dương) n = 10: Bôi 20  $\mu$ L dung dịch dầu croton đã pha lên tai phải chuột vào ngày 1, 3, 5, 7 và uống methylprednisolon liều 6 mg/kg, uống 0,2mL/10g chuột vào các ngày 5, 6, 7, 8.

- Lô 3 (ACNECA liều 1,44 g/kg/ngày) n = 10: Bôi 20  $\mu$ L dung dịch dầu croton đã pha lên tai phải chuột vào ngày 1, 3, 5, 7 và uống ACNECA liều 1,44 g/kg/ngày (liều tương đương lâm sàng, tính theo hệ số 12), uống 0,2mL/10g chuột vào các ngày 5, 6, 7, 8.

- Lô 4 (ACNECA liều 4,32 g/kg /ngày) n = 10: Bôi 20  $\mu$ L dung dịch dầu croton đã pha lên tai phải chuột vào ngày 1, 3, 5, 7 và uống ACNECA liều 4,32 g/kg /ngày (liều gấp 3 lâm sàng, tính theo hệ số 12), uống 0,2 mL/10g chuột vào các ngày 5, 6, 7, 8.

Ở tất cả các lô chuột, tai trái không gây mô hình (không bôi dầu croton). Đo chiều dày tai phải chuột ở tất cả các lô vào thời điểm trước khi tiến hành nghiên cứu và liên tục trong các ngày tiếp theo. Ngày thứ 9 của nghiên cứu, đo chiều dày tai chuột phải, lấy tổ chức tai của ở phần trung tâm cả 2 tai với đường kính 7 mm bằng dụng cụ sinh thiết để đo cân nặng.

Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá tác dụng chống viêm cấp và bán cấp bao gồm: độ dày tai chuột, khối lượng tai chuột, phần trăm thay đổi độ dày tai, phần trăm thay đổi khối lượng tai chuột, mức độ ức chế viêm.

#### ❖ Tác dụng điều trị trên mô hình trứng cá động vật

Gây mô hình trứng cá do vi khuẩn *C. acnes* tại vành tai chuột cống trắng được tiến hành theo nghiên cứu của tác giả Pandey Chetana và cộng sự năm 2012. Chia 70 con chuột cống trắng giống đực, chủng *Wistar* ra làm 2 nhóm:

+ Nhóm chứng sinh học 15 con: tiêm một lần dưới da vành tai chuột dung môi pha loãng vi khuẩn PBS, tiêm 20  $\mu$ l/1 vành tai.

+ Nhóm mô hình 55 con: tiêm một lần dưới da vành tai chuột *C. acnes* pha loãng trong PBS đạt nồng độ  $10^8$  vi khuẩn/ml, tiêm 20  $\mu$ l/1 vành tai.

Hàng ngày quan sát biến đổi xung quanh vị trí tiêm và đo độ dày vành tai chuột cả 2 nhóm. Ngày thứ 6 chọn ngẫu nhiên mỗi nhóm 5 con chuột đem cắt tai lấy mẫu bệnh phẩm với kích thước 3 x 3 mm xung quanh vị trí tiêm trên vành tai chuột để làm giải phẫu bệnh (nhuộm HE), đánh giá xem sự thay đổi tổn thương mô bệnh học trên vành tai chuột có tương đồng với tổn thương mô bệnh học trứng cá trên người để khẳng định lại đã gây mô hình trứng cá thành công.

Sau khi gây mô hình trứng cá, chuột ở nhóm chứng sinh học được đưa vào nhóm 1, chuột ở nhóm mô hình được chia thành 5 nhóm từ 2 đến 6, mỗi nhóm 10 con.

+ Nhóm 1 (Chứng sinh học) n=10: tiêm PBS, uống nước cất 1ml/100g chuột/ngày.

+ Nhóm 2 (Mô hình) n=10: tiêm *C. acnes*, uống nước cất 1ml/100g chuột/ngày.

+ Nhóm 3 (Chứng dương 1) n=10: tiêm *C. acnes*, uống Isotretinoin liều 3 mg/kg/ngày, uống 1ml/100g chuột/ngày.

+ Nhóm 4 (Chứng dương 2) n=10: tiêm *C. acnes*, uống Doxycyclin liều 12 mg/kg/ngày, uống 1ml/100g chuột/ngày.

+ Nhóm 5(ACNECA liều 0,72g/kg/ngày) n=10: tiêm *C. acnes*, uống ACNECA liều 0,72g/kg/ngày (liều tương đương với liều dự kiến trên lâm sàng, tính theo hệ số 6), uống 1ml/100g chuột/ngày.

+ Nhóm 6 (ACNECA liều 2,16g/kg/ngày) n=10: tiêm *C. acnes*, uống ACNECA liều 2,16g/kg/ngày (liều gấp 3 lần liều dự kiến trên lâm sàng, tính theo hệ số 6), uống 1ml/100g chuột/ngày.

Hàng ngày quan sát biến đổi xung quanh vị trí tiêm và đo độ dày vành tai chuột cả 6 nhóm tại các thời điểm sau To (chưa uống thuốc), T1 (sau 1 tuần uống thuốc), T2 (sau 2 tuần uống thuốc), T3 (sau 3 tuần uống thuốc). Tại thời điểm T3 cắt tai chuột lấy mẫu bệnh phẩm với kích thước 3 x 3mm xung quanh vị trí tiêm trên vành tai chuột để làm giải phẫu bệnh (nhuộm HE), đánh giá sự thay đổi tổn thương mô bệnh học các nhóm mô hình, nhóm chứng dương, nhóm uống thuốc thử so với nhóm chứng sinh học.

Đánh giá tác dụng điều trị trên mô hình trứng cá động vật thông qua các chỉ tiêu độ dày tai chuột và mức độ tổn thương mô bệnh học.

### **2.3.2. Đánh giá hiệu quả của ACNECA trên lâm sàng trong điều trị bệnh trứng cá thông thường mức độ vừa.**

❖ *Thiết kế nghiên cứu:* Thử nghiệm lâm sàng, ngẫu nhiên có đối chứng, tiến cứu.

❖ *Cỡ mẫu:* Cỡ mẫu được tính theo công thức ước tính cho một can thiệp lâm sàng:

$$n_1 = n_2 = Z^2(\alpha, \beta) \times \frac{2 \times p \times q}{(p_1 - p_2)^2}$$

❖ *Cách chọn mẫu:* 100 bệnh nhân rút thăm chẵn lẻ rồi chia làm hai nhóm:

Số lẻ vào nhóm nghiên cứu (NC),  $n_1 = 50$ , số chẵn vào nhóm đối chứng (ĐC),  $n_2 = 5$ .

❖ *Phác đồ điều trị*

Nhóm nghiên cứu (NC) uống ACNECA liều 0,12g/kg/ngày. Hòa tan 1 gói ACNECA 6 gram vào 300ml nước lọc, có thể uống trước, trong và sau khi ăn.

Nhóm đối chứng (ĐC) uống thuốc isotretinoin liều 0,5mg/kg/ngày, uống ngày 1 lần sau ăn tối

❖ *Phương pháp thu thập thông tin:* Thu thập số liệu theo mẫu bệnh án thống nhất, thông qua khám thực thể xác định vị trí, số lượng, phân thể theo YHCT, mức độ tổn thương trước điều trị (T0), theo dõi đánh giá hiệu quả, tác dụng không mong muốn sau 30 ngày điều trị (T30), sau 60 ngày điều trị (T60). Xét nghiệm chức năng gan (AST, ALT), chức năng thận (ure, creatinin), mỡ máu (triglycerid, cholesterol), công thức máu trước khi điều trị (T0) và sau 60 ngày điều trị (T60).

❖ *Các chỉ tiêu quan sát và đánh giá hiệu quả điều trị trên người bao gồm:*

* Số lượng tổn thương	* Mức độ tổn thương theo Jerry KL Tan - 2008
* Mức độ hiệu quả điều trị	* Chỉ số chất lượng cuộc sống bệnh Da liễu (DLQI)
* Chứng trạng YHCT	* Tác dụng không mong muốn trên lâm sàng
* Mức độ hài lòng	* Tác dụng không mong muốn trên xét nghiệm

#### 2.4. Kỹ thuật phân tích số liệu

- Nhập số liệu: Excel và Epidata 3.1.
- Phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS 18 và STATA 12, sự khác biệt có ý nghĩa khi  $p < 0,05$ .
- Số liệu định tính được biểu diễn dưới dạng tần số và tỷ lệ phần trăm, số liệu định lượng được trình bày dưới dạng trung bình và độ lệch chuẩn ( $\bar{X} \pm SD$ ). Kiểm định sự khác biệt và mối tương quan giữa các biến bằng các test thống kê  $\chi^2$ , Fisher-exact test (biến định tính), t-test Student (biến định lượng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

#### 2.6. Sai số và cách khống chế sai số:

- \* Sai số do lựa chọn đối tượng nghiên cứu. Khắc phục:
  - Đảm bảo lựa chọn đối tượng theo tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ.
  - Phân chia đối tượng ngẫu nhiên vào 2 nhóm nghiên cứu và đối chứng, phù hợp với thiết kế và mục tiêu nghiên cứu.
- \* Sai số do bệnh nhân bỏ cuộc. Khắc phục:
  - Ước lượng thêm 10% cho mỗi nhóm so với cỡ mẫu cần thiết được tính toán từ công thức tính cỡ mẫu.
- \* Sai số do phương pháp và công cụ thu thập thông tin. Khắc phục:
  - Áp dụng cùng một phương pháp thu thập thông tin và công cụ thu thập thông tin cho cả 2 nhóm NC và ĐC.
- \* Kế hoạch giám sát bệnh nhân tuân thủ điều trị:
  - Lập danh sách nhóm BN của nhóm NC và nhóm ĐC, bao gồm các thông tin cơ bản (tên, tuổi, giới, địa chỉ liên hệ) và số điện thoại.

- Tại các mốc thời gian quy định trong nghiên cứu, liên hệ với BN để nhắc lịch khám lại, thu thập phản hồi về mức độ cải thiện tổn thương.
- Với các BN không đến khám lại hoặc không phản hồi thông tin, liên hệ lại kiểm tra BN có tiếp tục tham gia nghiên cứu hay không.

## **2.7. Đạo đức nghiên cứu**

- Chế phẩm ACNECA đã được kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn và được Hội đồng y đức Đại học Y Hà Nội cho phép sử dụng nghiên cứu theo quyết định Chứng nhận số 187/HĐHYHN, ngày 20/02/2016.
- Bệnh viện Y học cổ truyền TW và Bệnh viện Da liễu TW chấp thuận cho tiến hành thử thuốc ACNECA trên lâm sàng.
- Các bệnh nhân được tư vấn và tự nguyện tham gia nghiên cứu.
- Các thông tin cá nhân của bệnh nhân được giữ kín.
- Các bệnh nhân từ chối tham gia nghiên cứu vẫn được khám tư vấn điều trị chu đáo.
- Với các trường hợp không đáp ứng thuốc nghiên cứu, chuyển phương pháp điều trị phù hợp.

## **CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

### **3.1. Xác định độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng điều trị bệnh trứng cá của ACNECA trên thực nghiệm.**

#### **3.1.1 Kết quả xác định độc tính**

+ Xác định độc tính cấp: Liều dung nạp tối đa 75g cốm tan /kg thể trọng chuột nhắt, cao gấp 52 lần liều dự kiến lâm sàng dùng trên người mà không có chuột chết, không thấy biểu hiện độc tính (nôn, co giật, bài tiết,...), tình trạng chung của chuột bình thường. Như vậy, không xác định được độc tính cấp trên chuột thực nghiệm.

+ Xác định độc tính bán trường diễn: ACNECA với liều 0,72 g/kg/ngày liều tương đương trên người và liều 2,16 g/kg/ngày liều gấp 3 liều trên người, tính theo hệ số 6 chuột hấp thu tốt, không gây ảnh hưởng đến tình trạng chung của chuột, cân nặng chuột, không gây ảnh hưởng đến chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận, không gây tổn thương cấu trúc thận, cấu trúc gan trên cả đại thể và vi thể. Như vậy, không xác định được độc tính bán trường diễn của ACNECA với liều 0,72 g/kg/ngày và liều 2,16 g/kg/ngày khi cho chuột cống trắng uống thuốc liên tục trong 90 ngày.

#### **3.1.2. Tác dụng điều trị trứng cá trên thực nghiệm**

##### **3.1.2.1. Tác dụng kháng khuẩn**

ACNECA có tác dụng ức chế 3 chủng vi khuẩn *C. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*. Các giá trị MIC (MBC) của ACNECA với *S. aureus*, *S. Epidermidis* là 1,068 (8,5)mg/ml và đối với *C. acnes* là 0,534 (4,272)mg/ml.

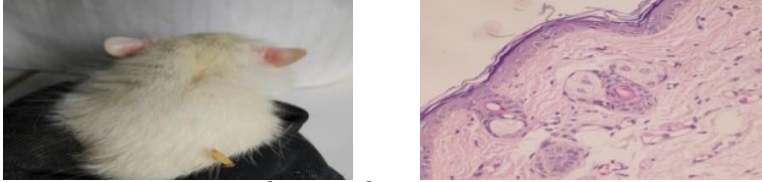
##### **3.1.2.2. Tác dụng chống viêm trên mô hình phù tại chuột**

Trên mô hình viêm cấp, sau 6 bôi croton, chiều dày tai phải chuột ở lô 1 mô hình uống nước cất là  $33,40 \pm 3,53$  tăng lên rõ rệt so với trước khi bôi  $22,20 \pm 3,10$  ( $p < 0,001$ ). Lô 2 uống methylprednisolone 6mg/kg/ngày, độ dày tai phải chuột là  $26,40 \pm 1,78$  và phần trăm thay đổi độ dày tai phải chuột là  $23,13 \pm 9,29$  giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ( $p_{2-1} < 0,001$ ). Ở các lô chuột uống ACNECA liều cao 4,32g/kg/ngày và liều thấp 1,44g/kg/ngày có độ dày tai chuột là  $27,60 \pm 3,03$  và  $27,7 \pm 1,89$ , có phần trăm thay đổi độ dày tai phải chuột là  $24,61 \pm 11,88$  và  $23,44 \pm 6,39$  đều giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình uống nước cất có độ dày tai phải  $33,40 \pm 3,53$ , phần trăm thay đổi độ dày tai phải  $53,19 \pm 26,44$  ( $p < 0,01$ ), mức độ giảm tương đương với lô uống methylprednisolone liều 6 mg/kg/ngày ( $p > 0,05$ ). Khối lượng tai phải chuột ở lô mô hình là  $31,35 \pm 5,38$  tăng lên rất nhiều so với tai trái chuột là  $21,70 \pm 3,17$  ( $p < 0,05$ ), trong khi đó khối lượng tai chuột phải và phần trăm thay đổi khối lượng tai chuột ở lô methylprednisolone và lô uống ACNECA cả 2 liều đều giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ), mức độ giảm lô uống ACNECA cả 2 liều tương đương với lô methylprednisolone ( $p > 0,05$ ). Mức độ ức chế viêm của lô dùng methylprednisolone là 49,64%, của lô uống ACNECA liều thấp là 43,42% và lô uống ACNECA liều cao là 46,74%.

Trên mô hình viêm bán cấp, sau 9 ngày khi bôi croton, độ dày tai phải chuột giữa các lô tại thời điểm (N1) trước khi bôi croton không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ). Ngày thứ 9 của nghiên cứu (N9), lô 2 uống methylprednisolone 6 mg/kg/ngày và lô 4 uống ACNECA liều 4,32 g/kg/ngày giảm có ý nghĩa thống kê so với lô 1 mô hình uống nước cất ( $p < 0,001$  và  $p < 0,05$ ) và lô 3 uống ACNECA liều 1,44 g/kg/ngày có xu hướng làm giảm độ dày tai chuột, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Khối lượng tai phải chuột ở lô mô hình là  $28,79 \pm 5,69$  tăng lên rất nhiều so với tai trái chuột là  $13,88 \pm 1,74$  ( $p < 0,05$ ). Khối lượng tai chuột phải và phần trăm thay đổi khối lượng tai phải chuột ở lô uống methylprednisolone ( $22,05 \pm 4,79$  và  $63,36 \pm 24,11$ ) và lô uống ACNECA liều cao 4,32g/kg/ngày ( $23,18 \pm 5,24$  và  $76,89 \pm 26,10$ ) giảm rõ rệt so với lô mô hình ( $p < 0,05$ ), không có sự khác biệt giữa hai lô ( $p_{4-2} > 0,05$ ). Mức độ ức chế viêm của lô dùng methylprednisolone là 31,93%, lô uống ACNECA liều cao là 14,17%. Ở lô dùng thuốc thử liều thấp 1,44g/kg/ngày có mức độ ức chế viêm 6,03%, cân nặng tai phải và phần trăm thay đổi khối lượng tai giảm so với lô mô hình, song sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p_{3-1} > 0,05$ ).

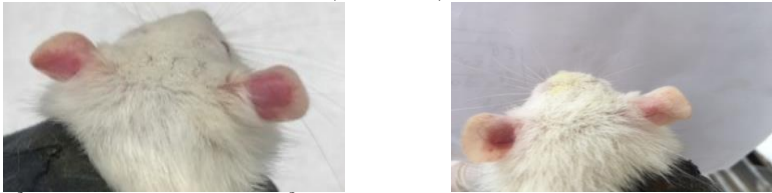
3.1.2.3. Tác dụng của ACNECA trên mô hình trứng cá động vật

❖ Gây mô hình trứng cá động vật

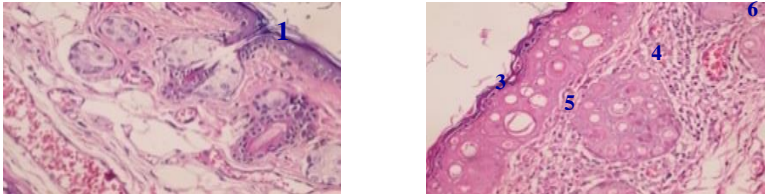


Ảnh 3.1. Hình ảnh đại thể và vi thể vành tai chuột sau 6 ngày tiêm PBS

Chú thích: Thượng bì và tuyến bã và các mô xung quanh bình thường (HE x400)



Ảnh 3.2. Hình ảnh đại thể vành tai chuột sau 6 ngày tiêm *P. acnes/C. acnes*



Ảnh 3.3. Hình ảnh vi thể vành tai chuột sau 6 ngày tiêm *P. acnes/C. acnes* (HE x400)

Chú thích: 1- Sừng hóa và bít tắc cổ nang lông; 2- Quá sản thượng bì; 3- Phù nội bào ở thượng bì; 4- Tăng kích thước và thoái hoá tuyến bã; 5- Xâm nhập tế bào viêm; 6- Xung huyết

**Nhận xét:** Kết quả mô bệnh học trên vành tai chuột cống trắng sau khi tiêm vi khuẩn *P. acnes/C. acnes* tương đồng với tổn thương mô bệnh học trứng cá trên người: tuyến bã phì đại tăng kích thước, bề mặt thượng bì dày và dày sừng cổ nang lông, phù nội bào, xâm nhập tế bào viêm chủ yếu, sung huyết, có thể có ổ áp – xe cứu.

❖ Đánh giá tác dụng điều trị của ACNECA trên mô hình trứng cá động vật  
- Trên độ dày vành tai chuột

Bảng 3.1. Tác dụng của ACNECA lên độ dày vành tai chuột

Lô chuột	Độ dày tai chuột ( $\bar{X} \pm SD, 10^{-1}mm$ )
----------	--



	Trước nghiên cứu (T <sub>0</sub> )	Sau 1 tuần (T <sub>1</sub> )	Sau 2 tuần (T <sub>2</sub> )	Sau 3 tuần (T <sub>3</sub> )
<b>Lô 1:</b> Chứng sinh học (uống nước cất) (n=10)	28,40 ± 0,97	28,70 ± 1,16	28,80 ± 0,63	29,10 ± 0,74
<b>Lô 2:</b> Mô hình (uống nước cất) (n=10)	39,60± 3,13***	37,30± 2,11***	36,30 ±1,06***	35,10±1,97***
% thay đổi so với T <sub>0</sub>		↓ 5,45%	↓ 7,95%	↓ 11,11%
<b>Lô 3:</b> Uống Isotretinoin liều 3mg/kg/ngày (n=10)	39,80± 3,82***	32,60±2,55+++	31,30 ± 1,49+++	30,20 ±1,23+++
% thay đổi so với T <sub>0</sub>		↓ 17,71%	↓ 20,85%	↓ 23,67%
<b>Lô 4:</b> Uống Doxycyclin liều 12 mg/kg/ngày (n=10)	39,90± 3,21***	31,20 ±2,20+++	29,60 ± 1,71+++ p <sub>4-1</sub> > 0,05	29,00 ±1,25+++ p <sub>4-1</sub> > 0,05
% thay đổi so với T <sub>0</sub>		↓ 21,65%	↓ 25,56%	↓ 27,01%
<b>Lô 5:</b> Uống ACNECA liều 0,72g/kg/ngày (n=10)	39,50 ± 2,72***	33,30 ±2,00+++	32,50 ± 2,46+++	31,20 ±1,87+++
% thay đổi so với T <sub>0</sub>		↓ 15,49%	↓ 17,62%	↓ 20,88%
<b>Lô 6:</b> Uống ACNECA liều 2,16g/kg/ngày (n=10)	39,70 ± 2,26***	32,30 ±2,11+++	30,60 ± 1,65+++	29,90 ±1,37+++ p <sub>6-1</sub> > 0,05
% thay đổi so với T <sub>0</sub>		↓ 18,45%	↓ 22,71%	↓ 24,45%

(T-test student)

So với lô chứng sinh học: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

So với lô mô hình: +p<0,05; ++p<0,01; +++p<0,001

**Nhận xét:** Sau 3 tuần điều trị độ dày vành tai chuột trung bình của lô uống ACNECA liều 0,72g/kg/ngày, lô uống ACNECA liều 2,16g/kg/ngày, lô uống Isotretinoin liều 3mg/kg/ngày, lô uống Doxycyclin liều 12mg/kg/ngày giảm rõ rệt so với lô mô hình uống nước cất (p<0,001), không có sự khác biệt khi so sánh độ dày vành tai chuột trung bình giữa các lô uống thuốc điều trị (p>0,05). Sau 3 tuần điều trị (T<sub>3</sub>) độ dày vành tai chuột trung bình của lô uống Doxycyclin liều 12mg/kg/ngày và lô uống ACNECA liều 2,16g/kg/ngày so với lô chứng sinh học không có sự khác biệt (p>0,05). Như vậy, chuột lô uống Doxycyclin liều 12mg/kg/ngày và lô uống ACNECA liều 2,16g/kg/ngày đã phục hồi tổn thương trứng cá sau 3 tuần điều trị.

- Trên mức độ tổn thương mô bệnh học:

Kết quả các chỉ tiêu mức độ tổn thương mô bệnh học phù nội bào, thoát bào của nhóm uống ACNECA liều 0,72g/kg/ngày cải thiện rõ so với nhóm mô hình uống nước cất (\* $p < 0,05$ ). Nhóm uống liều 2,16g/kg/ngày không chỉ cải thiện rõ rệt về chỉ tiêu mức độ tổn thương mô bệnh học phù nội bào, thoát bào mà còn cải thiện rõ rệt mức độ bít tắc cổ nang lông so với nhóm mô hình (+ $p < 0,05$ ). Nhóm uống ACNECA liều 0,72g/kg/ngày và liều 2,16g/kg/ngày có sự cải thiện tổn thương mô bệnh học ở bề mặt thượng bì, tuyến bã, tế bào viêm, xung huyết so với nhóm mô hình sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Nhóm uống ACNECA liều 0,72g/kg/ngày và liều 2,16g/kg/ngày không có sự khác biệt sự cải thiện tổn thương mô bệnh học so với nhóm Isotretinoin liều 3mg/kg/ngày, Doxycyclin liều 12mg/kg/ngày ( $p > 0,05$ ).

### 3.2. Hiệu quả của ACNECA trên lâm sàng trong điều trị bệnh trứng cá thông thường mức độ vừa

#### 3.2.1. Đặc điểm chung bệnh nhân nghiên cứu

Các yếu tố giới tính, nhóm tuổi, thời gian mắc bệnh, yếu tố thuận lợi mọc mụn, số lượng tổn thương của nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng trước điều trị đều không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ,  $\chi^2$ ). Điều này cho thấy hai nhóm nghiên cứu và đối chứng có sự tương đồng để tiến hành so sánh hiệu quả điều trị.

#### 3.2.2. Hiệu quả điều trị trên người

❖ Số lượng tổn thương cơ bản sau 30 ngày và sau 60 ngày điều trị

Đánh giá kết quả điều trị sau 30 ngày và 60 ngày điều trị ở mỗi nhóm nghiên cứu và đối chứng, số lượng từng loại tổn thương cơ bản, tổng số lượng tổn thương đều giảm so với trước điều trị, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , T-test Student). So sánh kết quả điều trị sau 30 ngày giữa nhóm nghiên cứu và đối chứng, tổng số lượng tổn thương ở nhóm đối chứng giảm đi nhiều hơn so với ở nhóm nghiên cứu nhưng sự khác biệt đều không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ , T-test Student). So sánh kết quả điều trị 60 ngày giữa nhóm nghiên cứu và đối chứng, tổng số lượng tổn thương ở nhóm đối chứng giảm đi nhiều hơn so với ở nhóm nghiên cứu sự khác biệt đều có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ , T-test Student).

Bảng 3.2. Đánh giá mức độ hiệu quả sau 30 và 60 ngày điều trị

Mức độ hiệu quả	Nhóm nghiên cứu (n=50)				Nhóm đối chứng (n=50)				p (Fisher exact test)
	Sau 30 ngày		Sau 60 ngày		Sau 30 ngày		Sau 60 ngày		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Tốt	0	0,0	11	22,0	0	0,0	24	48,0	

Khá	13	<b>26,0</b>	20	<b>40,0</b>	17	<b>34,0</b>	20	<b>40,0</b>	$p_1 > 0,05$
Trung bình	33	66,0	19	38,0	33	66,0	6	12,0	
Kém	4	8,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	$p_2 < 0,01$
Tổng	50	100,0	50	100,0	50	100,0	50	100,0	

**Nhận xét:** Sau 30 ngày điều trị cho thấy, mức độ hiệu quả điều trị giữa nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng không có sự khác biệt ( $p_1 > 0,05$ ). Sau 60 ngày, nhóm đối chứng có mức độ hiệu quả điều trị Tốt nhiều hơn nhóm nghiên cứu, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p_2 < 0,01$ ).

*Bảng 3.3. Mức chuyển độ tổn thương trứng cá theo Jerry KL Tan -2008*

Mức độ tổn thương	T0 ( $X \pm SD$ , điểm)	T30 ( $X \pm SD$ , điểm)	T60 ( $X \pm SD$ , điểm)	$P_{0-30}$	$P_{0-60}$
<b>Nhóm nghiên cứu (n=50)</b>	1,98 ± 0,14	1,58 ± 0,50	1,18 ± 0,56	<0,001	<0,001
<b>Nhóm đối chứng (n=50)</b>	2,06 ± 0,24	1,64 ± 0,56	1,1 ± 0,30	<0,001	<0,001
<b>p</b>	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$		

(*T-test Student*)

**Nhận xét:** Tại thời điểm T30 và T60, cả hai nhóm nghiên cứu và đối chứng đều giảm mức độ tổn thương trứng cá so với trước khi uống thuốc điều trị ( $p < 0,001$ ). Khi so sánh mức độ tổn thương trứng cá giữa hai nhóm nghiên cứu và đối chứng tại thời điểm T30 không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ), tại thời điểm T60 mức tổn thương trứng cá nhóm nghiên cứu giảm nhiều hơn nhóm đối chứng ( $p < 0,001$ ).

*Bảng 3.4. Chỉ tiêu theo dõi chứng trạng Y học cổ truyền*

Chứng trạng	$(X \pm SD, \text{điểm})$				$p_1$	$p_2$
	Nhóm nghiên cứu (n=50)		Nhóm đối chứng (n=50)			
	T0	T60	T0	T60		
Hình thái tổn thương	2,96±0,20	1,62±0,92	2,90±0,46	1,28±0,83	$>0,05$	$>0,05$
$p_{0-60}$	$p < 0,001$		$p < 0,001$			
Sắc mặt	0,78±0,42	0,54±0,50	0,80±0,4	0,40±0,49	$>0,05$	$>0,05$
$p_{0-60}$	$p < 0,05$		$p < 0,001$			
Ngứa	0,48±0,50	0,28±0,45	0,68±0,47	0,50±0,51	$<0,05$	$<0,05$
$p_{0-60}$	$p < 0,05$		$p > 0,05$			
Đau	0,64±0,52	0,18±0,40	0,68±0,47	0,18±0,39	$>0,05$	$>0,05$
$p_{0-60}$	$p < 0,001$		$p < 0,001$			
Đại tiện táo	1,12±0,66	0,02±0,14	1,20±0,73	1,12±0,70	$>0,05$	$<0,001$
$p_{0-60}$	$p < 0,001$		$p > 0,05$			
Nước tiêu vàng	0,76±0,72	0,04±0,20	0,60±0,64	0,58±0,64	$>0,05$	$<0,001$
$p_{0-60}$	$p < 0,001$		$p > 0,05$			
Khô miệng	1,56±0,79	0,06±0,24	0,70±0,81	1,36±0,90	$<0,001$	$<0,001$
$p_{0-60}$	$p < 0,001$		$p < 0,001$			

Hôi miệng	0,98±0,79	0,08±0,27	0,84±0,82	0,82±0,80	>0,05	<0,001
<b>p<sub>0-60</sub></b>	<b>p&lt;0,001</b>		<b>p&gt;0,05</b>			
Tổng điểm	9,14±2,51	2,86±1,59	8,58±2,35	6,18±2,15	>0,05	<0,001
<b>p<sub>0-60</sub></b>	<b>p&lt;0,001</b>		<b>p&lt;0,001</b>			

(*T-test Student*), p<sub>1</sub> (trước điều trị 2 nhóm); p<sub>2</sub> (Sau điều trị 2 nhóm)

**Nhận xét:** Đánh giá chỉ tiêu chứng trạng YHCT, tất cả các chỉ tiêu chứng trạng YHCT trong nhóm nghiên cứu đều giảm đi so với trước nghiên cứu với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05). Trong khi đó ở nhóm đối chứng sau điều trị thì chỉ tiêu chứng trạng khô miệng nặng hơn trước điều trị (p<0,001); chỉ tiêu chứng trạng ngứa, đại tiện táo, nước tiểu vàng, hôi miệng cải thiện không đáng kể so với thời điểm trước nghiên cứu (p>0,05), chứng trạng hình thái tổn thương, sắc mặt, đau cải thiện hơn trước điều trị (p<0,001). Nhóm nghiên cứu cải thiện tổng thể các chứng trạng YHCT tốt hơn nhóm đối chứng (p<0,001).

*Bảng 3.5. Bảng đánh giá chỉ số chất lượng cuộc sống bệnh Da liễu (DLQI)*

Nhóm	T0	T60	P
	( $\bar{X} \pm SD$ , điểm)	( $\bar{X} \pm SD$ , điểm)	
<b>Nhóm nghiên cứu (n=50)</b>	10,06 ± 4,11	2,98 ± 3,98	p<0,001
<b>Nhóm đối chứng (n=50)</b>	10,26 ± 3,49	1,32 ± 2,27	p<0,001
p	p>0,05	p<0,05	

(*T-test Student*)

**Nhận xét:** Kết quả phân tích của bảng cho thấy, bệnh nhân ở 2 nhóm đều có chỉ số chất lượng cuộc sống giảm sau điều trị so với trước điều trị (p<0,001). Bên cạnh đó ở nhóm nghiên cứu thì chỉ số chất lượng cuộc sống trung bình là cao hơn so với ở nhóm đối chứng, chứng tỏ nhóm đối chứng cải thiện chất lượng cuộc sống tốt hơn nhóm nghiên cứu (p<0,05).

*Bảng 3.6. Đánh giá mức độ hài lòng của bệnh nhân*

Mức độ	Nhóm nghiên cứu (n=50)				Nhóm đối chứng (n=50)				p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>
	Sau 30 ngày		Sau 60 ngày		Sau 30 ngày		Sau 60 ngày			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
<b>Hài lòng</b>	42	84,0	41	82,0	44	88,0	44	88,0	>0,05	>0,05
<b>Bình thường</b>	8	16,0	9	18,0	5	10,0	5	10,0	5	
<b>Không hài lòng</b>	0	0,0	0	0,0	1	2,0	1	2,0		
<b>n</b>	50	100,0	50	100,0	50	100,0	50	100,0		

(*Fisher exact test*)

**Nhận xét:** Sự hài lòng sau điều trị ở 2 nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng ở thời điểm sau 30 và sau 60 ngày điều trị không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### **3.3. Tác dụng không mong muốn**

#### **❖ Tác dụng không mong muốn trên lâm sàng**

Sau 30 ngày điều trị và sau 60 ngày điều trị nhóm nghiên cứu không thấy có tác dụng không mong muốn nào. Sau 30 ngày điều trị, nhóm đối chứng xuất hiện những tác dụng không mong muốn trên lâm sàng với triệu chứng khô môi chiếm 100%, khô miệng 48%, bong vảy da 15%, viêm kết mạc 8%, đau khớp 5%, rụng tóc 2%. Sau 60 ngày điều trị, nhóm đối chứng xuất hiện những tác dụng không mong muốn trên lâm sàng với triệu chứng khô môi chiếm 43%, khô miệng 40%, bong vảy da 16%, viêm kết mạc 8%, đau khớp 7%, rụng tóc 2%. Như vậy nhóm đối chứng có nhiều tác dụng không mong muốn hơn nhóm nghiên cứu ( $p < 0,001$  và  $p < 0,05$ ).

#### **❖ Tác dụng không mong muốn trên cận lâm sàng**

Đa số các chỉ số sinh hóa máu, chỉ số huyết học của bệnh nhân nhóm nghiên cứu, nhóm đối chứng trước điều trị và sau điều trị không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ). Chỉ số Creatinin và ALT, tiểu cầu của nhóm đối chứng ở thời điểm T0 và T60 có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), nhưng các chỉ số vẫn trong giới hạn bình thường.

## **CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN**

### **4.1. Độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng điều trị bệnh trứng cá của ACNECA trên thực nghiệm**

#### **4.1.1. Độc tính cấp và độc tính bán trường diễn**

ACNECA là một bài thuốc mới chưa được nghiên cứu, lại được bào chế dưới dạng cốm tan nên việc xác định độc tính cấp và liều chết 50% số động vật thí nghiệm để đánh giá mức độ độc là cần thiết, là cơ sở chọn liều thử tác dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả nghiên cứu xác định độc tính cấp cho thấy ACNECA không có biểu hiện độc tính cấp trên chuột nhắt trắng ở liều tối đa chuột có thể uống và có thể dung nạp là 75g/kg thể trọng chuột, cao gấp 52 lần liều dự kiến lâm sàng trên người.

Trứng cá là bệnh da mạn tính nên cần phải điều trị lâu dài. Vì vậy, việc nghiên cứu độc tính bán trường diễn của ACNECA là cần thiết để có thể khuyến cáo thời gian sử dụng trên bệnh nhân. Mức liều thử trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn được tính từ liều dự kiến trên lâm sàng 0,12g/kg/ngày và được quy đổi liều tương đương trên chuột cống trắng theo hệ số 6. Do đó, nghiên cứu độc tính bán trường diễn thử nghiệm với mức liều 0,72g/kg/ngày (liều tương đương với liều lâm sàng) và mức liều 2,16

g/kg/ngày (liều gắp 3 lần liều lâm sàng). Thử nghiệm được tiến hành song song với một lô chứng sinh học uống nước cất, có số lượng chuột bằng số lượng chuột dùng trong nhóm thuốc thử (n=10 con chuột). Kết quả không xác định được độc tính bán trường diễn của ACNECA với liều 0,72g/kg/ngày và liều 2,16 g/kg/ngày khi chuột uống liên tục 90 ngày.

Kết quả nghiên cứu không xác định được độc tính cấp và bán trường diễn của ACNECA là phù hợp với kết quả tra cứu từng vị thuốc cấu thành nên chế phẩm ACNECA trong các tài liệu y văn là 14 vị thuốc có trong ACNECA không có độc và thường xuyên được các thầy thuốc phối ngũ kê đơn trên lâm sàng mà không thấy xuất hiện các dấu hiệu nhiễm độc và phù hợp với tính chất điều trị lâu dài của bệnh trứng cá, là cơ sở cung cấp dữ liệu cho nghiên cứu tác dụng và hiệu quả của ACNECA trên thực nghiệm cũng như trên lâm sàng.

#### **4.1.2. Tác dụng trên thực nghiệm**

##### **4.1.2.1. Tác dụng kháng khuẩn**

Ngoài vai trò của vi khuẩn *C. acnes* thì sự phát triển của các vi khuẩn khác ở nang lông tuyến bã như *S. aureus*, *S. epidermidis* cũng có vai trò hình thành mụn trứng cá. Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng mụn trứng cá có thể là kết quả của sự mất cân bằng hệ vi sinh vật trên da. Do đó, luận án nghiên cứu tác dụng của ACNECA lên ba chủng vi khuẩn thường gặp trong bệnh lý trứng cá là *C. acnes*, *S. aureus* và *S. Epidermidis*.

Tác dụng kháng khuẩn của chế phẩm ACNECA với *S. aureus*, *S. epidermidis* và *C. acnes* là nhờ sự phối hợp của một số vị dược liệu. Thành phần phenolic acid, glycoside, flavonoid và dầu volatile trong Kim ngân hoa, Bỏ công anh, Liên kiều có tác dụng ức chế nhiều loại vi khuẩn với mức độ khác nhau.

##### **4.1.2.2. Tác dụng chống viêm trên mô hình phù tai chuột**

Có hai hiện tượng luôn xảy ra ở hầu hết các giai đoạn sinh bệnh học của mụn trứng cá, ngay cả khi không còn thương tổn lâm sàng, đó là vi nhân mụn trứng cá và quá trình viêm. Do đó, các thuốc chống viêm được dùng để điều trị bệnh trứng cá có thể phát huy tác dụng trong tất cả các giai đoạn tổn thương. Vậy chế phẩm ACNECA có tác dụng chống viêm hay không? Để trả lời câu hỏi này, luận án tiến hành gây mô hình viêm cấp và bán cấp bằng cách bôi 20µl dầu croton lên hai mặt của tai phải chuột theo mô hình của Andre Barbosa năm 2017. Cơ chế gây viêm của dầu croton do hoạt chất 12-o-tetracanoilphorbol-13-acetate (TPA) và các este phorbol có khả năng gây kích ứng mạnh trên da, làm tăng hoạt tính của Phospholipase A2 (PLA2) dẫn tới tăng tạo acid arachidonic và sau đó là các yếu tố liên quan tới quá trình viêm như leucotrien (LTC4, LTD4) và prostaglandin E2. Cơ chế gây kích ứng da của dầu croton còn có sự tham gia hoạt hóa của hai hệ enzym là Cyclooxygenase (COX) và Lipooxygenase (LOX).

Tác dụng chống viêm của ACNECA trên mô hình phù tai chuột bằng

dầu croton do các hoạt chất glycosid có trong Kim ngân hoa, Liên kiều ức chế tổng hợp, giải phóng các yếu tố gây viêm, giảm hoạt động của các enzym proteinase cũng như sự biểu hiện của các phân tử liên quan đến sự đáp ứng miễn dịch. Nghiên cứu của Yulie chỉ ra rằng các polyphenol có trong Kim ngân hoa làm giảm các chất trung gian gây viêm. Trên in vitro, thành phần forsythoside A có trong dịch chiết của Liên kiều có tác dụng ức chế enzym 5-lipoxygenase (LOX), cyclooxygenase (COX-1, COX-2) và elastase, ức chế sự bài tiết các cytokin của tế bào nội mô từ đó làm giảm các đáp ứng viêm.

Tác dụng chống viêm của ACNECA mới đánh giá đại thể trên mô hình động vật thông qua chỉ số cân nặng và độ dày tai chuột, cần đánh giá ở cấp độ phân tử xem ACNECA có tác dụng giảm IL-1 $\alpha$  hay không bằng phương pháp ELISA hay nhuộm hóa mô miễn dịch. Tác giả Lý Tư Kỳ năm 2018 nghiên cứu bài thuốc Thanh tọa phương có tác dụng chống viêm bằng đo nồng độ IL-1 $\alpha$  và TNF- $\alpha$  bằng phương pháp Elisa. Kết quả sau 30 ngày uống thuốc thử, nồng độ IL-1 $\alpha$  và TNF- $\alpha$  ở ba liều Thanh tọa sang và spironolacton thấp hơn nhiều so với nhóm chứng ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.3. Tác dụng trên mô hình trứng cá động vật

##### ❖ Tác dụng của ACNECA lên độ dày vành tai chuột

Độ dày tai chuột là phản ứng viêm của tai chuột với vi khuẩn *C. acnes*, đáp ứng viêm mạnh nhất vào ngày thứ 6 sau tiêm, giảm dần về bình thường trong vòng 20 ngày, có thể tồn tại đến ngày thứ 35. Kết quả nghiên cứu cho thấy ACNECA liều 0,72g/kg/ngày và liều 2,16g/kg/ngày đều làm giảm độ dày tai chuột so với lô mô hình uống nước cất ( $p < 0,05$ ). Chứng tỏ ACNECA có tác dụng chống viêm trên mô hình trứng cá tiêm vi khuẩn *C. acnes* và tác dụng chống viêm của ACNECA tương đương với tác dụng chống viêm của isotretinoin và doxycyclin ( $p < 0,001$ ).

##### ❖ Tác dụng của ACNECA lên mức độ tổn thương mô bệnh học

ACNECA có tác dụng cải thiện mức độ tổn thương mô bệnh học phù nội bào, thoát bào, bít tắc cổ nang lông của trứng cá trên vành tai chuột mô hình trứng cá do tiêm *C. acnes* và mức độ cải thiện hình ảnh tổn thương viêm rõ rệt hơn mức độ tổn thương bề mặt thượng bì, tuyến bã.

ACNECA có hiệu quả cải thiện mức độ tổn thương mô bệnh học trên mô hình trứng cá động vật do vi khuẩn *C. acnes* do ACNECA được cấu thành từ các vị thuốc chống viêm, kháng khuẩn và tác dụng chống viêm, kháng ba chủng vi khuẩn thường gặp trong bệnh trứng cá (*C. acnes*, *S. aureus* và *S. Epidermidis*) đã được chứng minh trên thực nghiệm.

Do điều kiện thời gian và tài chính có hạn nên luận án mới chỉ đánh giá tác dụng của ACNECA trên mô hình trứng cá động vật do vi khuẩn *C. acnes*, chưa đánh giá xem ACNECA có tác dụng làm giảm dày sừng, giảm tiết chất bã hay tác dụng kháng androgen hay không mặc dù thành phần bài thuốc có những vị thuốc được nghiên cứu chứng minh tác dụng kháng

androgen: Sa nhân (*Fructus Amomi*), Đan sâm (*Radix Salviae miltiorrhizae*), Cam thảo (*Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*), Hoàng cầm (*Radix Scutellariae*). Đây cũng là hướng mở cho những nghiên cứu tiếp theo để làm rõ hơn cơ chế tác dụng của chế phẩm ACNECA. Ở Trung Quốc tác giả Lý Tư Kỳ năm 2018 đã chứng minh được bài thuốc Thanh tọa phương có tác dụng làm giảm kích thước tuyến bã của chuột đồng vàng trên mô hình trứng cá động vật.

#### **4.2. Hiệu quả của ACNECA trên lâm sàng trong điều trị bệnh trứng cá thông thường mức độ vừa**

##### **4.2.1. Đặc điểm chung bệnh nhân nghiên cứu**

Nghiên cứu đánh giá hiệu quả của ACNECA trên người sử dụng phương pháp nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng, ngẫu nhiên có đối chứng, tiến cứu. Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng có đối chứng đòi hỏi nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng phải có sự tương đồng về các chỉ tiêu theo dõi trước khi tiến hành can thiệp phương pháp điều trị. Kết quả cho thấy hầu hết các yếu tố giới tính, nhóm tuổi, thời gian mắc bệnh, yếu tố thuận lợi mọc mụn, số lượng tổn thương, trước điều trị được xét đến giữa hai nhóm đối tượng để đánh giá tại thời điểm trước điều trị có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Cả hai nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng đều có mức độ trứng cá vừa theo YHHĐ và trứng cá thể thấp nhiệt theo YHCT. Điều này cho thấy hai nhóm đối tượng là nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng có sự tương đồng để tiến hành so sánh hiệu quả điều trị giữa hai nhóm. Sự tương đồng giữa hai nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng giúp đánh giá hiệu quả điều trị trên người của thuốc thử ACNECA có ý nghĩa khoa học.

##### **4.2.2. Hiệu quả điều trị trên lâm sàng**

Đánh giá hiệu quả trên lâm sàng dựa trên tác dụng điều trị (tác dụng chữa bệnh) là tác dụng làm giảm hoặc khỏi bệnh và tác dụng có lợi cho sức khỏe là tác dụng làm tăng chất lượng cuộc sống của bệnh nhân. Tác dụng điều trị được đánh giá bằng cách đếm số lượng tổn thương mụn trứng cá và đánh giá hiệu quả điều trị của thuốc ACNECA trên chứng trạng YHCT. Dựa trên tổng số lượng tổn thương trứng cá trước sau điều trị để tính mức độ tổn thương trứng cá và mức độ hiệu quả điều trị. Tác dụng có lợi cho sức khỏe được đánh giá bằng chỉ số chất lượng cuộc sống bệnh nhân da liễu của và mức độ hài lòng của bệnh nhân.

Đánh giá kết quả điều trị sau 30 ngày và 60 ngày điều trị ở mỗi nhóm nghiên cứu và đối chứng, số lượng từng loại tổn thương cơ bản, tổng số lượng tổn thương đều giảm so với trước điều trị, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). So sánh kết quả điều trị sau 30 ngày giữa nhóm nghiên cứu và đối chứng, tổng số lượng tổn thương ở nhóm đối chứng giảm đi nhiều hơn so với ở nhóm nghiên cứu nhưng sự khác biệt đều không có ý



nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). So sánh kết quả điều trị 60 ngày giữa nhóm nghiên cứu và đối chứng, tổng số lượng tổn thương ở nhóm đối chứng giảm đi nhiều hơn so với ở nhóm nghiên cứu sự khác biệt đều có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Khi đánh giá hiệu quả điều trị dựa trên sự thay đổi số lượng tổn thương mới chỉ đánh giá được số lượng tổn thương trước sau điều trị giảm có ý nghĩa thống kê hay không chứ chưa phản ánh được mức độ cải thiện hiệu quả điều trị của từng nhóm để có thể so sánh mức độ hiệu quả điều trị giữa nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng. Vì thế luận án tiến hành đánh giá hiệu quả điều trị dựa trên mức độ cải thiện hiệu quả điều trị. Kết quả ban đầu cho thấy ở nhóm nghiên cứu uống ACNECA có tỷ bệnh nhân đạt hiệu quả “Tốt” tăng từ 0% (T30) lên 22% (T60) và tăng tỷ lệ bệnh nhân đạt hiệu quả “Khá” từ 26% (T30) lên 40% (T60), tổng hiệu quả điều trị sau 30 ngày là 92,0%, tổng hiệu quả điều trị sau 60 ngày là 100,0% [Bảng 3.2]. So sánh hiệu quả điều trị của nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng, sau 60 ngày, nhóm nghiên cứu có bệnh nhân đạt hiệu quả điều trị Tốt và Khá là 26% và nhóm đối chứng 34% sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Sau 60 ngày, nhóm đối chứng có bệnh nhân đạt hiệu quả điều trị Tốt và Khá là 88% cao hơn so nhóm nghiên cứu là 62% sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Kết quả nghiên cứu của luận án thấp hơn so với nghiên cứu của tác giả Đoàn Chí Cường năm 2018 dùng Hoàng liên giải độc thang điều trị cho 40 bệnh nhân trứng cá thể thấp nhiệt mức độ vừa và nhẹ. Sau 28 ngày điều trị 92,5% đạt hiệu quả điều trị, trong đó không có bệnh nhân đạt kết quả Tốt, 52,5% bệnh nhân đạt kết quả Khá, 40% bệnh nhân đạt kết quả Trung Bình. Có lẽ do đối tượng nghiên cứu của Đoàn Chí Cường có cả mức độ nhẹ và trung bình, có tổng số lượng tổn thương  $32,1 \pm 18,1$ , ít hơn nhiều so với nhóm uống ACNECA có tổng số tổn thương  $66,32 \pm 25,27$ . Kết quả nghiên cứu của luận án cao hơn nghiên cứu của tác giả Thẩm Tân Long năm 2018 dùng Ngũ vị tiêu độc ẩm gia giảm kết hợp vitamin A acid điều trị trứng cá nam giới mức độ trung bình và nặng (thể nhiệt độc và huyết ú). Sau 8 tuần điều trị, 100% bệnh nhân có hiệu quả điều trị, trong đó đạt hiệu quả Tốt 19,0% thấp hơn kết quả nghiên cứu của luận án có hiệu quả Tốt 22,0% sau 60 ngày, có lẽ do bệnh nhân là nam thuộc thể nặng nhiệt độc, huyết ú của YHCT. Kết quả nghiên cứu của luận án thấp hơn với nghiên cứu của tác giả Lý Tinh Tinh năm 2013 dùng Ngũ vị tiêu độc ẩm trong uống ngoài đắp điều trị 60 bệnh nhân trứng cá thể thấp nhiệt uẩn kết. Sau 4 tuần điều trị, 100% bệnh nhân có hiệu quả, trong đó bệnh nhân đạt hiệu quả Tốt 71,43% cao hơn kết quả luận án, có lẽ do Lý Tinh Tinh kết hợp trong uống ngoài bôi làm tăng hiệu quả điều trị của bài thuốc.

Khi đánh giá hiệu quả điều trị dựa trên mức độ tổn thương trước và sau khi điều trị thì nhóm đối chứng là như nhau.

Tóm lại, khi đánh giá hiệu quả điều trị dựa vào tổn thương cơ bản của trứng cá thì sau 30 ngày điều trị hai nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng có hiệu quả điều trị như nhau, sau 60 ngày thì nhóm đối chứng có hiệu quả điều trị tốt hơn nhóm nghiên cứu. Có lẽ do nhóm đối chứng uống isotretinoin là thuốc có hiệu quả rất tốt với tất cả các loại nhân mụn trứng cá đặc biệt là trứng cá mụn mủ và đã được chứng minh qua nhiều các nghiên cứu trên lâm sàng và luận án sử dụng liều isotretinoin liều 0,5mg/kg/ngày là liều trung bình nên hiệu quả điều trị cao hơn nhóm nghiên cứu uống ACNECA là thuốc mới chưa được nghiên cứu. Do đó, cần nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng với nhiều mức liều hơn để tìm ra liều thuốc ACNECA có hiệu quả tối ưu nhất trên lâm sàng. Hoặc nghiên cứu phối kết hợp thuốc uống ACNECA và thuốc bôi Tây y hoặc Đông y để tăng hiệu quả điều trị.

Ngoài mong muốn sử dụng các tiêu chí của YHHĐ để chứng minh hiệu quả điều trị của ACNECA trên lâm sàng, nghiên cứu của luận án còn mong muốn đánh giá hiệu quả điều trị các chứng trạng của YHCT- đây cũng là điểm mới trong tiêu chí đánh giá hiệu quả điều trị trứng cá bằng thuốc uống YHCT ở Việt Nam. Phần lớn bệnh nhân cũng như các bác sĩ chỉ quan tâm đến tổn thương nhân mụn trứng cá mà chưa quan tâm đến các chứng trạng toàn thân theo tiêu chí của YHCT như chứng nhiệt, chứng thấp, chứng ú trong bệnh trứng cá, gây biểu hiện lâm sàng là táo bón, hơi thở hôi, tổn thương đau nhức, ngứa. Ngoài những tác động gây mất thẩm mỹ của nhân mụn trứng cá thì những chứng trạng trên cũng ảnh hưởng nhiều đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân, làm cho bệnh nhân phải quan tâm lo lắng. Nhóm NC điều trị trứng cá bằng uống ACNECA có các chứng trạng táo bón, hơi thở hôi cải thiện rõ rệt làm cho bệnh nhân rất hài lòng với phương pháp điều trị. Còn nhóm đối chứng uống isotretinoin các chứng trạng YHCT cải thiện ít, không không cải thiện mà còn xuất hiện thêm các tác dụng không mong muốn như khô môi, bong vảy da mặt làm cho bệnh nhân lo lắng phàn nàn trong quá trình điều trị mặc dù sự cải thiện số lượng tổn thương trứng cá trên lâm sàng là rất tốt. Hiệu quả cải thiện các chỉ số chứng trạng ngứa, đỏ mặt của YHCT có thể lý giải do trong ACNECA có Kim ngân hoa một số vị thuốc có tác dụng khu phong thanh nhiệt giải độc, tác dụng khu phong thanh nhiệt tăng lên khi dùng kết hợp với Liên kiều. Do đó, ACNECA có tác dụng cải thiện chứng trạng ngứa, đỏ mặt do thấp nhiệt. Chứng trạng hôi miệng do tỷ vị thấp nhiệt gây ra cũng vì thế mà cải thiện theo. Theo lý luận ngũ hành, thận hành thủy, phế hành kim, thận âm bắt túc không nuôi dưỡng được tạng phế, dẫn đến phế âm hư, âm hư sinh nội nhiệt nên trứng cá có chứng trạng khô miệng, tiểu vàng. Ở mặt chủ yếu kinh phế và kinh vị, phế chủ bì mao, phế biểu lý với đại trường, nếu chế độ ăn không tốt, ăn quá nhiều cao lương mỹ vị, đại tràng tích nhiệt, nhiệt gây ra chứng trạng hôi miệng và táo bón, nhiệt từ đại trường sang phế vị. Từ đó gây ra phế vị huyết nhiệt sinh ra chứng trạng mặt

đỏ, sẩn mụn, mụn mủ. Vị thuốc Hoàng cầm có tác dụng thanh mọi chứng nhiệt ở phế, Đương quy, Bạch Thược có tác dụng bổ âm huyết, can huyết, Trinh nữ tử, Phúc bồn tử, Thổ ty tử bổ can thận, các vị thuốc phối hợp với nhau có tác dụng cải thiện chứng trạng khô miệng, tiểu vàng, đại tiện táo do âm hư, huyết nhiệt mà thành. Mủ là do huyết nhục hóa thành, nếu mủ đặc là khí huyết đầy đủ, nếu mủ loãng là khí huyết hư. Chứng trạng đau là do khí huyết ứ trệ, kinh mạch bế tắc. Do thận âm bất túc, phế vị huyết nhiệt, lâu ngày chưng đốt tân dịch tích tụ thành đàm, âm hư huyết không lưu thông mà ứ lại mà gây đau. Đàm và huyết ứ kết giao ở mặt sinh ra nang cục, sẹo. Vị thuốc Đan bì, Đan sâm có tác dụng lương huyết, hoạt huyết, giúp khử mủ tiêu viêm; Hạ khô thảo, Bồ công anh có tác dụng nhuận kiên, tiêu ung làm cải thiện chứng trạng đau trên lâm sàng

Tác dụng có lợi cho sức khỏe được đánh giá trên chỉ số chất lượng cuộc sống bệnh Da liễu và mức độ hài lòng của bệnh nhân. Mụn trứng cá thường không ảnh hưởng lớn đến sức khỏe, không nguy hiểm đến tính mạng nhưng ảnh hưởng nhiều đến thẩm mỹ, tâm lý bệnh nhân. Việc đánh giá tác động của trứng cá đến chất lượng cuộc sống là cần thiết để phát hiện những bệnh nhân có nguy cơ bị ảnh hưởng tiêu cực để có thể lựa chọn các phương pháp điều trị tích cực hơn, tránh lựa chọn phương pháp làm nặng thêm ảnh hưởng đến tâm lý của bệnh nhân và dùng để đánh giá tác dụng có lợi cho sức khỏe của phương pháp đang điều trị. Điều trị làm cải thiện điểm số chất lượng cuộc sống của nhóm nghiên cứu từ  $10,06 \pm 4,11$  xuống còn  $2,98 \pm 3,98$  sau 60 ngày điều trị ( $p < 0,001$ ). Kết quả nghiên cứu của đề tài tương đương với kết quả nghiên cứu của tác giả Phan Thị Hoa năm 2018 đánh giá điểm số chất lượng cuộc sống của 109 bệnh nhân trứng cá trước khi bôi dịch chiết rễ cây Ba bét lùn là 11,26 và sau khi điều trị là 2,41 ( $p < 0,001$ ). Khi so sánh sự cải thiện điểm số chất lượng cuộc sống (DLQI) của hai nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng sau 60 ngày điều trị thì nhóm đối chứng cải thiện tốt hơn nhóm nghiên cứu ( $p < 0,05$ ). Do bảng câu hỏi đánh giá chất lượng cuộc sống chỉ tập trung vào mức độ ảnh hưởng của biểu hiện bệnh lý trên da (biểu hiện trứng cá trên da) của bệnh nhân đến sinh hoạt hàng ngày, đến tâm lý, đến công. Sự cải thiện số lượng tổn thương trứng cá nhóm đối chứng nhanh và nhiều hơn nhóm nghiên cứu làm cho chất lượng cuộc sống bệnh nhân nhóm đối chứng cải thiện tốt hơn nhóm nghiên cứu. Tuy nhiên, khi hỏi về mức độ hài lòng với phương pháp điều trị và hiệu quả thì hai nhóm nghiên cứu và nhóm đối chứng là như nhau. Bệnh nhân nhóm nghiên cứu không chỉ hài lòng về hiệu quả điều trị cải thiện số lượng tổn thương, chế phẩm dễ uống, tiện sử dụng mà còn hài lòng với những cải thiện chứng trạng YHCT như khô miệng, táo bón, hơi thở hôi, nước tiểu vàng, ngứa. Trong khi nhóm đối chứng các chứng trạng táo bón, hơi thở hôi, nước tiểu vàng cải thiện rất ít lại còn xuất hiện thêm một số tác dụng không mong

muốn như khô môi, bong vảy da mặt, rụng tóc, đau nhức xương, làm cho bệnh nhân khó chịu thấy không yên tâm điều trị, bác sĩ phải thường xuyên giải thích động viên để bệnh nhân tiếp tục liệu trình. Do đó, xu hướng ngày càng nhiều bệnh nhân trứng cá lựa chọn thuốc YHCT ít tác dụng không mong muốn để điều trị. Năm 2016 tác giả Đinh Thị Lê Thành nghiên cứu trong số 118 bệnh nhân trứng cá đến khám tại Bệnh viện Da liễu Trung ương thì có 14 bệnh nhân được khảo sát có tiền sử đã hoặc đang sử dụng thuốc đông y để điều trị trứng cá. Thói quen sử dụng thuốc YHCT để phòng và chữa bệnh của ông cha ta được hình thành trước khi xuất hiện thuốc Tây y, nó đã chứng minh được tính an toàn và hiệu quả qua nhiều thế hệ cổ xưa. Thuốc y học cổ truyền dễ dàng được đón nhận nhờ bề dày lịch sử cũng như người dân tin rằng thuốc YHCT có nguồn gốc từ thảo dược ít tác dụng phụ hơn so với thuốc tây y.

#### **4.2.3. Tác dụng không mong muốn**

Trong quá trình điều trị nhóm nghiên cứu không xảy ra tác dụng không mong muốn nào. Kết quả nghiên cứu này góp phần chứng minh tính an toàn của thuốc uống YHCT trong chăm sóc và điều trị bệnh nhân trứng cá và nó tương đồng với nhiều nghiên cứu sử dụng thuốc YHCT trong điều trị trứng cá. Ngược lại, sau 30 ngày điều trị bệnh nhân nhóm ĐC 100% đều gặp tác dụng không mong muốn là khô môi và 96,0% khô miệng.

Không có sự khác biệt giữa chỉ số sinh hóa và huyết học của bệnh nhân nhóm nghiên cứu ở thời điểm trước và sau nghiên cứu 60 ngày ( $p > 0,05$ ). Kết quả này chứng minh thuốc nghiên cứu không ảnh hưởng đến chức năng gan, thận, chỉ số mỡ máu, công thức máu sau 60 ngày điều trị. Ở Nhóm đối chứng, hầu hết các chỉ số sinh hóa và huyết học trước và sau nghiên cứu 60 ngày không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ), chỉ số Creatinin, AST, tiểu cầu có sự khác biệt khi so sánh trước và sau điều trị 60 ngày nhưng các chỉ số vẫn ở trong giới hạn bình thường ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu lâm sàng chỉ ra tác dụng không mong muốn lên chức năng gan thận, mỡ máu, huyết sắc tố khi sử dụng isotretinoin uống lâu dài, nên vẫn cần phải theo dõi các chỉ số này khi tiếp tục điều trị lâu dài isotretinoin đường uống.

## KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu độc tính và tác dụng của ACNECA trên thực nghiệm cũng như trên lâm sàng, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

### 1. Xác định độc tính cấp, bán trường diễn và tác dụng điều trị bệnh trứng cá của ACNECA trên thực nghiệm

- ACNECA không gây độc tính cấp trên chuột nhắt trắng ở liều dung nạp tối đa 75g/kg/ngày. ACNECA không gây độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng với liều 0,72 g/kg/ngày và liều 2,16 g/kg/ngày (chuột được uống thuốc thử liên tục trong 90 ngày).

- ACNECA có tác dụng ức chế 3 chủng vi khuẩn *C. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis* với các giá trị MIC (MBC) lần lượt là 0,534 (4,272) mg/ml, 1,068 (8,5)mg/ml, 1,068 (8,5)mg/ml. Với liều 4,32 g/kg/ngày ACNECA có tác dụng chống viêm cấp, bán cấp trên mô hình phù tai chuột nhắt trắng với mức độ ức chế viêm lần lượt là 46,74% và 14,17% ( $p < 0,05$ ) và liều 1,44 g/kg/ngày chỉ có tác dụng trên mô hình viêm cấp với mức độ ức chế viêm là 43,24%. ACNECA có hiệu quả điều trị trên mô hình trứng cá do vi khuẩn *C. acnes* tại vành tai chuột cống trắng với liều 0,72 g/kg/ngày và liều 2,16 g/kg/ngày ( $p < 0,05$ ).

### 2. Đánh giá hiệu quả của ACNECA trên lâm sàng trong điều trị bệnh trứng cá thông thường mức độ vừa.

ACNECA có tác dụng điều trị trứng cá thông thường trên người với liều 0,12g/kg/ngày. Sau 60 ngày điều trị, nhóm nghiên cứu (uống ACNECA) có số lượng tổn thương trung bình giảm từ  $66,32 \pm 25,27$  xuống  $19,74 \pm 15,56$ , 100% bệnh nhân được ghi nhận với sự cải thiện (Tốt 22%, Khá 40%, Trung bình 38%). Nhóm đối chứng (uống isotretinoin 0,5mg/kg/ngày) có hiệu quả tốt hơn nhóm nghiên cứu. Tuy nhiên, nhóm nghiên cứu không có tác dụng không mong muốn và cải thiện chứng trạng y học cổ truyền tốt hơn nhóm đối chứng.

## KIẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu, đề nghị:

1. ACNECA có thể áp dụng điều trị bệnh trứng cá thông thường.
2. Đăng ký thuốc để hợp lý hóa kê đơn, thương mại hóa được rộng rãi hơn, bào chế dạng viên nang, viên nén cho tiện sử dụng
3. Nghiên cứu hiệu quả điều trị của ACNECA trên bệnh nhân trứng cá là trẻ em, phụ nữ mang thai hoặc mắc các bệnh lý không được chỉ định điều trị bằng thuốc y học hiện đại.

## HẠN CHẾ CỦA LUẬN ÁN

1. Chưa nghiên cứu xem ACNECA có tác dụng giảm tiết dầu hay

giảm đầy sừng hay không.

2. Thời gian nghiên cứu còn ngắn, số lượng bệnh nhân còn ít.

MINISTRY OF EDUCATION  
AND TRAINING

MINISTRY OF HEALTH

**HANOI MEDICAL UNIVERSITY**



**NGUYEN THI HIEN**

**TOXICITY AND EFFECTS  
OF ACNECA IN TREATING MODERATE  
ACNE VULGARIS**

Specialization: Dermatology

Code: 62720152

**SUMMARY OF MEDICAL PHD THESIS**

**HANOI – 2020**

**THE THESIS WAS COMPLETED AT:**

**HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

**Supervisors: 1. Prof. NGUYEN HUU SAU, MD, PhD**  
**2. DUONG MINH SON, PhD**

**Opponent 1:**

**Opponent 2:**

**Opponent 3:**

The thesis defense shall be held by the university-level Thesis Assessment Board at Hanoi Medical University.

At      on      2020

**The thesis can be found at:**

- Library of Hanoi Medical University



- National Library of Viet Nam

## **LIST OF THE PUBLISHED RELATED TO THE THESIS**

6. Nguyen Thi Hien, Nguyen Huu Sau, Tran Thanh Tung, Duong Minh Son (2018). Evaluation of acute toxicity, subchronic toxicity and treatment effect of The Ngu vi tieu doc am gia giam soluble (ACNECA) on experimental animals. *Journal of practical medicine*, 11(1085), 24-27.
7. Nguyen Thi Hien, Nguyen Huu Sau, Tran Thanh Tung (2018). Effectiveness of The Ngu vi tieu doc am gia giam soluble (ACNECA) on animal acne model caused by propionibacterium acnes. *Journal of research in Viet Nam traditional medicine and pharnacy*, 59, 50-60.
8. Nguyen Thi Hien, Nguyen Huu Sau, Duong Minh Son (2018). Treatment of acne by using Traditional Medicine. *Journal of research in Viet Nam traditional medicine and pharnacy*, 59, 83-91.
9. Nguyen Thi Hien, Nguyen Huu Sau, Tran Thanh Tung, Duong Minh Son (2019). Study on antimicrobial activity and the anti-inflammatory on the experimental model of The Ngu vi tieu doc am gia giam solube (ACNECA). *Journal of practical medicine*, 4 (1095), 124-129.
10. Nguyen Thi Hien, Duong Minh Son, Nguyen Huu Sau, (2019). Efficacy of The Ngu vi tieu doc am gia giam solube (ACNECA) in acne treatment. *Journal of 108 – Clinical medicine and pharmacy*, 14 (4), 53-63.

## **PART A: INTRODUCTION OF THE THESIS**

### **5. INTRODUCTION**

Acne vulgaris is a chronic disease skin that is very common, particularly common in adolescents. The disease has little effect on health, but it greatly affects psychology and quality of life. Treatment of acne takes a long time, after the induction treatment period, it is necessary to continue the maintenance treatment to prevent the relapse. Current topical and oral medications of Western medical treatment are highly effective, but they all have adverse effects, such as skin irritation, digestive disorders, and fetal deformities. The prolonged acne treatment can cause anxiety for patients, especially women of childbearing age, pregnant women, children, and patients who do not respond to treatment and often recur. Current traditional medical treatment has proven the mechanism of action of traditional medications on the four mechanisms of acne formation, which was described by modern medicine. The medicines of traditional medicine have also proven safety and effects through many studies in Vietnam as well as in the world.

ACNECA preparations are manufactured to meet the needs of patients in the use of herbal medicines to treat acne. ACNECA is made up of medicinal herbs that treat acne and are non-toxic. ACNECA is a new preparation that needs to be proved about the safety, mechanism of action, and effects for acne vulgaris.

### **6. OBJECTIVES**

The thesis was conducted with the two objectives, as follows:

- *To determine the acute toxicity, semi-chronic toxicity and effects of ACNECA on experimental studies.*

- *To assess the clinical effects of ACNECA in treating moderate acne vulgaris.*

### **2. NEW CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

- The thesis provides scientific evidence on the effects and safety of ACNECA in the treatment of acne vulgaris according to the pathogenetic.

- ACNECA will be an additional option for clinicians to prescribe medications for patients with acne vulgaris. Using ACNECA will meet the needs of patients using herbal remedies for acne, especially for female patients at reproductive age etc.

- ACNECA is easy to use, easy to store, and suitable for acne that needs long-term treatment.

- Take advantage of available herbal resources to provide care for the people following the motto of the Party and Government

- In the context of difficult economic conditions of the country, the research and production of medicinal products from locally available materials to provide health care for the community is the right and practical direction for socio-economic development.

### 3. THE LAYOUT OF THE THESIS

The main content of the thesis consists of 141 pages, dividing into four chapters: Introduction (02 pages); Overview (37 pages); Materials, Subjects and Methods (23 pages); Results (39 pages); Discussion (37 pages); Conclusion (01 pages); Recommendation (01 page); Study limitation (01 page). The thesis includes 35 tables, 1 figure, 19 images and 178 references (26 references in Vietnamese, 126 references in English, and 26 references in Chinese, 57 references in the last 5 years) and 6 related annexes.

## PART B: THE CONTENT OF THE THESIS

### CHAPTER 1: OVERVIEW

#### 1.5. Acne vulgaris according to modern medical science

According to Layton, acne is a chronic inflammatory disease, characterized by papules, clinically manifested as whiteheads, blackheads, erythematous papules, pustules, nodules or cysts. Causes of acne include four main factors: increased sebum secretion, hyperkeratosis of hair follicles, *P. acnes/ C.acnes* bacteria and inflammation. The definitive diagnosis of acne vulgaris is based mainly on clinical symptoms. It is necessary to diagnose the level of acne to choose the appropriate treatment regimen and monitor the effectiveness of the treatment process. Factors related to acne include age, gender, family factors, weather, race, occupation, stress, endocrine diseases, medications, local causes, diets that increase blood sugar, milk and dairy. Treatment of acne includes lifestyle adjustments (diet and lifestyle), control of related factors, and the use of medication or other alternatives. Current acne medications include topical and systematic medications. Topical medications are recommended for the treatment of mild or moderate acne. The topical medications using the most are antibiotics, retinoids and other substances, such as benzoyl peroxide, azelaic acid, salicylic acid, and dapsone. These topical medications are often used together to treat as many of the factors in the pathogenesis as possible. Systemic treatment is generally recommended in patients with moderate to severe acne, acne that is resistant to topical treatments, and in cases where acne is likely to cause scarring. Systemic medications for acne include antibiotics, isotretinoin, and hormones. Alternative methods include laser and biological light such as KTP laser, 1320nm YAG laser, LED light, Photodynamic therapy (PDT), biological skin replacement, acne incision, cosmetic treatment, etc.

#### 1.6. Acne vulgaris according to traditional medicine

According to traditional medicine, acne is a skin disease called *Cuo Chuang, Fen Ci*. According to Pham Thuy Cuong in the book *Chinese-Western Medicine combined with clinical skinology* in 2002, acne is mainly due to kidney yin insufficiency, heat of lung and stomach and blood, impediment to connection due to dampness stagnation, phlegm stasis and disharmony of the Thoroughfare and Conception vessels. There are many different ways of categorizing acne, but when conducting research, most of the Chinese scientists

categorize acne into four forms: wind-heat, dampness-heat, blood stasis, disharmony of the Thoroughfare and Conception vessels (according to "National standard of the People's Republic of China. Clinical term for Eastern medicine diagnosis"). Treatment includes topical, oral, fumigating, topical or acupuncture medications.

### **1.7. The situation of studies on acne vulgaris**

Previously, researches on the method of traditional treatments for acne only assessed the clinical effects, but they did not clarify the mechanism and pharmacological components of the medications that affect the pathogenesis of acne. Currently, traditional medicine preparations used to treat acne have been prepared with modern technology. They have been analyzed the pharmaceutical ingredients in the preparation, and they were proved the effects, safety, and mechanism of action on the acne formation mechanism by scientific methods.

### **1.8. Overview of ACNECA**

#### **1.8.1. The origin of ACNECA**

The origin of ACNECA is derived from the remedy of "Wu wei xiao du yin" in the "Yi Zong Jin Jian. Wai ke xin fa jue" of Wu qian. In order to increase the effectiveness of treatment according to the mechanism pathogenesis of modern medicine and ease of use, we added and removed some herbal medicines to increase a new remedy. The remedy was prepared in the form of soluble nuggets. The name ACNECA is an abbreviation of the terms ACNE and CARE.

#### **1.8.2. The formula of ACNECA**

The formula for a packaging unit includes 14 elements: *Flos Lonicera* 1.28 g; *Fructus Forsythiae suspensae* 2.4 g; *Spica Prunellae* 2.4 g; *Herba Lactucae indicae* 1.6 g; *Herba Lactucae indicae* 2.4 g; *Semen Cuscutae* 2.4 g; *Radix Ligustri Lucidi* 2.4 g; *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* 0.96 g; *Radix Angelicae sinensis* 1.28g; *Radix Paeoniae lactiflorae* 1.6g; *Radix Salviae multiorrhizae* 2.4g; *Radix Scutellariae* 1.6g; *Cortex Paeoniae suffruticosae* 2.4 g; *Fructus Amomi* 0.64g.

#### **1.4.3. The manufacturing of ACNECA**

The herbal elements are processed according to the traditional method and formulated ACNECA by the method of preparing soluble nuggets. ACNECA soluble nuggets are small brown bronze, aromatic bitter with medicinal herbs, packed in silver tin film, each packet contains 6 grams of melted nuggets, produced at the Department of Pharmacy - Central Traditional Medicine Hospital. All pharmaceuticals to produce ACNECA met Vietnam Pharmacopoeia IV standards, 2009 Chinese Pharmacopoeia, and the ACNECA product met basic standards. Clinical dose: 0.12g/kg/day. Dissolve the soluble nuggets ACNECA in distilled or filtered water before drinking.

#### **1.4.3. The common effects of ACNECA**

The effect of ACNECA according to traditional medicine: clear heat detoxifies, activate blood anti - inflammation, enrich liver - kidney yin.

The effect of ACNECA according to modern medicine: In ACNECA remedy, most of the herbs have anti-inflammatory and anti-bacterial and they are all in the group of medicines to treat heat conditions such as *Flos Lonicera*, *Fructus Forsythiae suspensae*, *Radix Scutellariae*, *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*. In addition, *Flos Lonicera*, *Fructus Forsythiae suspensae*, *Radix Scutellariae* can also kill *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Outside, *Flos Lonicera*, *Fructus Forsythiae suspensae*, *Herba Lactucae indicae*, *Cortex Paeoniae suffruticosae*, *Spica Prunellae*, *Radix salviae miltiorrhizae*, *Paeonia lactiflora*, *Scutellaria baicalensis Georgi* also has anti-inflammatory effects. The antibacterial effect increases the anti-inflammatory effect of traditional medicine. *Fructus Amomi*, *Radix Salviae miltiorrhizae*, *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*, *Scutellaria baicalensis Georgi* have been reported to have the effect against androgen and phytoestrogen. *Radix Angelicae sinensis* has been shown that topical or oral extracts increase the protective barrier of the skin, prevent water cell dehydration, limit inflammation in patients with atopic dermatitis, acne patients. *Radix Ligustri Lucidi*, *Herba Lactucae indicae*, *Semen Cuscutae* was found that they have antioxidant effects consistent with chronic inflammation of acne.

## CHAPTER 2: MATERIALS - SUBJECTS - METHODS

### 2.1 Material

- ACNECA was prepared in the form of soluble nuggets, small brown copper beads, bitter aroma of medicinal herbs, packed in silver tin film, each packet contains 6 grams of soluble nuggets.

- ACNECA was produced in the Department of Pharmacy - Central Traditional Medicine Hospital.

- All herbal ingredients met Vietnam Pharmacopoeia standards IV, Chinese Pharmacopoeia 2009 and the ACNECA product met basic standards.

- Clinical dose: 0.12g/kg/day.

- Usage: Dissolve ACNECA in distilled or filtered water before drinking.

### 2.2. Subjects - Study locations

#### 2.2.1. Determining the acute toxicity, semi-chronic toxicity and treatment effects of ACNECA on experimental studies

##### 2.2.1.1. Determining the acute toxicity, semi-chronic toxicity

- Determining the acute toxicity: 60 Swiss white mice, both breeds, healthy, weighing  $20 \pm 2$ g provided by the National Institute of Hygiene and Epidemiology.

- Determining the semi-chronic toxicity: 30 Wistar white mice, both breeds, healthy, weighing  $160 \pm 20$ g provided by Dan Phuong - Ha Tay Experimental Animal Supply Center.

- Acute and semi-chronic toxicity studies were conducted at the Department of Pharmacology at Hanoi Medical University from March to August 2016.

#### *2.2.1.2. Effects in the treating acne*

- Antibacterial effects: Cutibacterium acnes ATCC 6919 strains (*C.acnes*), *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (*S. epidermidis*) manufactured by Microbiologics - USA (American Type Culture Collection) with ATCC certification. Bacteria are cultured and tested at the Department of Microbiology - National Institute of Hygiene and Epidemiology in February 2019.

- Anti-inflammatory effects on mice edema model: 80 Swiss white mice, healthy, both breeds, weighing  $25 \pm 2$ g provided by the National Institute of Hygiene and Epidemiology. The study was conducted at the Department of Pharmacology at Hanoi Medical University at Hanoi Medical in February 2019.

- Treatment effects on animal acne model: 70 Wistar white male healthy mice (from 10 to 12 weeks of age, the weight of 180g - 220g) provided by Dan Phuong - Ha Tay Experimental Animal Supply Center. The study was conducted at the Department of Pharmacology at Hanoi Medical University at Hanoi Medical from July to October 2017.

#### *2.2.2. Assessing the clinical effects of ACNECA in treating moderate acne vulgaris*

- Inclusion criteria for study subjects:
  - + Patients were diagnosed with acne vulgaris, at a moderate level and corresponding to damp heat according to Traditional Medicine
  - + Agreed, voluntarily participated in the study
  - + Patients  $\geq 15$  years (if 15 - 18 years old must have the consent of a parent or guardian)
- Exclusion criteria:
  - + Women who were pregnant or breastfeeding
  - + Allergy to any component of the drug
  - + Severe impairment of liver and kidney function, dyslipidemia.
  - + Not following the treatment course
- The study was conducted at the National Hospital of Dermatology and the National Hospital of Traditional Medicine from March 2018 to February 2019.

### **2.3. Methods**

#### *2.3.1. Determining the acute toxicity, semi-chronic toxicity and treatment effects of ACNECA on experimental studies*

##### *2.3.1.1. Determining the acute toxicity, semi-chronic toxicity*

###### *❖ Determining the acute toxicity*

Determining acute toxicity of ACNECA was conducted by Litchfield - Wilcoxon method.

Sixty white mice were fasted overnight, divided into 6 different lots, each lot included 10 mice. Mice were fed ACNECA with increasing doses with a curved needle, drinking 0.2ml/10g/day to determine the lowest dose that caused 100% of deaths and the highest dose did not cause death.

Monitoring indicators included mice general condition, signs of intoxication (such as vomiting, seizures, agitation, excretion, etc.) and the number of mice that died within 72 hours after taking ACNECA. All dead mice were operated to evaluate their gross injury. The linear graph was developed to determine the LD50 of reagents. Live mice were followed up until the 14th day after taking the reagent.

#### ❖ **Determining the semi-chronic toxicity**

Determining the semi-chronic toxicity is performed according to the World Health Organization guidelines. Thirty Wistar white mice were randomly divided into 3 lots:

- Lot 1 (Biological control) n = 10: Drink distilled water 1ml/100g/day.
- Lot 2 (ACNECA dose 0.72 g/kg/day) n = 10: Taking ACNECA with the dose of 0.72g/kg/day, equivalent to clinical dose, calculated by a factor of 6, taking 1ml/100g/day.
- Lot 3 (ACNECA dose 2.16 g/kg/day) n = 10: Taking ACNECA with a dose of 2.16 g/kg/day, equivalent to 3 times the clinical dose, calculated by a factor of 6, take 1ml/100g/day.

Mice were drunk distilled water or ACNECA for 90 consecutive days, once a day in the morning.

Monitoring indicators before and during the study include:

- The general condition and weight of the mice
- Hematopoietic function through the number of red blood cells, the amount of hemoglobin, hematocrit, the average volume of red blood cells, the number of white blood cells, the formula of white blood cells and the number of platelets.
- Indicators assess liver function by quantifying ALT and AST enzyme activity in blood.
- Indicators evaluating renal function through quantification of serum creatinine concentration.
- Histopathology includes general images of all organs and microscopic structures of the liver and kidney.

The above indicators were checked at the time after 30 days, after 60 days and after 90 days of drinking distilled water or medications. Particularly, histopathological indicators were assessed after 90 days of taking the medications. The mice were then operated on to observe the entire organ and randomly examine the liver and kidney microstructures of 30% of the mice in each lot.

#### **2.3.1.2. Effects in the treating acne**

❖ **Antibacterial effects**

- Principle: Strains of bacteria were cultured on plates of Brucella HK agar with different concentrations of reagents. The minimum inhibitory concentration (MIC) is determined on the plate of bacteria where the colonies change morphology (colony size) and/or a significant decrease in density. The minimal bactericidal concentration (MBC) is determined in the medium of the environment at which bacteria are completely destroyed (without germs).

❖ **Anti-inflammatory effects on mice edema model**

The anti-inflammatory effect was investigated on acute and subacute inflammation of croton oil in white mice ears following the Andre Barbosa model of 2017.

- Acute anti-inflammatory effects

The white mice were randomly divided into 4 groups of 10 mice, which were modeled with edema and given the following medications:

+ Lot 1 (Model) n = 10: Modeled by applying 20 $\mu$ L of mixed croton oil to the right ear, drinking distilled water of 0.2mL/10g.

+ Lot 2 (Positive control) n = 10: Modeled by applying 20 $\mu$ L of croton oil mixed to the right ear and taking methylprednisolone at a dose of 6 mg/kg/day, taking 0.2mL/10g.

+ Lot 3 (ACNECA dose of 1.44g /kg /day) n = 10: Modeled by applying 20 $\mu$ L of croton oil mixed to the right ear and taking ACNECA at 1.44g/kg/day (clinically equivalent dose, calculated on a factor of 12), taking 0.2 mL/10 g.

+ Lot 4 (ACNECA dose 4.32g/kg/day) n = 10: Modeled by applying 20 $\mu$ L of mixed croton oil to the right ear and taking ACNECA at 4.32g/kg/day (3 times clinically dose, calculated by the factor of 12), taking 0.2mL/10g.

In all mice, the left ears were not modeled (without applying croton).

Before modeling, measuring the thickness of the right ear thickness in all lots. After applying 20 $\mu$ L of croton oil mixed in acetone to the two sides of the right ear, giving medication for mice after 1 hour of applying croton to mice. After 6 hours, measuring the thickness of the right ear, taking the skin organization in the center of the ears with a diameter of 7 mm with a biopsy device to measure the weight.

- Subacute anti-inflammatory effects

The white mice were randomly divided into 4 groups of 10 mice, which were modeled with edema and given the following medications:

- Lot 1 (Model) n = 10: Modeled by applying 20  $\mu$ L of mixed croton solution to the right ear on days 1, 3, 5, 7 and drinking distilled water of 0.2mL/10g/day.

- Lot 2 (Positive control) n = 10: Applied 20  $\mu$ L of croton oil solution to the right ear on days 1, 3, 5, 7 and taking methylprednisolone at a dose of 6 mg/kg, drinking 0.2mL/10g on days 5, 6, 7, 8.



- Lot 3 (ACNECA dose of 1.44 g/kg/day) n = 10: Applied 20  $\mu$ L of croton oil solution to the right ear on days 1, 3, 5, 7 and taking ACNECA dose of 1.44 g/kg/day (clinically equivalent dose, calculated by a factor of 12), drinking 0.2 mL/10 g on days 5, 6, 7 and 8.

- Lot 4 (ACNECA dose of 4.32 g/kg/day) n = 10: Applied 20  $\mu$ L croton oil solution to the right ear on days 1, 3, 5, 7 and taking ACNECA dose 4.32 g/kg/day (triple clinical dose, calculated on a factor of 12), drinking 0.2 mL /10g on days 5, 6, 7, 8.

In all lots of mice, the left ears were not modeled (without applying croton oil). Measuring the thickness of the right ear in all lots at the time before conducting the study and continuously for the next day. On the ninth day of the study, the thickness measurements of the right ear were taken, taking the ear organ in the center of both ears with a diameter of 7 mm using a biopsy device to measure weight.

Indicators for monitoring and evaluating acute and subacute anti-inflammatory effects include the thickness of ear, the weight of ear, the percentage change in ear thickness, the percentage change in the weight of ear, degree of inhibition inflammation.

#### ❖ **Treatment effects on animal acne model**

Modeling acne by bacteria *C. acnes* in white rats, which was conducted according to the study by Pandey Chetana et al. in 2012. Dividing 70 Wistar white male rats into 2 groups:

+ Biological control group of 15 rats: injected once under the skin of the ear the diluted solution with PBS bacteria, injected 20  $\mu$ l /1 ear.

+ Model group of 55 rats: injected once under the skin of ears *C. acnes* the diluted solution with PBS reaches  $10^8$  bacteria/ml, injecting 20  $\mu$ l/1 ear.

Observing daily changes around the injection site and measuring the thickness of ear in both groups. On the 6th day, randomly selected each group of 5 rats to take the samples with a size of 3 x 3 mm around the injection site on the ears of the rats for pathology (HE dye). Evaluating whether the change of histopathological lesions in mice ear was similar to those of human acne histopathology to confirm that the acne models were created successfully.

After creating acne model, rats in the biological control group were put into group 1, mice in the model group were divided into 5 groups from 2 to 6, each group of 10 rats.

+ Group 1 (Biological control) n = 10: injected PBS, drinking distilled water 1ml /100g/day.

+ Group 2 (Model) n = 10: injected *C. acnes*, drinking distilled water 1ml/100g/day.

+ Group 3 (Positive control 1) n = 10: injected *C. acnes*, taking isotretinoin with dose of 3 mg/kg/day, equivalent to taking 1ml/100g/day.

+ Group 4 (Positive control 2) n = 10: injected *C. acnes*, taking Doxycycline at a dose of 12 mg/kg/day, equivalent to taking 1ml/100g/day.

+ Group 5 (ACNECA dose of 0.72g/kg/day) n = 10: injected *C. acnes*, taking ACNECA at 0.72g/kg/day (dose equivalent to the expected clinical dose, calculated by a factor of 6), equivalent to taking 1ml/100g/day.

+ Group 6 (ACNECA dose of 2.16g/kg/day) n = 10: injected *C. acnes*, taking ACNECA at a dose of 2.16g/kg/day (triple the expected clinical dose, calculated by a factor of 6), equivalent to taking 1ml /100g/day.

Observing daily changes around the injection site, and measuring the thickness of ear in all 6 groups at the time after  $T_0$  (not yet taking the drug),  $T_1$  (after 1 week of taking the drug),  $T_2$  (after 2 weeks of taking the drug) ,  $T_3$  (after 3 weeks of taking the drug). At the time of  $T_3$ , take the samples with a size of 3 x 3 mm around the injection site on the ears of the rats for pathology (HE dye), evaluating the change of histopathological lesion of model group, the control group, the ACNECA groups compared to the biological control group.

Evaluating treatment effects on animal acne model through the thickness of rat ear, and the extent of the histopathological lesion.

### **2.3.2. Assessing the clinical effects of ACNECA in treating moderate acne vulgaris**

❖ *Study design*: Randomized control trial.

❖ *Sample size*: The sample size is calculated using the formula for clinical intervention:

$$n_1 = n_2 = Z^2(\alpha, \beta) \times \frac{2 \times p \times q}{(p_1 - p_2)^2}$$

❖ *Sampling*: 100 patients were drawn with even and odd numbers, then divided into two groups:

The patients with the odd number were enrolled in the intervention group,  $n_1 = 50$ .

The patients with the even numbers were enrolled in the control group,  $n_2 = 50$ .

❖ *Treatment regimen*

The intervention group was taking ACNECA with a dose of 0.12g/kg/day. Dissolving one - package of ACNECA 6 gram in 300ml filtered water before drinking, taking either before, middle or after the meal.

The control group was taking isotretinoin with an oral dose of 0.5 mg/kg/day, taking once time after dinner.

The patients with the odd number were enrolled in the intervention group,  $n_1 = 50$ , taking ACNECA with a dose of 0.12g/kg/day. Dissolving ACNECA in filtered water before drinking.

❖ *Data collection*: Collecting data according to a standard medical record, through physical examination to determine position, quantity, categorization according to traditional medicine, level of lesion before treatment (T0), monitoring and assessing effects, adverse events after 30 days of treatment (T30), after 60 days of treatment (T60). Conducting tests for liver function tests (AST, ALT), kidney function (urea, creatinine), blood lipid (triglycerides, cholesterol), blood counts before treatment (T0) and after 60 days of treatment (T60).

❖ *Criteria of observation and evaluation for the treatment effects on patients, including*:

* Number of the lesion	* Level of the lesion according to Jerry KL Tan – 2008
* Level of treatment effects	* Dermatological quality of life index (DLQI)
* Status of traditional medicine	* Clinical adverse event
* Level of satisfaction	* Adverse event on laboratory test results

#### 2.4. Data analysis

-Data entry: Excel and Epidata 3.1.

-Data analysis by software SPSS 18 and STATA 12.

-Qualitative data were expressed as frequency and percentage, and quantitative data were presented as mean and standard deviation ( $\bar{X} \pm SD$ ). The difference and correlation between variables were tested by statistical tests  $\chi^2$ , Fisher-exact test (qualitative variables), Student t-test (quantitative variables). The difference was considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

#### 2.5. Ethical consideration

- ACNECA was tested and met the standards. It was approved for doing this study by the Medical Ethics Council of Hanoi Medical University under Decision No. 187 / HDHYHN, dated February 20, 2016.

- The National Hospital of Dermatology and the National Hospital of Traditional Medicine agreed to study of the ACNECA product.

- Patients were consulted and voluntarily participated in the study.

- The patient's personal information was kept confidential.

- Patients who refused to participate in the study were still consulted and treated thoughtfully.

- For cases that did not respond to the study drug, they were changed to another appropriate treatment.

### CHAPTER 3: RESULTS

#### 3.1. Determining the acute toxicity, semi-chronic toxicity and treatment effects of ACNECA on experimental studies.

##### 3.1.1 Determining the toxicity

+ Determining the acute toxicity: The maximum tolerated dose was 75 g of dissolving nuggets/kg on mice, which was 52 times higher than the expected clinical dose in humans, but there was no dead mice, no manifestation of toxicity (vomiting, convulsions, excretion,...), the general condition of normal rats. Thus, no acute toxicity was determined in experimental mice.

+ Determining the semi-chronic toxicity: ACNECA at a dose of 0.72 g/kg/day and the dose of 2.16 g/kg/day (equivalent to triple human dose, calculated on the basis of a factor of 6), the rats absorbed well, without affecting on the rats in terms of overall condition, weight, hematopoietic function, liver function, kidney function, kidney structure, liver structure on both macroscopic and microscopic. Thus, the semi-chronic toxicity of ACNECA was not determined at a dose of 0.72 g/kg/day and a dose of 2.16 g/kg/day when white rats were given drugs continuously for 90 days.

### **3.1.2. Effects in the treating acne**

#### **3.1.2.1. Antibacterial effects**

ACNECA had the effect of inhibiting 3 strains of *C. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*. The MIC (MBC) of ACNECA with *S. aureus*, *S. Epidermidis* were 1.068 (8.5) mg/ml, and for *C. acnes* was 0.534 (4.272) mg/ml.

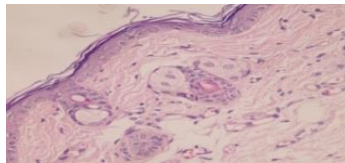
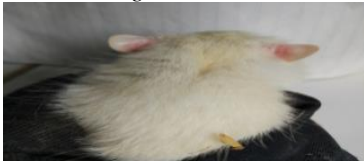
#### **3.1.2.2. Anti-inflammatory effects on mice edema model**

On the acute inflammatory model, after 6 hours applying croton, the thickness of the mice right ear in lot 1 (drinking distilled water) was  $33.40 \pm 3.53$ , it increased significantly as compared to that before applying  $22.20 \pm 3.10$  ( $p < 0.001$ ). Mice in Lot 2 took methylprednisolone 6mg/kg/day, the thickness of mice right ear was  $26.40 \pm 1.78$ , and the percentage of change in the thickness of the mice right ear was  $23.13 \pm 9.29$ , which decreased significantly compared to the lot 1 ( $p_{2-1} < 0.001$ ). In lots of mice taking ACNECA with high doses of 4.32g/kg/day and low doses of 1.44g/kg/day had the thickness of mice ear were  $27.60 \pm 3.03$  and  $27.7 \pm 1.89$ , with the percentage of changes in the thickness of mice right ear was  $24.61 \pm 11.88$  and  $23.44 \pm 6.39$ . They all significantly reduced as compared to the model of drinking distilled water with the thickness of mice right ear as  $33.40 \pm 3.53$ , the percentage of change on the thickness of the mice right ear was  $53.19 \pm 26.441$  ( $p < 0.01$ ), of which, the decrease was equivalent to the dose of methylprednisolone as 6 mg/kg/day ( $p > 0.05$ ). The weight of the mice right ear mass in the model lot was  $31.35 \pm 5.38$ , which increased significantly as compared to the mice left ear of  $21.70 \pm 3.17$  ( $p < 0.05$ ), while the weight of the mice right ear and the percentage of change in the weight of the mice right ear in lot taking methylprednisolone and lot taking two doses of ACNECA decreased significantly as compared to the model lot ( $p < 0.05$ ), the decrease in the lot taking two doses of ACNECA was equal to the lot

taking methylprednisolone ( $p > 0.05$ ). The level of anti-inflammatory of methylprednisolone was 49.64%, the low-dose of ACNECA was 43.42% and the high-dose ACNECA was 46.74%. On the subacute inflammatory model, after 9 days when applying croton, the thickness of mice right ear between lot at the time (N1) before applying croton did not differ significantly ( $p > 0.05$ ). On the ninth day of the study (N9), Lot 2 took methylprednisolone 6 mg/kg/day and Lot 4 took ACNECA at 4.32 g/kg/day that significantly decreased as compared to Lot 1 drinking the distilled water model ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ ), and Lot 3 taking ACNECA with dose of 1.44 g/kg/day tended to reduce the thickness of mice right ear; however the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). The weight of the mice right ear in the model lot was  $28.79 \pm 5.69$ , which increased significantly as compared to the weight of the mice left ear which was  $13.88 \pm 1.74$  ( $p < 0.05$ ). The weight of the mice right ear and the percentage of change in the weight of the mice right ear in the lot taking methylprednisolone ( $22.05 \pm 4.79$  and  $63.36 \pm 24.11$ ) and lot taking ACNECA with high dose 4.32g/kg/day ( $23.18 \pm 5.24$  and  $76.89 \pm 26.10$ ) were significantly reduced as compared to the model lot ( $p < 0.05$ ), there was no difference between the two lots ( $p_{4-2} > 0.05$ ). The level of inflammatory inhibition of Lot taking methylprednisolone was 31.93%, Lot taking ACNECA with a high dose was 14.17%. In the Lot with a low dose, the dose of 1.44g/kg/day had 6.03% of anti-inflammatory, the weight of mice right ear and the percentage of change on the weight of decreased as compared to the model Lot, but the difference was not statistically significant ( $p_{3-1} > 0.05$ ).

### 3.1.2.3. Treatment effects on animal acne model

#### ❖ Creating animal acne model

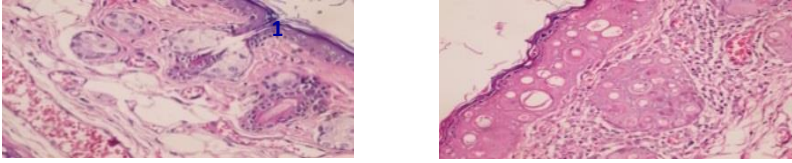


**Image 3.1. Image of macroscopic and microscopic of the mice ear after 6 days with injecting PBS**

*Note: The epidermis and sebaceous gland and surrounding tissues were normal (HE  $\times 400$ )*



**Image 3.2. Image of macroscopic of the mice ears after 6 days with injecting *C. acnes***



**Image 3.3. Image of microscopic of the mice ears after 6 days with injecting *C. acnes* (HE  $\times 400$ )**

**Note:** 1 - Keratosis and clogged hair follicles; 2- The epidermal overproduction; 3- Intracellular edema in the epidermis; 4- Increase the size and degeneration of sebaceous glands; 5- Infiltrating inflammatory cells; 6 - Blood congestion

**Comments:** Histopathological results on the white rat ears after injection of *P. acnes/C.acnes* is similar to histopathological lesions of acne in humans: increase the size of sebaceous glands sebaceous, thickening of epidermal surface and hair follicles, intracellular edema, invading major inflammatory cells, congestion, possibly having an abscess

❖ *Assess treatment effects on animal acne model on the thickness of mice ear*  
*Table 3.1. The treatment effects of ACNECA on the thickness of mice ear*

Lot of mice	The thickness of mice ear ( $\bar{X} \pm SD, 10^{-1}\text{mm}$ )			
	Before intervention (T <sub>0</sub> )	After 1 week (T <sub>1</sub> )	After 2 week (T <sub>2</sub> )	After 3 week (T <sub>3</sub> )
<b>Lot 1:</b> Biological control (distilled water) (n=10)	28.40 $\pm$ 0.97	28.70 $\pm$ 1.16	28.80 $\pm$ 0.63	29.10 $\pm$ 0.74
<b>Lot 2:</b> Model (distilled water) (n=10)	39.60 $\pm$ 3.13***	37.30 $\pm$ 2.11***	36.30 $\pm$ 1.06***	35.10 $\pm$ 1.97***
% change as compared to T <sub>0</sub>		↓ 5.45%	↓ 7.95%	↓ 11.11%
<b>Lot 3:</b> Isotretinoin with dose of 3mg/kg/day (n=10)	39.80 $\pm$ 3.82***	32.60 $\pm$ 2.55***	31.30 $\pm$ 1.49***	30.20 $\pm$ 1.23***
% change as compared to T <sub>0</sub>		↓ 17.71%	↓ 20.85%	↓ 23.67%
<b>Lot 4:</b> Doxycyclin with dose of 12 mg/kg/day (n=10)	39.90 $\pm$ 3.21***	31.20 $\pm$ 2.20***	29.60 $\pm$ 1.71*** p <sub>4+1</sub> > 0.05	29.00 $\pm$ 1.25*** p <sub>4+1</sub> > 0.05
% change as compared to T <sub>0</sub>		↓ 21.65%	↓ 25.56%	↓ 27.01%
<b>Lot 5:</b> ACNECA with dose of 0.72g/kg/day (n=10)	39.50 $\pm$ 2.72***	33.30 $\pm$ 2.00***	32.50 $\pm$ 2.46***	31.20 $\pm$ 1.87***
% change as compared to T <sub>0</sub>		↓ 15.49%	↓ 17.62%	↓ 20.88%

Lot of mice	The thickness of mice ear ( $\bar{X} \pm SD, 10^{-1}\text{mm}$ )			
	Before intervention (T <sub>0</sub> )	After 1 week (T <sub>1</sub> )	After 2 week (T <sub>2</sub> )	After 3 week (T <sub>3</sub> )
Lot 6: ACNECA with dose of 2.16g/kg/day (n=10)	39.70 ± 2.26***	32.30 ± 2.11+++	30.60 ± 1.65+++	29.90 ± 1.37+++ p <sub>6-1</sub> > 0.05
% change as compared to T <sub>0</sub>		↓ 18.45%	↓ 22.71%	↓ 24.45%

(*T*-test student)

Comparing to the lot of biological control: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001

Compareing to the lot of model: +p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001

**Comments:** After 3 weeks of treatment, the average thickness of mice ear in Lot taking ACNECA with dose of 0.72g/kg/day, Lot taking ACNECA with dose of 2.16g/kg/day, Lot taking Isotretinoin with dose of 3mg/kg/day, and Lot taking Doxycyclin with dose of 12mg/kg/day decreased significantly as compared to thickness of mice ear in Lot of model (p <0.001), there was no difference when comparing the average thickness of mice ear between Lots taking treatment medications (p > 0.05). After 3 weeks of treatment (T<sub>3</sub>), the average thickness of mice ear in Lot taking Doxycycline with a dose of 12mg/kg/day and Lot taking ACNECA with a dose of 2.16g/kg/day did not differ as compared to Lot of biological control (p > 0.05). Thus, Lot taking Doxycycline with a dose of 12mg/kg/day and Lot taking ACNECA with a dose of 2.16g/kg/day recovered the lesion of acne after 3 weeks of treatment.

- Level of histopathological lesion:

The level of the histopathological lesion intracellular edema, escaping cells in Lot taking ACNECA dose 0,72g/kg/day improved significantly as compared to the Lot model drinking distilled water (p <0.05). The Lot taking ACNECA with dose of 2,16g/kg/day not only improved significantly in the level of the histopathological lesion intracellular edema, escaping cells also improving obstruction of sebaceous follicles as compared to the Lot model drinking distilled water (p <0.05). The Lot taking ACNECA with dose of 0.72g kg/day and dose of 2.16g/kg/day had improved the level of the histopathological lesion hyperkeratinization, sebaceous gland, inflammatory cells similar, congestion as compared to the Lot model drinking distilled water but no significant difference (p >0.05). The level of the histopathological lesion of the Lot taking ACNECA with dose of 0.72g kg/day and dose of 2.16g/kg/day had not significantly different from Lot taking Isotretinoin with dose of 3mg/kg/day and Lot taking Doxycycline with dose of 12mg/kg/day (p > 0.05).

### 3.2. Clinical effects of ACNECA on treating moderate acne vulgaris

#### 3.2.1. General characteristics of study patients

The factors of sex, age group, time of getting acne, favorable factors for acne, the number of lesions before the intervention in the intervention group and

the control group did not differ significantly ( $p > 0.05$ ,  $\chi^2$ ). This showed that the intervention and control groups had similarities to compare treatment effects.

### 3.2.2. Clinical effects of human

#### ❖ Number of basic lesions after 30 and 60 days of treatment

Evaluation of treatment results after 30 days and 60 days of treatment in each intervention group and control group, the number of basic lesions and the total number of lesions decreased as compared to that before treatment ( $35,72 \pm 18,20$  compared to  $32,96 \pm 16,76$ ), the difference was statistical significance ( $p < 0.05$ , T-test Student). Comparing the treatment results after 30 days between the intervention and control groups, the total number of lesions in the control group was much lower than in the control group, but the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ , Student t-test). Comparing the 60-day treatment results between the intervention and control groups, the total number of lesions in the control group decreased more than in the study group ( $11.24 \pm 9,59$  compared to  $19.74 \pm 15.56$ ) and the difference was statistically significant ( $p < 0.05$ , T-test Student).

Table 3.2. Evaluating the level of treatment effects after 30 and 60 days of treatment

Level of effect	Intervention group (n=50)				Control group (n=50)				p (Fisher exact test)
	After 30 days		After 60 days		After 30 days		After 60 days		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Good	0	0.0	11	22.0	0	0.0	24	48.0	$p_1 > 0.05$
Fair	13	26.0	20	40.0	17	34.0	20	40.0	
Moderate	33	66.0	19	38.0	33	66.0	6	12.0	$p_2 < 0.01$
Poor	4	8.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
Total	50	100.0	50	100.0	50	100.0	50	100.0	

**Comments:** After 30 days of treatment, it was showed that the level of treatment effect between the intervention and control groups did not differ significantly ( $p_1 > 0.05$ ). After 60 days, the control group had a better level of treatment effect than the intervention group, the difference was statistically significant ( $p_2 < 0.01$ ).

Table 3.3. Level of acne lesions by Jerry KL Tan -2008

Level of lesion	T0 ( $\bar{X} \pm SD$ , score)	T30 ( $\bar{X} \pm SD$ , score)	T60 ( $\bar{X} \pm SD$ , score)	P <sub>0-30</sub>	P <sub>0-60</sub>
<b>Intervention group (n=50)</b>	$1.98 \pm 0.14$	$1.58 \pm 0.50$	$1.18 \pm 0.56$	$< 0.001$	$< 0.001$
<b>Control group (n=50)</b>	$2.06 \pm 0.24$	$1.64 \pm 0.56$	$1.1 \pm 0.30$	$< 0.001$	$< 0.001$
<b>P</b>	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$		

(Student t-test)

**Comments:** At the time of T30 and T60, both the intervention and control groups reduced the level of an acne lesion as compared to the time before taking medication ( $p < 0.001$ ). When comparing the level of acne lesions between the intervention and the control at the time of T30, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ), at the time of T60, the acne lesions of the control



group decreased more than that in the intervention group ( $p < 0.001$ ).

Table 3.4. Criteria to monitor the status of traditional medicine

Status	$(\bar{X} \pm SD, \text{score})$				$p_1$	$p_2$
	Intervention group (n=50)		Control group (n=50)			
	T0	T60	T0	T60		
The form of lesion	2.96±0.20	1.62±0.92	2.90±0.46	1.28±0.83	>0.05	>0.05
$p_{0-60}$	p<0.001		p<0.001			
Countenance	0.78±0.42	0.54±0.50	0.80±0.4	0.40±0.49	>0.05	>0.05
$p_{0-60}$	p<0.05		p<0.001			
Itching	0.48±0.50	0.28±0.45	0.68±0.47	0.50±0.51	<0.05	<0.05
$p_{0-60}$	p<0.05		<b>p&gt;0.05</b>			
Pain	0.64±0.52	0.18±0.40	0.68±0.47	0.18±0.39	>0.05	>0.05
$p_{0-60}$	p<0.001		p<0.001			
Constipation	1.12±0.66	0.02±0.14	1.20±0.73	1.12±0.70	>0.05	<0.001
$p_{0-60}$	p<0.001		p>0.05			
Yellow urine	0.76±0.72	0.04±0.20	0.60±0.64	0.58±0.64	>0.05	<0.001
$p_{0-60}$	p<0.001		<b>p&gt;0.05</b>			
Dry mouth	1.56±0.79	0.06±0.24	0.70±0.81	1.36±0.90	<0.001	<0.001
$p_{0-60}$	p<0.001		p<0.001			
Halitosis	0.98±0.79	0.08±0.27	0.84±0.82	0.82±0.80	>0.05	<0.001
$p_{0-60}$	p<0.001		<b>p&gt;0.05</b>			
Total scores	9.14±2.51	2.86±1.59	8.58±2.35	6.18±2.15	>0.05	<0.001
$p_{0-60}$	p<0.001		p<0.001			

(Student t-test),  $p_1$  (before treatment of two groups);  $p_2$  (after treatment of two groups)

**Comments:** Assessing indicators of traditional medicine status, all indicators of traditional medicine status in the intervention group decreased as compared to that before the intervention with a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). Whereas in the control group after treatment, the condition of dry mouth was worse than that before treatment ( $p < 0.001$ ); indicators of itching, constipation, yellow urine, halitosis did not improve as compared to the time before the study ( $p > 0.05$ ), the status of lesions, facial color, pain improved more as compared to that before treatment ( $p < 0.001$ ). The intervention group improved the overall traditional medicine status better than that in the control group ( $p < 0.001$ ).

Table 3.5. Assessment of the Dermatology Life Quality Index (DLQI)

Group	T0	T60	P
	$(\bar{X} \pm SD, \text{score})$	$(\bar{X} \pm SD, \text{score})$	
<b>Intervention group (n=50)</b>	10.06 ± 4.11	2.98 ± 3.98	p<0.001
<b>Control group (n=50)</b>	10.26 ± 3.49	1.32 ± 2.27	p<0.001
p	p>0.05	p<0.05	

(Student t-test)

**Comments:** The analysis of the table shows that patients in both groups had a decrease in the quality of life after treatment as compared to that before treatment ( $p < 0.001$ ). Besides, in the intervention group, the average quality of

life index was higher than that in the control group, indicating that the control group improved the quality of life better than the intervention group ( $p < 0.05$ ).

*Table 3.6. Assess the level of patient satisfaction*

Level	Intervention group (n=50)				Control group (n=50)				P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	After 30 days		After 60 days		After 30 days		After 60 days			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
<b>Normal</b>	42	84.0	41	82.0	44	88.0	44	88.0	>0.05	>0.05
<b>Satisfaction</b>	8	16.0	9	18.0	5	10.0	5	10.0		
<b>No satisfaction</b>	0	0.0	0	0.0	1	2.0	1	2.0		
<b>n</b>	50	100.0	50	100.0	50	100.0	50	100.0		

(Fisher exact test)

**Comments:** Satisfaction after treatment in the intervention groups and control groups at 30 and 60 days after treatment did not differ statistically ( $p > 0.05$ ).

### 3.3. Adverse effects

#### ❖ *Clinical adverse effects*

After 30 days of treatment and after 60 days of treatment, the intervention did not see any adverse effects. After 30 days of treatment, the control group showed clinically adverse effects with symptoms of 100% of dry lips, 48% of dry mouth, 15% of skin desquamation, 8% of conjunctivitis, 5% of arthralgia, 2% of hair loss. After 60 days of treatment, the control group appeared clinically adverse effects with 43% of dry lips, 40% of dry mouth, 16% of skin desquamation, 8% of conjunctivitis, 7% of arthralgia, 2% of hair loss. Thus, the control group had more unwanted effects than the study group ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ ).

#### ❖ *Adverse effects on laboratory tests*

The majority of blood biochemical values, the hematological value of the intervention group, the control group before and after treatment did not differ significantly ( $p > 0.05$ ). The creatinine, ALT, and platelets of the control group at the time of T0 and T60 had statistically significant differences as compared to that in the intervention group ( $p < 0.05$ ), but the values were still within the normal limits.

## CHAPTER 4: DISCUSSION

### 4.1. The acute toxicity, semi-chronic toxicity and treatment effects of ACNECA on experimental studies

#### 4.1.1. The acute toxicity, semi-chronic toxicity

ACNECA is a new remedy that has not been studied, and it was formulated in the form of soluble nugget, so it is necessary to determine the acute toxicity and lethal dose of 50% of experimental animals to assess the level of toxicity. It would be the basis for selecting test dose effects for further studies. The result of the study to determine the acute toxicity showed that ACNECA did not present acute toxicity in white mice at the maximum dose that mice could drink, and the tolerated dose was 75g/kg on mice, it was 52 times higher than the expected dose on humans.

As acne is a chronic skin disease, it requires long-term treatment. Therefore, the study of ACNECA semi-chronic toxicity is necessary to

recommend the duration of use in patients. The test dose in the semi-chronic toxicity study was calculated from the clinically expected dose of 0.12g/kg/day and was converted to an equivalent dose in white mice by a factor of 6. Therefore, the semi-chronic toxicity study was performed at a dose of 0.72g/kg/day (equivalent to a clinical dose) and a dose of 2.16 g/kg/day (triple the clinical dose). The test was conducted in parallel with a Lot of biological controls drinking distilled water, with the number of mice equal to the number of mice used in the reagent group (n = 10 mice). As a result, it was not determined the semi-chronic toxicity of ACNECA at a dose of 0.72g/kg/day and a dose of 2.16 g/kg/day when the mice were taken ACNECA continuously for 90 days.

The results of the study did not identify the acute and semi-chronic toxicity of ACNECA, which was consistent with the study results of each element that constituted ACNECA preparations. In the medical literature, all 14 medicinal herbs in ACNECA were not toxic, and they were regularly clinically prescribed by physicians. They also showed no signs of toxication, so it was consistent with the long-term therapeutic properties of acne, providing the basis for data for effective and efficacy of ACNECA in the experiment as well as in clinical.

#### **4.1.2. Effects on experiments**

##### **4.1.2.1. Antibacterial effects**

In addition to the role of *P. acnes/C. acnes*, the growth of other bacteria in hair follicles and sebaceous glands, such as *S. aureus* and *S. epidermidis*, also plays a role in the development of acne. Recent studies indicated that acne could be a result of an imbalance in the skin microflora. Therefore, the thesis studied the effect of ACNECA on three common bacterial strains in acne pathology, including *C. acnes*, *S. aureus*, and *S. Epidermidis*.

Antibacterial effect of ACNECA on *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *C.acnes* was thanks to a combination of some herbs. Phenolic acid, glycoside, flavonoid and volatile oil in *Flos Lonicera*, *Herba Lactucae indicae*, *Fructus Forsythiae suspensae* had the effect of inhibiting many bacteria with different levels.

##### **4.1.2.2. Anti-inflammatory effects on mice edema model**

There are two phenomena that always occur in most stages of the pathogenesis of acne, even when there are no clinical lesions, that is the acne microbe and the inflammatory process. Therefore, anti-inflammatory drugs used to treat acne may work in all stages of the lesion. So, does ACNECA have anti-inflammatory effects? To answer this question, the thesis conducted a model of acute and subacute inflammation by applying 20µl of croton oil on both sides of the mice right ear according to the model of Andre Barbosa in 2017. The mechanism of inflammation of croton oil due to active 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and phorbol esters highly irritating on the skin, increasing the activity of Phospholipase A2 (PLA2), leading to increased arachidonic acid production and then factors involved in inflammatory processes such as leukotriene (LTC4, LTD4) and prostaglandin E2. The skin-stimulating mechanism of croton oil is also involved in the activation of two enzymes: Cyclooxygenase (COX) and Lipoxygenase (LOX).

The anti-inflammatory effect of ACNECA on the mice edema model by

croton oil due to the glycoside active ingredients in *Flos Lonicera*, *Fructus Forsythiae suspensae* that inhibits the synthesis and releases of inflammatory factors, reduces the activity of proteinase enzymes as well as the expression of molecules involved in the immune response. The study of Yulie showed that the polyphenols contained in *Flos Lonicera* reduced inflammatory mediators. In vitro, the forsythoside A component of the *Fructus Forsythiae* extract had the effect of inhibiting the enzyme 5-lipoxygenase (LOX), cyclooxygenase (COX-1, COX-2) and elastase, inhibiting the cytokine secretion of endothelial cells thereby reducing inflammatory responses.

The anti-inflammatory effects of ACNECA have only been evaluated in animal models by the weight of mice and the thickness of mice ear, it is necessary to evaluate at the molecular level whether ACNECA can reduce IL-1 $\alpha$  or not by the ELISA method or immunohistochemistry. In 2018, Li Si Qi studied the remedy of qing cuo fang, which has an anti-inflammatory effect by measuring the concentration of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  by the ELISA method. After 30 days of taking the reagent, the levels of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  in three doses of qing cuo fang and spironolactone were much lower than those in the control group ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.2.3. Treatment effects on animal acne model

##### ❖ *The treatment effects of ACNECA on the thickness of mice ear*

The thickness of the mice ear is an inflammatory response of mice ears to *P. acnes/C. acnes*, the strongest inflammatory response on the 6th day after injection, gradually decreased to normal within 20 days, could persist until day 35. The study results showed that ACNECA with a dose of 0.72g /kg/day and with a dose of 2.16g/kg/day reduced the thickness of mice ear as compared to the model of drinking distilled water ( $p < 0.05$ ). It was proven that ACNECA had an anti-inflammatory effect on the acne model of injecting *C.acnes* and the anti-inflammatory effects of ACNECA were similar to the anti-inflammatory effects of isotretinoin and doxycycline ( $p < 0.001$ ).

##### ❖ *The treatment effects of ACNECA on the level of the histopathological lesion*

Histological diagnosis is used by clinicians to support the most appropriate diagnosis and clinical interventions. After injecting *C. acnes*, the white rat ear changed the microscopic structure similar to the microscopic structure of acne patients: increase the size of sebaceous glands sebaceous, thickening of epidermal surface and hair follicles, intracellular edema, invading major inflammatory cells, congestion, possibly having an abscess. The thickened epidermal surface and thickening of the hair follicles may be caused by *C.acnes* that increase expression and activation of TLRs (Toll-like receptor) 2 and 4, followed by the release of inflammatory factors IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-12, and TNF- $\alpha$ . Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) increases the keratosis of keratinization of the hair follicles, activates keratin 16-expressing keratinocytes and causes an inflammatory reaction with manifestations of invasive inflammatory cells, congestion, intracellular edema, and possibly having an abscess. Sebaceous glands increase in size and number due to *C.acnes* enhances sebum synthesis in the sebaceous glands through an increased production mechanism of 15-deoxy-

Delta (12,14) -prostaglandin J (2) (15d-PGJ (2), a type of sebum linked to cytochrome P450 (CYP).

ACNECA effectively improved the level of histopathological lesion in animal acne model of *C.acnes*bacteria because ACNECA was made up of anti-inflammatory, antibacterial and anti-inflammatory elements, which resistant to three common bacterial strains causing acne (*C. acnes*, *S. aureus* and *S. Epidermidis*), and it was proven on experimental studies.

Due to limited time and financial resources, the thesis only assessed the effects of ACNECA on the animal acne model caused by *P. acnes/C. acnes*, the effects of antibacterial, the effects of anti-inflammation, but we had not evaluated whether ACNECA was effective in reducing hyperkeratosis, seborrhea or anti-androgenic effects or not. Although the remedy has elements that were studied to prove the effect of anti-androgen: *Fructus Amomi*, *Radix Salviae miltiorrhizae*, *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*, *Radix Scutellariae*. This is also an open direction for further studies to clarify the mechanism of action of ACNECA. In China, Ly Tu Ky in 2018 demonstrated that the qing cuo fang remedy had the effect of reducing the sebaceous gland size of the yellow hamster on the animal acne model.

## **4.2. Clinical effects of ACNECA on treating acne vulgaris**

### **4.2.1. General characteristics of study patients**

Study to evaluate the effects of ACNECA on people using the study design of the clinical randomized controlled trials. The randomized controlled trial requires that the intervention and control groups have similarities in criteria before the intervention. The results showed that most factors of sex, age groups, duration of getting acne, favorable factors for acne, the number of lesions of the intervention and control group did not differ significantly ( $p > 0.05$ ). Both the intervention and control group had acne vulgaris according to modern medicine and acne with low temperature according to traditional medicine. This shows that the intervention group and the control group had similarities to conduct a comparison of treatment effects between the two groups. The similarity between the intervention group and the control group helped evaluate the treatment effect in humans of ACNECA with scientific significance.

### **4.2.2. Clinical effects**

Assessing the clinical effect based on the treatment effect is the effect of reducing or curing the disease. The beneficial effect on health is the effect of increasing the quality of life of the patient. The treatment effect was assessed by counting the number of acne lesions and assessing the effect of ACNECA treatment on the status of traditional medicine. Based on the total number of acne lesions before and after treatment to calculate the level of acne lesions and the degree of treatment effect. The health benefit is assessed by the Dermatological Quality of Life Index and patient satisfaction. Evaluation of treatment results after 30 days and 60 days of treatment in each intervention and

control group, the number of each basic lesion, the total number of lesions decreased compared to before treatment, the difference was statistical significance ( $p < 0.05$ ). Comparing to the treatment results after 30 days between the intervention and control groups, the total number of lesions in the control group was much lower than in the intervention group, but the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). Comparing the 60-day treatment results between the intervention and control groups, the total number of lesions in the control group decreased more than that in the intervention group, the difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). When assessing the effects of treatment based on changes in the number of lesions, it is only possible to assess whether the number of lesions before and after treatment decreases statistically or not, but it did not reflect the level of improvement in treatment effect of each group to compare the treatment effect between intervention and control group. Therefore, the thesis assessed the treatment effect based on the improvement of the treatment effect. Results before the intervention showed that in the intervention group taking ACNECA, the percentage of patients with "Good" effect increased from 0% (T30) to 22% (T60), and the percentage of patients achieving "Fair" effect from 26% (T30) to 40% (T60), the total treatment effect after 30 days was 92.0%, the total treatment effect after 60 days was 100.0% [Table 3.2]. Comparing the treatment effect between the intervention and control group after 60 days, the intervention group had patients with good and fair results of 26% in the intervention group and 34% in the control group, the difference was not statistical significance ( $p > 0.05$ ). After 60 days, the control group had patients with a good and fair treatment effect of 88% higher than that in the intervention group with 62%, the difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ). The results of the thesis were lower than those in the study of Doan Chi Cuong in 2018 using Hoang lian jie du tang for 40 patients with mild and moderate levels of acne vulgaris, dampness heat. After 28 days of treatment, 92.5% achieved the treatment effect, of which no patient achieved good results, 52.5% of patients achieved fair results, 40% of patients achieved moderate results. Perhaps because the subjects in Doan Chi Cuong's study had both mild and moderate levels of acne, the total number of the lesion was  $32.1 \pm 18.1$ , far less than the group drinking ACNECA with a total of 66 lesions as  $32 \pm 25.27$ . The research results of the thesis are higher than those of Tham Tan Long in 2018 using Wu wei xiao du yin combined with vitamin A acid to treat moderate and severe acne in men (heat poison and blood stasis). After 8 weeks of treatment, 100% of patients had treatment effect, of which the good effect was 19.0% lower than that in the study result of the thesis with good effect 22.0% after 60 days, probably due to the patient were men belonging to severe form of heat toxic, blood stasis in the status of traditional medicine. The study results of the thesis were lower than that of Ly Tinh Tinh's study in 2013 using Wu wei xiao du yin for taking and covering to treat 60 patients with the status of dampness heat. After 4 weeks of treatment, 100% of the patients had treatment effect, of which the patient achieved a good result of 71.43% higher than that of the thesis results, probably because Ly Tinh Tinh combined in topical and oral

administration that increased the treatment effects of the remedy.

When evaluating treatment effects based on the extent of the lesion before and after treatment, the control group was the same.

In summary, when evaluating the treatment effect based on the basic acne lesions, after 30 days of treatment, the intervention and control groups had the same treatment effect; after 60 days, the control group had treatment effect better than that in the intervention group. Perhaps the control group taking isotretinoin, which was the effective medicine for all types of acne, especially acne with pustules. It was proven through many clinical studies and thesis using isotretinoin with a dose of 0.5 mg/kg/day, which was an average dose, so its treatment effect was higher than that in the intervention group taking ACNECA. Therefore, it is necessary to conduct clinical trials with more doses to find the optimal dose of ACNECA in clinical practice. Or study combination taking ACNECA and Western topical medicine or Eastern medicine to increase the treatment effect.

In addition to the desire to use the criteria of modern medicine to prove the treatment effect of ACNECA in clinical, the study of the thesis also wants to evaluate the treatment effect of the status in traditional medicine - this is also a new point in the criteria for evaluating the treatment effect for acne by traditional medicine in Vietnam. Most patients as well as physicians are only concerned about acne lesions but have not paid attention to systematic status according to traditional medicine criteria such as heat, rheumatism, stasis in acne, leading to clinical manifestations with constipation, halitosis, painful lesions, itching. In addition to the aesthetic effects of acne, these statuses also affect the patient's quality of life, causing concern for patients. In the intervention group taking ACNECA for treating acne, it was shown that the status of constipation, halitosis improved markedly, making patients very satisfied with the treatment. In the control group taking isotretinoin, it was shown that the status of traditional medicine conditions had little or no improvement, but also adverse effects such as dry lips, desquamation of face skin make patients worried during treatment, although the improvement in the number of clinical acne lesions was very good. The effect that improved itching and blush in the status of traditional medicine can be explained by the fact that in ACNECA, there are *Flos Lonicera*, which has the effect of dispel wind - clear heat - toxicification, the effect of clear heat - toxicification increased when it combined with *Fructus Forsythiae Suspensae*. Therefore, ACNECA can improve the itching and flushing caused by dampness - heat. Halitosis caused by spleen stomach dampness heat also improves accordingly. According to the five phase theory, the kidneys are water, the lung is metal, the kidneys deficiency do not nourish the lung, leading to the yin lung deficiency, yin deficiency creating internal heat, so the acne has a condition of dry mouth, yellow urine. In the face, the main lung and stomach meridians, lung dominate skin and body hair and have exterior - interior relation with large intestine. If the diet is not good, eat too much delicacy, heat accumulate the large intestinal, heat cause bad breath and constipation, heat from the large intestinal to the lung. From there, causing lung stomach blood heat syndrome resulting in

blush, papules, pustules. *Radix Scutellariae* has the effect of eliminating all heat conditions in the lung, *Radix Angelicae sinensis* and *Radix Paeoniae lactiflorae* have the effect of tonifying yin blood, tonifying liver blood, *Radix Ligustri Lucidi*, *Herba Lactucaae indicae*, *Semen Cuscutae* have the effect of tonifying liver kidney, the herbs work together to improve the condition of dry mouth, yellow urine, constipation which is caused by yin deficiency, blood heat aspect. Pus is caused by the blood. Condensed pus means blood and qi sufficiency, dilute pus means blood and qi deficiency. Pain symptom is from blood and qi stagnation, blocked meridians and vessels. Kidney yin insufficiency, blood heat of stomach and spleen for a long time that burns fluid- humor into phlegm, so yin deficiency and no circulation of blood cause pain. The joining up of dampness and blood stasis causes pimples, cysts and scars. *Cortex Paeoniae suffruticosae*, *Radix Salviae miltiorrhizae* has a blood-dissipating, blood-activating, cool blood effect, helping to draw out pus; *Spica Prunellae*, *Herba Lactucaae* has the effect to soften hardness and dissipate blinks, improving pain'syndrome in clinic.

The health effects were assessed by the dermatological quality of life index and patient satisfaction. Acne does not usually have a great effect on health, and it is not dangerous to life, but it affects the aesthetics and psychology of patients. Assessing the impact of acne on the quality of life is necessary to detect patients at risk of being adversely affected so that more appropriate treatments can be selected, avoiding the option that increases the situation, and affecting psychology. It can be used to evaluate the health effects of the treatment method. Treatment improved the DLQI score from  $10.06 \pm 4.11$  to  $2.98 \pm 3.98$  after 60 days of treatment ( $p < 0.001$ ). The study's results were similar to the results of Phan Thi Hoa's study in 2018 evaluating the DLQI scores of 109 acne patients before applying Ba Bet Lun root extract was 11,26 and after treatment was 2.41 ( $p < 0.001$ ). When comparing the improvement in the DLQI of the intervention and the control group after 60 days of treatment, the control group improved better than the intervention group ( $p < 0.05$ ). Because the questionnaire assessing the DLQI only focuses on the degree of influence of the pathological manifestations on the skin (acne manifestations on the skin) of patients on daily activities, to psychology, to work. The improvement in the number of acne lesions in the control group was faster and more than the intervention group, so the DLQI of patients in the control group improved better than the research group. However, when asked about the level of satisfaction with the treatment and the effect, the intervention and control groups were the same. The patients of the intervention group were not only satisfied with the effects of the treatment to improve the number of lesions, easy-to-use preparations, but also satisfaction with the improvement of traditional medicine status such as dry mouth, constipation, bad breath, yellow, itchy urine. While in the control group, constipation, bad breath, yellow urine improved very little, there were some adverse effects such as dry lips, desquamation of facial skin, hair loss, bone aches, made patients feel



uncomfortable with treatment, the doctor must often explain and encouraged the patient to continue the course. Therefore, the trend of more and more acne patients choosing traditional medicine with less adverse effects for treatment. In 2016, Dinh Thi Le Thanh studied among 118 acne patients who came to the Central Dermatology Hospital, 14 patients reported that they used traditional medicine to treat acne. The habit of using traditional medicine for the prevention and treatment of our ancestors was formed before the appearance of Western medicine, it was proven to be safe and effective through many ancient generations. Traditional medicine is easily accepted thanks to its long history as well as people believe that traditional medicine has fewer adverse effects than Western medicine.

#### ***4.2.3. Adverse effects***

During treatment, the intervention group did not experience any adverse effects. The results of this study contribute to proving the safety of traditional medicine in the care and treatment of acne patients and it is similar to many studies using traditional medicine in the treatment of acne. In contrast, after 30 days of treatment, 100% of patients in the control group experienced adverse effects like dry lips, and 96.0% of patients had dry mouth.

There was no difference between the biochemical and hematological values of patients in the intervention group at the time before and after the 60-day study ( $p > 0.05$ ). This result proves that the study drug does not affect liver function, kidney, blood fat, blood count after 60 days of treatment. In the control group, most of the biochemical and hematological indicators before and after the 60-day study were not different ( $p > 0.05$ ), Creatinin, AST, platelets were different before and after 60 days of treatment, but the values were still within normal limits ( $p < 0.05$ ). However, many clinical studies have shown adverse effects on liver and kidney function, blood fat, hemoglobin when using isotretinoin for long-term, so it is still necessary to monitor these values when continuing treatment isotretinoin for long-term.

## CONCLUSION

Through the results of studying the toxicity and effects of ACNECA in the experiment as well as in clinical, we draw some conclusions as follows:

### 2. Determining the acute toxicity, semi-chronic toxicity and treatment effects of ACNECA on experimental studies

- ACNECA did not cause acute toxicity in white mice at the maximum tolerated dose of 75g/kg/day. ACNECA did not cause semi-chronic toxicity in white rats at a dose of 0.72 g/kg/day and a dose of 2.16 g/kg/day (rats taking ACNECA continuously for 90 days).

- ACNECA had the effect of inhibiting 3 strains of *bacteria C. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis* with the MIC (MBC) were 0.534 (4.272) mg/ml, 1.068 (8.5) mg/ml, 1.068 (8.5) mg/ml. With the dose of 4.32 g/kg/day ACNECA had anti-inflammatory effect on mice edema model with the level of inhibiting inflammation in acute and sub-acute inflammation was 46.74% and 14.17%. ACNECA dose of 1.44 g/kg/day was only effectiveness on acute inflammatory model with the level of inhibiting inflammatory of 43.24% . ACNECA had effects on acne treatment model caused by *C. acnes* in the rat ear with a dose of 0.72 g/kg/day and a dose of 2.16 g/kg/day

### 2. Clinical effects of ACNECA on treating moderate acne vulgaris.

ACNECA had the effect of treating acne vulgaris in humans with the dose of 0.12g/kg/day. After 60 days of treatment, the intervention group had the average number of lesions reduced from  $66.32 \pm 25.27$  to  $19, 74 \pm 15.56$ , 100% of patients were noted with improvement (Good 22%, Fairly 40%, Average 38 %). The control group (drinking isotretinoin 0.5mg/kg/day) had better results than that in the intervention group. However, the intervention group had no adverse effects and had improvement of traditional medicine status better than that in the control group.

## RECOMMENDATION

From the study results, suggest:

4. ACNECA can be applied for the treatment of acne vulgaris.
5. Registering drugs for prescriptions, commercialize more widely, prepare capsules and tablets for convenient use.
6. Effects of ACNECA on acne vulgaris patients who are children, pregnant women or not indicated for treatment with modern medicine.

## STUDY LIMITATION

3. Still not studied on whether ACNECA reduced oil secretion or keratosis.

4. The study time was short and the sample size was small.