

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thoái hóa khớp (THK) là một bệnh thường gặp hiện nay, là một trong số những nguyên nhân chính gây giảm và mất khả năng vận động ở người cao tuổi. Theo Liên Hiệp Quốc, năm 2050, những người trên 60 tuổi sẽ chiếm hơn 20% dân số thế giới, trong đó ước tính có 15% số người mắc THK và một phần ba số này có thể bị tàn tật. Từ đó dự tính được vào năm 2050 thế giới sẽ có khoảng 130 triệu người bị THK và 40 triệu người bị tàn tật [1]. Ở Việt Nam hiện nay, THK chiếm tỷ lệ cao trong các bệnh cơ xương khớp, đặc biệt là THK gối [2]. Bệnh có chi phí điều trị tốn kém, hiệu quả chưa đạt được như mong muốn trong khi có nhiều tai biến nặng nề, tạo gánh nặng cho người bệnh và xã hội. Các phương pháp điều trị hiện nay bao gồm giáo dục bệnh nhân về cách phòng bệnh, chống các tư thế xấu, giảm các yếu tố nguy cơ kết hợp điều trị nội và ngoại khoa [2],[3]. Các biện pháp không dùng thuốc như vật lý trị liệu: chiếu tia hồng ngoại, chườm nóng, tắm suối khoáng,... thường đơn giản, ít biến chứng song hiệu quả chưa cao. Các thuốc giảm đau, chống viêm không steroid có hiệu quả nhanh nhưng gây nhiều biến chứng như viêm loét dạ dày - tá tràng, xuất huyết tiêu hóa, tổn thương gan, thận... Tiêm corticoid tại khớp gối có tác dụng cải thiện triệu chứng, nếu dùng kéo dài có thể gây tổn thương thoái hóa sụn khớp hoặc gây biến chứng tại chỗ như phản ứng viêm khớp do tinh thể thuốc, nhiễm khuẩn khớp [3],[4]. Tiêm acid hyaluronic vào khớp có tác dụng tái tạo chức năng bôi trơn và chống xóc cho khớp tuy nhiên hiệu quả không ổn định lâu dài, không có chức năng bảo vệ, tái tạo sụn khớp [5],[6]. Điều trị ngoại khoa chỉ được chỉ định trong những trường hợp có biến đổi giải phẫu khớp hoặc ở giai đoạn muộn của bệnh và thường gây tốn kém nhiều cho bệnh nhân.

THK là bệnh mạn tính, thời gian điều trị thường kéo dài, việc điều trị bằng các thuốc có nguồn gốc y học cổ truyền đang là một xu hướng mới hiện nay không những ở Việt Nam mà còn ở các nước khác trên thế giới. Việt Nam có nguồn dược liệu phong phú, đây là một ưu thế để phát triển các thuốc y học cổ truyền, hỗ trợ điều trị các bệnh mạn tính hiện nay.

Theo Y học cổ truyền, THK là do can thận hư kết hợp với phong hàn thấp gây ra, phương pháp chữa là bổ can thận, khu phong, trừ thấp, tán hàn [7]. Viên hoàn cứng TD0015 gồm các vị thuốc: Hoàng bá, Sinh địa, Tri mẫu, Bạch thược, Quy bản, Phục linh, Đỗ trọng, Đương quy, Đảng sâm, Phòng phong, Tang ký sinh, Tần giao, Ngưu tất, Trần bì, Xuyên khung, Cam thảo, Độc hoạt, Quế chi, Tế tân, Hoa đào, cao xương, phối hợp với nhau nhằm đạt được tác dụng chính là bổ thận, khu phong, trừ thấp, tán hàn. Thuốc do công ty Cổ phần Sao Thái dương sản xuất và đã được dùng trên lâm sàng dưới dạng thực phẩm chức năng trong điều trị các triệu chứng của thoái hóa khớp. Để khẳng định hiệu quả điều trị cũng như cung cấp bằng chứng khoa học về tính an toàn của sản phẩm, chúng tôi tiến hành đề tài “***Nghiên cứu độc tính và tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của viên hoàn cứng TD0015 trên thực nghiệm***” với ba mục tiêu sau đây:

- 1. Xác định độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên hoàn cứng TD0015 trên thực nghiệm*
- 2. Đánh giá tác dụng chống viêm, giảm đau của viên hoàn cứng TD0015 trên thực nghiệm.*
- 3. Đánh giá tác dụng điều trị của viên hoàn cứng TD0015 trên chuột cống bị gây thoái hóa khớp gối.*

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đại cương về thoái hóa khớp gối

1.1.1. Khái niệm về thoái hóa khớp

Trước kia, thoái hóa khớp (còn gọi là hư khớp) được coi là bệnh lý của sụn khớp, song ngày nay, bệnh được định nghĩa là tổn thương của toàn bộ khớp, bao gồm tổn thương sụn là chủ yếu, kèm theo tổn thương xương dưới sụn, dây chằng, các cơ cạnh khớp và màng hoạt dịch. Tổn thương diễn biến chậm tại sụn kèm theo các biến đổi hình thái, biểu hiện bởi hiện tượng hẹp khe khớp, tân tạo xương (gai xương) và xơ xương dưới sụn [2].

Thuật ngữ “osteoarthritis” – thoái hóa khớp ra đời năm 1890 bởi AE Garrod. Sự ra đời của tia X vào cuối thế kỷ 19, với sự đóng góp của Kellgren, Moore và Lawrence đã nâng tầm hiểu biết về diễn biến của bệnh cũng như phân biệt được thoái hóa khớp nguyên phát và thoái hóa khớp thứ phát sau một chấn thương khớp [8].

Trước đây tổn thương thoái hóa khớp đặc trưng là sự mất sụn, sau này các nhà khoa học đã làm rõ thoái hóa khớp là tổn thương của cả cấu trúc khớp bao gồm: xương dưới sụn, tế bào sụn, dây chằng, gân và bao khớp (Hình 1.1). Viêm màng hoạt dịch được coi là một yếu tố then chốt trong cơ chế bệnh sinh của thoái hóa khớp, biểu hiện các triệu chứng lâm sàng của viêm, tổn thương mô bệnh học trong mô màng hoạt dịch và tổn thương sụn tiếp giáp với màng hoạt dịch. Tổn thương xương dưới sụn cũng đóng một vai trò quan trọng trong thoái hóa khớp, biểu hiện bằng sự tái cấu trúc xương xảy ra chủ yếu trong giai đoạn đầu của thoái hóa khớp. Điều này có khả năng làm cho phần xương dưới sụn giảm khả năng hấp thu và phân tán lực tác động, kết hợp sự gia tăng khối lượng xương làm tăng thêm lực truyền qua khớp, dẫn đến tăng tổn thương cấu trúc khớp [8].

1.1.2. Giải phẫu khớp gối và tổn thương thoái hóa tại khớp gối

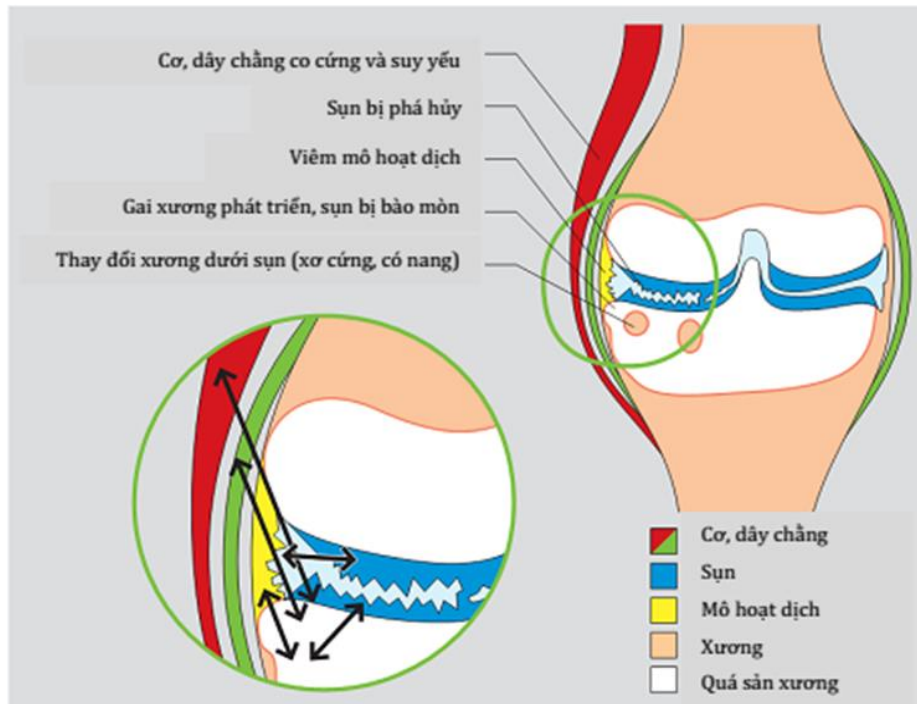
Chuyển động của cơ thể thực hiện được nhờ các khớp gồm khớp động hay khớp hoạt dịch, khớp sụn hay khớp bán động, và khớp bất động. Khớp hoạt dịch là một

đơn vị mô liên kết chức năng cho phép hai xương chi đối diện di chuyển tự do trong mối liên kết với nhau. Kết cấu xương – sụn – dịch khớp – sụn - xương có thể được coi là liên tục, với cấu trúc chịu tải được thiết lập khác nhau tùy thuộc vào vị trí và chức năng, dẫn đến hình thành cấu trúc khớp chuyên biệt [9].

Có năm loại cấu trúc cơ bản ở vùng gối:

- Dây chằng, là các cấu trúc đàn hồi thụ động, chịu tải khi kéo căng.
- Các đơn vị cơ gân, là các cấu trúc đàn hồi chủ động, chịu tải khi chưa bị kéo căng.
- Sụn và xương dưới sụn, có vai trò chịu lực nén của khớp.
- Sụn chêm, gồm có sụn chêm trong và sụn chêm ngoài, hình bán nguyệt, nằm giữa mặt khớp lồi cầu đùi ở trên và mâm chày phía dưới.
- Bao hoạt dịch

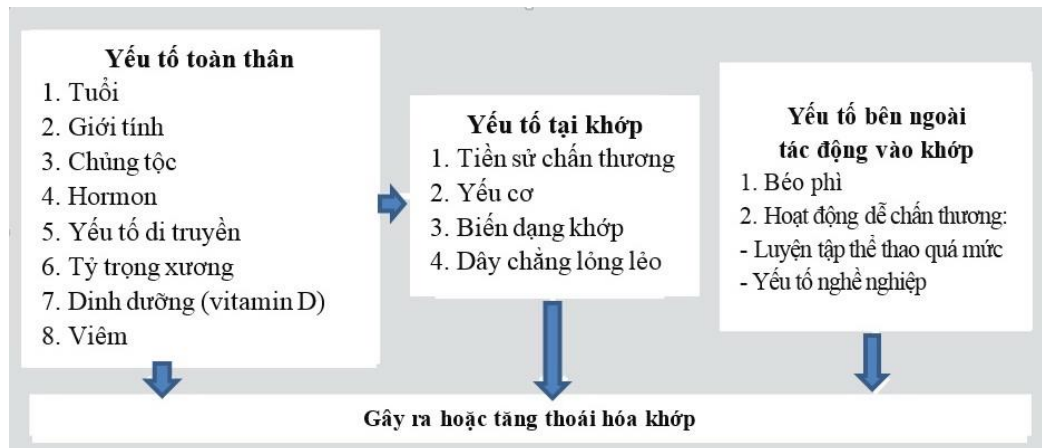
Các cấu trúc này đều bị tổn thương trong thoái hóa khớp gối.



Hình 1.1. Tổn thương cấu trúc khớp gối [8]

1.1.3. Các yếu tố nguy cơ của thoái hóa khớp gối

Qua nhiều năm nghiên cứu về bệnh học thoái hóa khớp, các yếu tố nguy cơ góp phần gây ra bệnh dần được xác định một cách hệ thống.



Hình 1.2. Yếu tố nguy cơ trong THK gối [10]

1.1.3.1. Tuổi

Tỷ lệ mắc thoái hóa khớp liên quan đến tuổi, đặc biệt rõ rệt ở các khớp thường gặp như đầu gối, háng và bàn tay. Mối liên quan giữa tuổi và nguy cơ thoái hóa khớp thông qua sự gia tăng theo tuổi của các yếu tố nguy cơ toàn thân và cơ - sinh học [11].

1.1.3.2. Giới tính

Giới tính nữ làm tăng nguy cơ thoái hóa khớp ở hai bàn tay và đầu gối, hoặc thoái hóa nhiều khớp cùng lúc. Sau 50 tuổi, tỷ lệ mắc bệnh ở nữ cao hơn đáng kể so với nam giới [12],[13].

1.1.3.3. Chủng tộc

Tỷ lệ mắc thoái hóa khớp và tỷ lệ khớp bị thoái hóa khác nhau giữa các chủng tộc và sắc tộc [14]. Nhìn chung, thoái hóa khớp phổ biến hơn ở châu Âu và Mỹ so với các nơi khác trên thế giới. Thoái hóa khớp gối thường gặp ở phụ nữ Mỹ gốc Phi hơn phụ nữ da trắng. Thoái hóa khớp háng phổ biến hơn ở người da trắng châu Âu so với người da đen Jamaica, người da đen châu Phi hoặc người Trung Quốc. Một nghiên cứu về thoái hóa khớp ở Bắc Kinh cho thấy thoái hóa khớp háng và bàn tay ít gặp hơn ở người Trung Quốc so với người da trắng, mặc dù tỷ lệ thoái hóa khớp gối có triệu chứng và chẩn đoán bằng hình ảnh cao hơn ở phụ nữ Trung Quốc so với phụ nữ da trắng [15],[16].

1.1.3.4. Mãn kinh

Thoái hóa khớp tăng lên theo tuổi có liên quan mật thiết với thời kỳ mãn kinh, hormon sinh dục đóng vai trò quan trọng trong thoái hóa khớp, đặc biệt là tình trạng

thiếu hụt oestrogen [11]. Oestrogen ảnh hưởng đến chức năng của các tế bào sụn ở nhiều mức độ thông qua tương tác với các yếu tố tăng trưởng tế bào, các phân tử bám dính và các cytokin. Nhiều nghiên cứu cho thấy liệu pháp oestrogen có ích trong điều trị thoái hóa khớp, một số nghiên cứu khác lại chỉ ra nồng độ oestrogen thấp hoặc cao hơn bình thường sẽ tác động xấu lên các tế bào sụn và khởi phát quá trình phá hủy sụn [11]. Sụn là một mô nhạy cảm với hormon, sự tác động của oestrogen lên sụn phụ thuộc liều. Khi nồng độ oestrogen thấp hoặc cao hơn bình thường sẽ làm sụn bị phá hủy, nồng độ cao oestrogen có thể liên quan tới sự tăng oestrogen receptor từ đó tăng khả năng gắn receptor của hormon này, dẫn tới sự phá hủy các mô sụn [17].

1.1.3.5. Di truyền

Sự biến đổi về di truyền cũng ảnh hưởng đến thoái hóa khớp bàn tay, khớp háng và khớp gối ở cả hai giới [13]. Nhiều nghiên cứu cho thấy không chỉ có gen mà cả các yếu tố môi trường có vai trò quan trọng trong quá trình tiến triển của bệnh thoái hóa khớp [11]. Những gen được tập trung nghiên cứu gồm có: gen mã hóa collagen type II (collagen chính trong sụn khớp), protein cấu trúc của chất nền sụn ngoại bào, gen mã hóa receptor của vitamin D và oestrogen, mã hóa các yếu tố tăng trưởng xương và sụn [13].

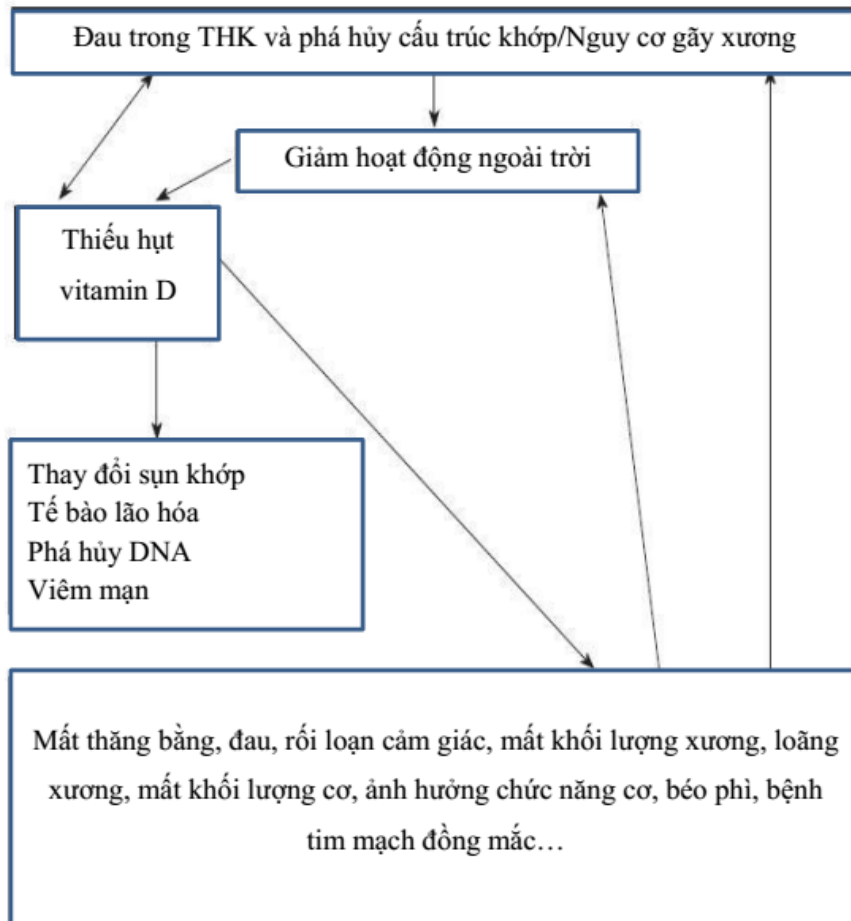
1.1.3.6. Béo phì

Béo phì là một trong những yếu tố nguy cơ được nhắc đến nhiều nhất với thoái hóa khớp gối. Béo phì làm tăng tốc độ tiến triển của thoái hóa khớp gối. Cơ chế chính dẫn đến thoái hóa khớp gối của béo phì có thể do trọng lượng quá tải nén lên khớp gối, đặc biệt khi thực hiện các hoạt động chịu lực thường xuyên ở khớp gối, dẫn đến phá hủy sụn, tổn thương dây chằng và các cấu trúc hỗ trợ khác. Các yếu tố chuyển hóa như adipocytokin, glucose, lipid và tình trạng viêm mạn tính cũng góp mặt trong sinh bệnh học của thoái hóa khớp [13].

1.1.3.7. Vitamin D và thoái hóa khớp

Mối liên quan giữa sự thiếu hụt vitamin D và thoái hóa khớp được nhắc đến rất nhiều trong các nghiên cứu và thảo luận, tuy nhiên cho tới nay, mức độ rõ ràng của liên quan này chưa thể khẳng định, do phương pháp luận khác nhau, hạn chế về thiết

kế nghiên cứu và giải thích, dữ liệu tổng hợp được đã đưa ra các kết luận mâu thuẫn nhau [18]. Trong thời gian gần đây, đã có nhiều nghiên cứu xác lập mối liên quan giữa thiếu hụt vitamin D và thoái hóa khớp. Giả thuyết về mối liên hệ này được trình bày trong Hình 1.3.



Hình 1.3. Giả thuyết về liên quan giữa thoái hóa khớp và thiếu vitamin D [18]

1.1.3.8. Yếu tố cơ học, bệnh nghề nghiệp và chấn thương

Các chấn thương đầu gối cấp tính, bao gồm rách dây chằng chéo và dây chằng chéo, gãy xương, trật khớp làm tăng nguy cơ bị thoái hóa khớp thứ phát, hoặc làm bệnh nặng thêm. Ngoài ra, nguy cơ thoái hóa khớp cũng tăng lên khi chơi thể thao trong thời gian dài, tải trọng liên tục và quá tải do các hoạt động thể chất tạo áp lực lên khớp có thể dẫn đến thoái hóa [13].

1.1.3.9. Bệnh lý

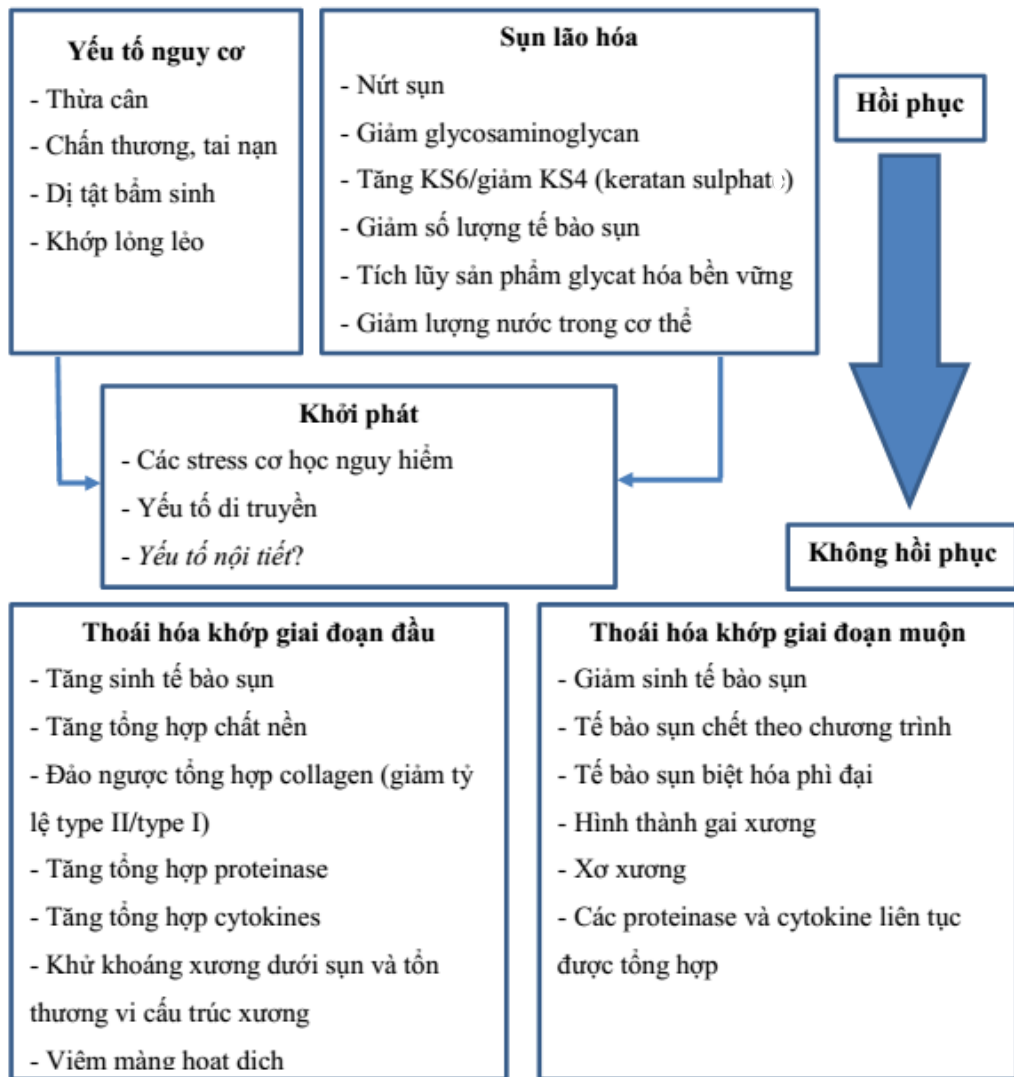
Nguy cơ mắc thoái hóa khớp tăng lên do các bất thường bẩm sinh dẫn đến sự chịu lực bất thường trong khớp. Liên kết cơ học tại gối là yếu tố quan trọng quyết định sự tải của khớp gối trong quá trình vận động. Việc phân loại các kiểu hình lâm sàng và cấu trúc khác nhau của thoái hóa khớp giúp xác định thêm các đích điều trị, tùy thuộc vào vị trí thay đổi cấu trúc nhiều nhất, ví dụ sụn, xương hay mô hoạt dịch. Một vấn đề quan trọng khác trong việc đánh giá thoái hóa khớp là sự hiện diện của bệnh đồng mắc (bệnh lý phối hợp). Ước tính thấy bệnh nhân thoái hóa khớp có trung bình 8,7 bệnh mạn tính đi kèm. Ba bệnh kèm theo phổ biến nhất là béo phì, tăng huyết áp và tăng cholesterol máu. Sau đó đến các bệnh đái tháo đường, trào ngược dạ dày thực quản, trầm cảm... [19].

1.1.4. Cơ chế bệnh sinh

Thoái hóa khớp là bệnh liên quan đến toàn bộ cấu trúc khớp, thể hiện bởi sự mất dần sụn khớp ở khớp hoạt dịch kết hợp với xơ cứng xương dưới sụn, xuất hiện gai xương ở rìa khớp và phản ứng viêm màng hoạt dịch không đặc hiệu, mức độ nhẹ, mạn tính [20],[21]. Giả thuyết về sự phát triển của thoái hóa khớp được thể hiện trong Hình 1.4.

Thoái hóa khớp thường được coi là một tình trạng thoái hóa, nhưng không phát sinh chỉ vì sự hao mòn dần dần. Thay vào đó, nó nên được xem xét như một sự tái cấu trúc bất thường của các mô khớp, sụn khớp và xương, được thúc đẩy bởi nhiều chất trung gian hóa học gây viêm [22]. Sự phát triển của thoái hóa khớp liên quan đến một trong hai cơ chế cơ bản kết nối với các hậu quả của sự tải “bất thường” trên sụn “bình thường” hoặc sự tải “bình thường” trên sụn “bất thường”.

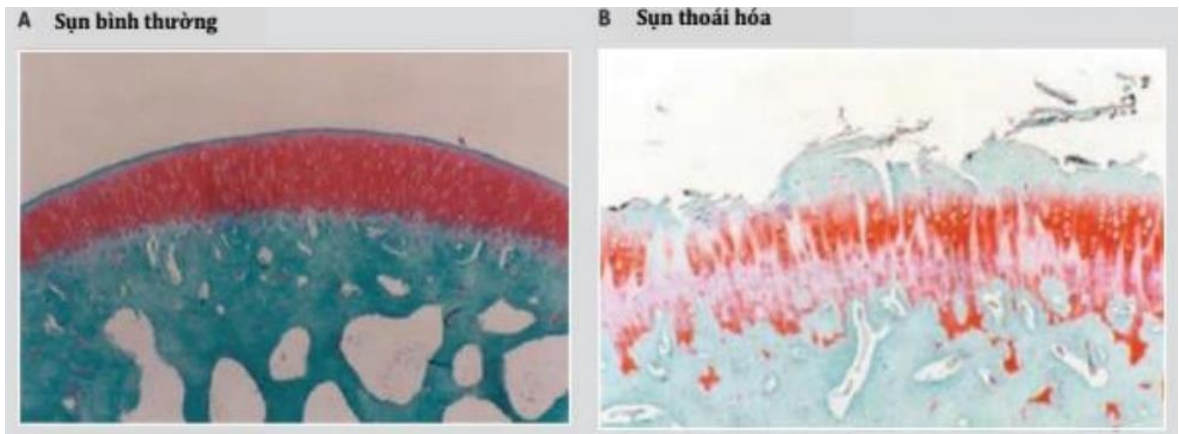
Lão hóa là yếu tố đóng góp chính cho sụn khớp “bất thường”, nhưng yếu tố di truyền ảnh hưởng đến cấu trúc và thành phần của chất nền, gây gián đoạn sự biệt hóa sụn và chức năng của sụn, có thể góp phần vào cơ chế bệnh sinh [23]. Sự tải “bình thường” trên sụn “bất thường”, hoặc bất ổn cấu trúc do một chấn thương khớp lặp đi lặp lại, là nguyên nhân chính gây thoái hóa khớp ở người trẻ tuổi [24].



Hình 1.4. Giả thuyết về sự khởi phát và bền vững của THK [21]

1.1.4.1. Thoái hóa sụn

Trong điều kiện bình thường, cân bằng nội môi sinh lý của sụn khớp được điều khiển bởi tế bào sụn, tạo ra cấu trúc nền chứa collagen (chủ yếu là collagen typ II), và proteoglycan [21]. Mặc dù có sự tham gia của nhiều mô khớp, thoái hóa khớp từ lâu đã được đặc trưng chủ yếu bởi sự phá vỡ quá trình sửa chữa sụn bị hư hỏng như là kết quả của sự thay đổi sinh hóa và cơ sinh học trong khớp. Những thay đổi cấu trúc sụn trong thoái hóa khớp được thể hiện trong Hình 1.5.



Hình 1.5. Tổn thương sụn trong thoái hóa khớp [20]

Trong thoái hóa khớp, các tế bào sụn không tổng hợp được chất nền có tính đàn hồi và bền vững, do đó không thể duy trì sự cân bằng giữa tổng hợp và giáng hóa của chất nền ngoại bào [21]. Các chất trung gian gây viêm như interleukin (IL) -1 và stress cơ học tác động lên tế bào sụn, làm cho tế bào sụn tạo ra ít collagen chức năng hơn (collagen typ I), các proteoglycan nhỏ hơn và ít chiếm không gian hơn, nhiều enzym phân hủy và nhiều chất trung gian gây viêm, bao gồm nitric oxid và IL-1 hỗ trợ. Điều này gây ra một vòng luân hồi, trong đó sự giáng hóa vượt quá sự tổng hợp của chất nền ngoại bào dẫn đến mất sụn khớp.

1.1.4.2. Vai trò của sự thay đổi xương dưới sụn

Vai trò của xương dưới sụn hiện được cho là có tầm quan trọng đặc biệt trong sinh bệnh học của thoái hóa khớp. Xương dưới sụn thực hiện nhiệm vụ hấp thụ các sốc cơ học, hỗ trợ trong các khớp bình thường và cung cấp chất dinh dưỡng cho sụn. Xương dưới sụn nằm ngay bên dưới sụn calci hóa, là một tấm xương đặc có đặc điểm sinh lý và cơ học tương tự như xương đặc ở các vị trí khác nhưng không cứng bằng xương đặc ở vị trí thân xương dài. Thuật ngữ “xương dưới sụn” đề cập đến cả hai phần xương đặc và xương xốp [20].

Giai đoạn đầu của thoái hóa khớp có sự tăng tái cấu trúc xương và mất xương dưới sụn, giai đoạn muộn lại có sự chậm tái cấu trúc và xơ cứng dưới sụn. Tất cả những biến đổi này đều có vai trò quan trọng trong bệnh học thoái hóa khớp. Dữ liệu từ các nghiên cứu trên động vật khác nhau chứng minh sự biến đổi vi cấu trúc của xương dưới sụn có thể xảy ra trước, trong hoặc sau tổn thương sụn [20].

Xương dưới sụn ở các giai đoạn khác nhau của thoái hóa khớp:

Trong giai đoạn đầu thoái hóa khớp, nhận thấy sự tăng tỷ lệ tái cấu trúc xương, kết hợp với sự mất thoáng qua của xương, tăng độ xốp vùng dưới sụn và giảm tỷ trọng, dẫn đến giảm độ dày tấm dưới sụn. Trong các nghiên cứu trên chó, sự mỏng xương dưới sụn này có liên quan đến việc tăng phá hủy sụn và giảm tổng hợp glycosaminoglycan [20].

Nguyên nhân tăng tái cấu trúc xương trong thoái hóa khớp giai đoạn đầu chưa rõ, nhưng có một số các cơ chế khác nhau đã được đặt ra:

- **Tín hiệu tế bào:** tăng nồng độ chất trung gian của viêm (ví dụ, IL-1 và IL-6) đều là yếu tố kích thích và là sản phẩm của quá trình tái cấu trúc xương đã được phát hiện trong sụn tổn thương.

- **Sự xâm nhập mạch máu:** Tăng tái cấu trúc xương có liên quan đến sự xâm nhập và tăng lên của mạch máu, nếu không được kiểm soát, có thể dẫn đến các mạch xâm nhập vào lớp sâu của sụn khớp (thường là vô mạch). Tình trạng tiền sinh mạch này có thể cảm ứng tế bào sụn tổng hợp các enzym như enzym tiêu hủy cấu trúc nền (MMPs), dẫn đến thoái hóa sụn.

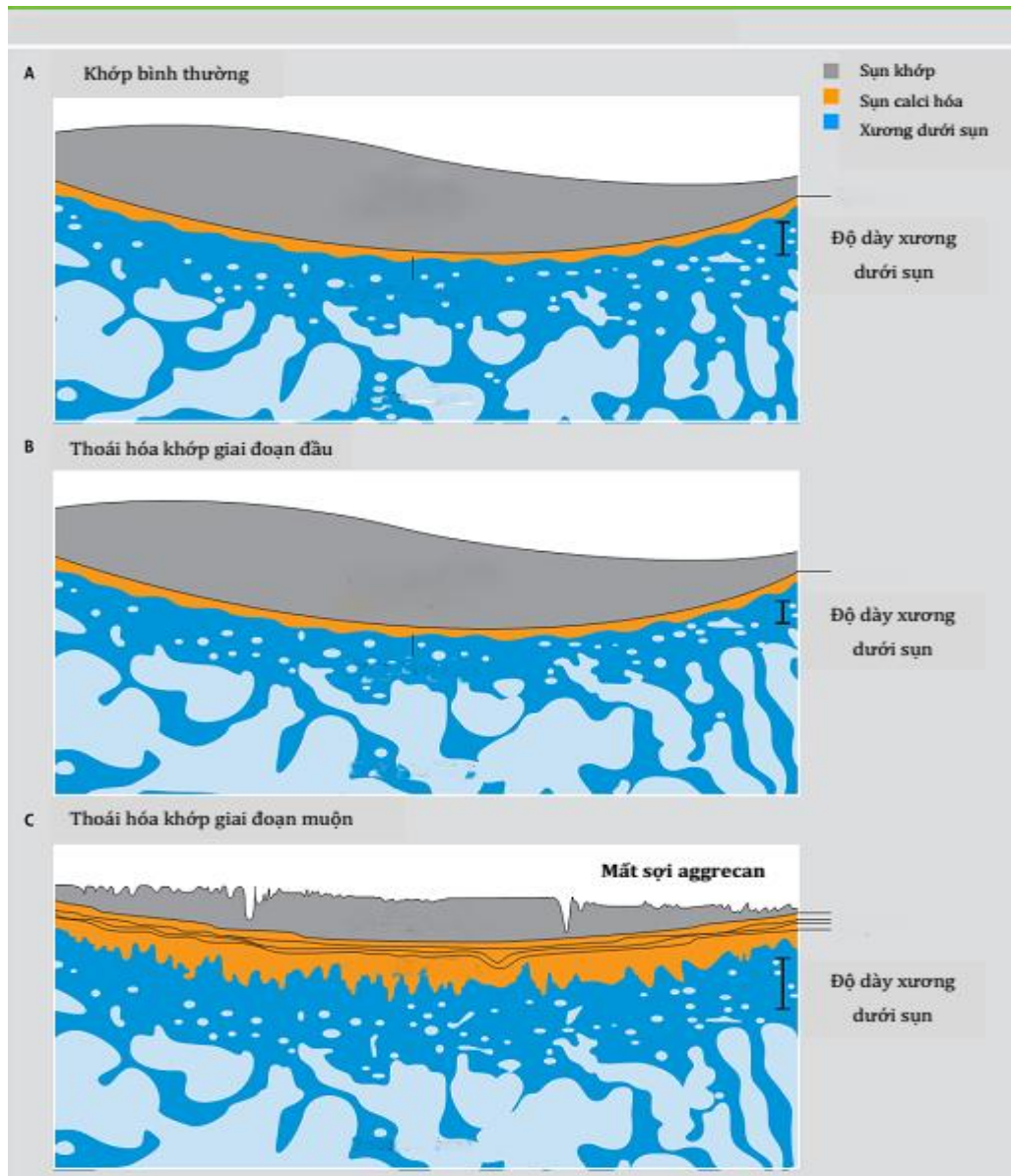
- **Sự tương tác giữa xương và sụn:** sụn được phân cách với xương dưới sụn bằng một ranh giới, mà trong sụn bình thường không thể bị phá vỡ. Trong thoái hóa khớp, giả thuyết rằng các vết nứt nhỏ trong tấm dưới sụn có thể dẫn đến sự tương tác giữa xương và sụn trong giai đoạn đầu của bệnh. Những vết nứt nhỏ này có thể tiếp tục trầm trọng hơn do sự hủy xương ở vùng dưới sụn, dẫn đến thủng tấm xương dưới sụn [20].

1.1.4.3. Viêm màng hoạt dịch

Màng hoạt dịch đóng một vai trò quan trọng trong chức năng của khớp, nuôi dưỡng tế bào sụn qua dịch khớp, khe khớp và loại bỏ các chất chuyển hóa, sản phẩm giáng hóa từ cấu trúc nền [25]. Acid hyaluronic và lubricin được sản xuất trong các tế bào liên kết hoạt dịch (synovial lining cells) giúp bảo vệ và duy trì cấu trúc sụn khớp.

Tình trạng viêm của màng hoạt dịch trong thoái hóa khớp gây ra một số triệu chứng lâm sàng như đau, phản ánh sự tiến triển của rối loạn cấu trúc sụn [26]. Hơn nữa, viêm màng hoạt dịch là nhân tố chính trong bệnh sinh thoái hóa khớp do tác

động của nhiều chất trung gian hóa học (ADAMTS, BMP, EGF, GM-CSF, IL-1Ra, LIF, LTB4, MMP, NAMPT, NGF, PGE2, TIMP, TNF, VEGF...). Mối liên hệ giữa viêm màng hoạt dịch, được đánh giá qua nội soi khớp, với mức độ giảm chức năng hoặc đau khớp vẫn là vấn đề gây nhiều tranh luận.



Hình 1.6. Sự biến đổi xương dưới sụn trong thoái hóa khớp [20]

1.1.4.4. Thay đổi dây chằng và lệch trục

Dây chằng chéo trước (ACL) có chức năng ổn định phần trước và sau của khớp gối. Có khoảng 1/4 số bệnh nhân thoái hóa khớp gối được phát hiện bị đứt dây chằng chéo trước [27]. Nghiên cứu về ảnh hưởng của sự lão hóa và thoái hóa khớp trên ACL

đã phát hiện sự thoái hóa trung bình đến nặng của ACL chỉ có sự mất sụn tối thiểu. Khả năng thoái hóa ACL tăng lên theo tuổi. Bệnh nhân bị thoái hóa khớp gối cũng có thể bị vẹo dây chằng vào trong, gây ra thoái hóa khớp chày – đùi phía trong và/hoặc vẹo dây chằng ra ngoài, dẫn đến thoái hóa khớp phía ngoài. Cả hai tình trạng này đều ảnh hưởng đến sự phân bố tải trọng, làm tăng tổn thương vùng gối.

1.1.5.5. Cơ chế phân tử trong thoái hóa khớp

Tuy sự lão hóa không được coi là yếu tố khởi đầu cho sự phát sinh thoái hóa khớp, những thay đổi về sụn liên quan đến tuổi, ví dụ như các tế bào lão hóa và giảm đáp ứng với các yếu tố tăng trưởng, sự tích lũy sản phẩm glycat hóa bền vững và stress oxy hóa, có thể phá vỡ sự cân bằng nội môi của sụn (Bảng 1.1) [28],[29],[30]. Những thay đổi này làm cho chất nền sụn dễ bị tổn thương và dẫn đến sự khởi đầu của thoái hóa khớp [28].

Dữ liệu gần đây cho thấy, các mảnh chất nền và các sản phẩm được giải phóng trong quá trình tế bào bị stress có thể kích hoạt đáp ứng miễn dịch bẩm sinh thông qua các toll-like receptors. Phản ứng tế bào sau đó lên đến đỉnh điểm trong việc kích hoạt các yếu tố phiên mã đặc hiệu, yếu tố nhân κ -B, dẫn đến sản xuất nhiều chất trung gian tiền viêm có thể gây tổn thương mô tại chỗ [26].

Bảng 1.1. Biến đổi phân tử trong tế bào sụn khớp liên quan đến quá trình lão hóa [20],[28]

Đặc điểm của tế bào sụn lão hóa	Biến đổi phân tử
Đột biến gen liên quan đến lão hóa	<ul style="list-style-type: none"> • \uparrowGADD45β, C/EBPβ \rightarrow \uparrowp21 • \downarrowSIRT1 \rightarrow \uparrowp53, \uparrowp21 • \uparrowCaveolin 1 \rightarrow \uparrowp53, \uparrowp21 • $\uparrow$$\beta$-Galactosidase
Rối loạn DNA và telomere	<ul style="list-style-type: none"> • \downarrowTRF \rightarrow telomere thu ngắn • \downarrowXRCC5 \rightarrow \uparrow phá hủy DNA • Giảm hóa DNA ty thể
Rối loạn tiết các protein	<ul style="list-style-type: none"> • \uparrowCytokin tiền viêm (IL-1β, TNF-α) và chất trung gian tiền viêm (PGE2, NO) • \uparrowMMPs (-1, -3, -13) và ADAMTS

Oxy hóa	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ROS (Reactive oxygen species) • ↓hoạt tính enzym chống oxy hóa • Rối loạn ty thể
Giảm đáp ứng yếu tố tăng trưởng	<ul style="list-style-type: none"> • Rối loạn đáp ứng với IGF-1, OP-1/BMP-7, TGF-β
Chết tế bào	<ul style="list-style-type: none"> • ↓IGF-1, OP-1 → giảm mật độ tế bào • ↓CK2 → chết theo chương trình • ↓HMGB2 → chết theo chương trình

Cytokin (chủ yếu là interleukin và yếu tố hoại tử α - TNF α), các proteinase (chủ yếu là MMPs), các chất trung gian lipid và các gốc oxy tự do đều kích thích tế bào sụn giải phóng các enzyme phân hủy sụn.

Quá trình dị hóa sụn (catabolic cartilage): các quá trình liên quan tới sự giáng hóa của các proteoglycan đều được xúc tiến qua trung gian của các enzym tự tiêu, chúng có nguồn gốc chủ yếu từ các tiêu thể (lysosom), bao gồm các protease acid, các glycosidase và các sulfatase. Quá trình các tế bào sụn giải phóng ra các enzym collagenase và protease giáng hoá proteoglycan có thể được xúc tiến qua trung gian bởi IL-1 (là cytokin- protein trọng lượng phân tử thấp do các tế bào một nhân chế tiết ra, kể cả các tế bào một nhân ở trong bao hoạt dịch, và bởi chính cả các tế bào sụn). Yếu tố hoại tử u (TNF) cũng có tác dụng tương tự với IL-1 nhưng hiệu quả của yếu tố này trên các tế bào sụn yếu hơn nhiều so với hiệu quả của IL-1.

Các yếu tố tăng trưởng liên quan đến sự tổng hợp của chất nền, như yếu tố tăng trưởng giống insulin -1, protein hình thành xương, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu và yếu tố tăng trưởng chuyển dạng β , có thể ức chế tác dụng của cytokin tiền viêm và hỗ trợ sửa chữa tổn thương sụn thoái hóa. Chúng kích thích hoạt động đồng hóa của androgen, tăng tổng hợp proteoglycan và ức chế hoạt động phá hủy sụn.

Hiện tại, không có dấu ấn sinh học đáng tin cậy nào được coi là một công cụ hợp lệ để chẩn đoán và tiên lượng thoái hóa khớp trên lâm sàng. Tuy nhiên, các protein ngoại bào gồm peptide fibulin-3 và protein giống follistatin-1 (FSTL1) đều có vai trò như các dấu ấn sinh học của thoái hóa khớp [31],[32],[33].

1.1.5. Phương pháp điều trị thoái hóa khớp

Các biện pháp điều trị chính bao gồm: điều trị không dùng thuốc, điều trị nội khoa dùng thuốc và điều trị ngoại khoa. Việc điều trị dựa vào đặc điểm riêng của từng cá nhân, nguyện vọng của bản thân bệnh nhân, chức năng và mức độ hoạt động của khớp, mức độ tổn thương, tình trạng các bệnh kèm theo trên cơ sở nghề nghiệp và chỗ ở hiện tại.

1.1.5.1. Biện pháp không dùng thuốc

Trong điều trị thoái hóa khớp, các biện pháp không dùng thuốc đóng vai trò rất quan trọng. Các bài tập vận động giúp giảm đau, tăng cường sức mạnh của cơ và biên độ vận động khớp cũng như sức bền của cơ thể. Nhiều nghiên cứu đã đưa ra các bằng chứng cho thấy giảm cân mang lại nhiều lợi ích cho bệnh nhân thoái hóa khớp bị béo phì. Khung tập đi, nạng, đế giày, nẹp gối và băng cố định xương bánh chè là các dụng cụ hữu ích hỗ trợ trong thoái hóa khớp. Giáo dục bệnh nhân và kiểm soát các hậu quả tâm lý xã hội là nhiệm vụ được ưu tiên. Các liệu pháp như chườm nóng, chườm lạnh, điện châm, châm cứu, siêu âm, liệu pháp hydro và xoa bóp được sử dụng rộng rãi nhưng hiệu quả và lợi ích mang lại không rõ ràng [34].

1.1.5.2. Biện pháp dùng thuốc

❖ Thuốc điều trị triệu chứng (tác dụng nhanh)

*** Các thuốc giảm đau đơn thuần**

Paracetamol là thuốc được sử dụng phổ biến trong điều trị giảm đau từ nhẹ đến trung bình. Nhiều khuyến cáo điều trị đã đề xuất paracetamol là thuốc giảm đau đường uống được lựa chọn trong thoái hóa khớp gối. Tuy nhiên, trong một nghiên cứu phân tích gộp năm 2010 và tổng quan hệ thống năm 2012 đã cho thấy hiệu quả giảm đau của paracetamol trong thời gian ngắn nhưng đồng thời đưa ra bằng chứng cho việc tăng nguy cơ xuất hiện các tác dụng không mong muốn trên đường tiêu hóa, suy đa phủ tạng [34]. Ngoài ra nghiên cứu của Sudano I (2010) còn cho thấy paracetamol gây tăng huyết áp ở các bệnh nhân có bệnh mạch vành [35]. Chính vì vậy, việc sử dụng paracetamol trong điều trị thoái hóa khớp cần có sự kiểm soát của các nhà lâm

sàng với liều dùng thấp nhất trong thời gian ngắn nhất, đặc biệt lưu ý ở bệnh nhân có nguy cơ bệnh lý tim mạch, bệnh lý gan, nghiện rượu [35],[36].

Các thuốc giảm đau đường uống khác: Đối với bệnh nhân không thể dung nạp NSAIDs, sử dụng các thuốc giảm đau khác đơn độc hoặc kết hợp có thể tác dụng. Tramadol là thuốc giảm đau tổng hợp loại opioid có hiệu quả giảm đau khi dùng một mình hoặc kết hợp với paracetamol. Opioid nên là phương sách cuối cùng để kiểm soát cơn đau, thường là ở giai đoạn muộn của bệnh, do thuốc có nhiều tác dụng không mong muốn bao gồm táo bón, buồn ngủ và gây nghiện.

* Các thuốc chống viêm

- *Thuốc giảm đau, chống viêm không steroid*

Các thuốc giảm đau, chống viêm không steroid (NSAIDs) có vai trò trong điều trị thoái hóa khớp ở những bệnh nhân không đáp ứng với paracetamol, đặc biệt trong những trường hợp có biểu hiện viêm màng hoạt dịch trên lâm sàng. Khi sử dụng NSAIDs cần lưu ý đến một số tác dụng không mong muốn, đặc biệt là các biến cố trên đường tiêu hóa, tim mạch và thận [37]. Các tác dụng không mong muốn trên đường tiêu hóa có thể xảy ra khi sử dụng NSAIDs đã được ghi nhận bao gồm loét, thủng và xuất huyết, và các biến cố này tăng lên cùng với tuổi, dùng phối hợp nhiều thuốc và thời gian điều trị. Đây là một vấn đề cần lưu ý đối với bệnh nhân thoái hóa khớp vì bệnh nhân thoái hóa khớp thường lớn tuổi và có nhiều bệnh kèm theo.

Cần thận trọng với những bệnh nhân lớn tuổi, có tiền sử viêm loét do NSAIDs, ở đối tượng này các NSAIDs không chọn lọc nên được sử dụng một cách thận trọng, thường ở liều thấp hơn và kết hợp với thuốc ức chế bơm proton. Chức năng thận nên được theo dõi ở người cao tuổi. Ngoài ra, điều trị dự phòng để giảm nguy cơ loét đường tiêu hóa, thủng và chảy máu được khuyến cáo ở bệnh nhân > 60 tuổi với: tiền sử bị loét dạ dày tá tràng; dự kiến thời gian điều trị > 3 tháng; liều lượng NSAIDs từ trung bình đến cao; sử dụng steroids đồng thời. Có thể cân nhắc dùng thuốc ức chế chọn lọc COX-2 thay thế cho các trường hợp này.

Các liệu pháp giảm đau tại chỗ bao gồm capsaicin và methyl salicylat bôi tại chỗ. FDA (Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ) đã chấp thuận diclofenac dạng

gel bôi để điều trị THK, đặc biệt hữu ích cho những bệnh nhân không dung nạp các tác dụng không mong muốn ở đường tiêu hóa của NSAIDs.

Học viện phẫu thuật chỉnh hình Mỹ (AAOS) khuyến cáo những bệnh nhân bị THK gối có triệu chứng và nguy cơ rối loạn tiêu hóa tăng (tuổi ≥ 60 năm, có nhiều bệnh phổi hợp, tiền sử loét dạ dày, tiền sử chảy máu, sử dụng corticosteroid đồng thời và/hoặc đồng thời sử dụng thuốc chống đông máu) nên dùng một trong số những thuốc sau để giảm đau [38],[39]:

- Paracetamol (không quá 4g ngày);
- Các NSAIDs tại chỗ;
- NSAIDs đường uống không chọn lọc kèm thuốc bảo vệ dạ dày;
- Thuốc ức chế chọn lọc COX-2

- Corticoid tiêm nội khớp

Corticoid tiêm nội khớp là biện pháp điều trị hỗ trợ ở bệnh nhân thoái hóa khớp gối được sử dụng phổ biến từ hơn 50 năm nay. Theo hội nghiên cứu thoái hóa khớp quốc tế (OARSI) năm 2008, tiêm corticoid nội khớp áp dụng trong những trường hợp bệnh nhân đau khớp gối mức độ vừa đến nặng mà không đáp ứng hoàn toàn với thuốc chống viêm, giảm đau hoặc bệnh nhân có triệu chứng tràn dịch khớp gối hoặc các dấu hiệu khác của tình trạng viêm tại chỗ [40]. Một số tác dụng không mong muốn có thể gặp như: đau tăng sau tiêm, viêm màng hoạt dịch vi tinh thể, tràn máu khớp gối, nhiễm khuẩn khớp, mất sụn khớp. Theo Hội thấp học Châu Âu (EULAR) 2003, cần thận trọng khi tiêm quá thường xuyên và không nên tiêm lặp lại quá 4 lần trong một năm [41].

❖ Thuốc điều trị theo cơ chế bệnh sinh (DMOADs)

*** DMOADs có đích tác dụng là sụn khớp**

- SYSADOAs

SYSADOA (Symptomatic slow-acting drugs for osteoarthritis) là thuật ngữ dùng cho các thuốc chống thoái hóa khớp tác dụng chậm bao gồm glucosamin, chondroitin sulphat, diacerein, các chất không xà phòng hóa từ quả bơ và đậu nành (avocado/soybean unsaponifiables, ASU) và acid hyaluronic. Nhóm thuốc này đặc trưng bởi hiệu quả giảm đau triệu chứng xuất hiện muộn (trung bình 1-2 tháng sau

khi sử dụng) và được duy trì cả sau khi ngừng điều trị (sau vài tuần đến 2-3 tháng). Hiệp hội châu Âu về các khía cạnh lâm sàng và kinh tế của loãng xương, thoái hoá khớp và các bệnh cơ xương khớp năm 2014 (ESCEO - The European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases) khuyến cáo sử dụng SYSADOAs như một liệu pháp điều trị khởi đầu, với paracetamol làm thuốc giảm đau bổ sung khi cần thiết. Thậm chí, ESCEO còn khuyến cáo sử dụng glucosamin và chondroitin do tác dụng của hai thuốc này đã được công nhận [42]. Tuy nhiên, một số hướng dẫn của các quốc gia khác chưa đưa ra khuyến cáo với mức độ cao như vậy, có thể do có quá nhiều sản phẩm chứa các thành phần trên và bằng chứng tác dụng chưa rõ ràng.

+ **Glucosamin**

Glucosamin tồn tại trong cơ thể giống như một chất nền chính trong sinh tổng hợp proteoglycan - một hợp chất cần thiết để duy trì tính toàn vẹn của sụn. Mặc dù cơ chế tác dụng chưa rõ ràng nhưng glucosamin được chứng minh đã gây ra sự đảo ngược tác dụng gây viêm và phá hủy khớp của IL-1 trên tế bào sụn và sụn thoái hóa [42]. Đối với sụn bị thoái hoá, glucosamin sulphat có khả năng làm giảm sự phá huỷ sụn do kích thích quá trình đồng hoá của sụn. Chất này còn ức chế các enzym huỷ sụn khớp như collagenase và phospholipase A2, ức chế sinh ra các gốc superoxid huỷ tế bào [37].

Glucosamin thường ở hai dạng glucosamin sulphat và glucosamin hydrochlorid, trong đó dạng muối sulphat được sử dụng rộng rãi hơn. Nhiều nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của các chế phẩm glucosamin lên các triệu chứng THK có sự không đồng nhất về kết quả, phần lớn là do sự đa dạng muối của glucosamin được sử dụng, gồm 2 dạng muối sulphat và hydrochlorid [42].

+ **Chondroitin**

Chondroitin sulphat (CS) là một polysaccharid phức tạp được chiết xuất từ nhiều loại sụn động vật khác nhau, do đó có các trọng lượng phân tử và dạng sulphat hóa khác nhau, có thể ảnh hưởng đến tính chất hóa học và các đặc tính sinh lý/dược lý. Chondroitin sulphat có tác dụng ức chế một số enzyme tiêu sụn, nhất là enzym

metalloprotease. Nghiên cứu tác dụng của CS ở liều 800mg/ngày nhận thấy tác dụng cải thiện triệu chứng đau rất rõ sau 3-6 tháng điều trị so với giả dược. Ngoài ra, CS liều 800 mg/ngày cũng cho thấy hiệu quả giảm đau và cải thiện chức năng khớp tương đương celecoxib liều 200 mg/ngày khi được dùng hàng ngày trong 6 tháng. CS còn có khả năng cải thiện cấu trúc khớp trên bệnh nhân THK mức độ nhẹ đến trung bình, được chứng minh an toàn khi dùng liều lên tới 1200mg/ngày [42].

+ *Glucosamin kết hợp chondroitin*

Glucosamin và CS thường được sử dụng kết hợp trong một sản phẩm mặc dù chưa có thử nghiệm nào công bố về hiệu quả thực sự của sự phối hợp. Glucosamin sulphat và chondroitin sulphat đều là chất cấu thành nên proteoglycan của sụn khớp và được sử dụng rộng rãi để bổ sung dinh dưỡng cho sụn khớp ở bệnh nhân thoái hóa khớp. Việc sử dụng dạng muối nào trong phối hợp cũng quyết định hiệu quả tác dụng của chế phẩm. Năm 2006, một nghiên cứu đa trung tâm, mù đôi về hiệu quả giảm đau và tính an toàn của glucosamin hydroclorid/chondroitin sulphat so với nhóm chứng đã được tiến hành trên 1583 bệnh nhân thoái hóa khớp gối. Kết quả nghiên cứu cho thấy glucosamin hydroclorid và chondroitin sulphat dạng đơn độc hay kết hợp đều không giúp cải thiện tình trạng đau một cách hiệu quả so với nhóm giả dược sau 24 tuần theo dõi. Và sau 2 năm theo dõi, kết quả giảm đau vẫn tương tự so với nhóm dùng giả dược đồng thời cũng không làm giảm tốc độ mất sụn [43].

+ *Diacerein*

Diacerein là một dẫn xuất anthraquinon. Thuốc ức chế các cytokin như Interleukin-1 thông qua giảm số lượng và giảm nhạy cảm với receptor của Interleukin-1 trên tế bào sụn khớp; giảm nồng độ TNF – α ; giảm sản xuất các cytokin, NO, MMPs gây hủy hoại tế bào sụn và màng hoạt dịch [37]. Mặc dù trên thế giới có nhiều thử nghiệm lâm sàng với các kết quả khác nhau về hiệu quả của diacerein, nhưng năm 2010, một phân tích tổng hợp đã cho thấy hiệu quả cải thiện triệu chứng của diacerein ở mức độ thấp trong thời gian ngắn nhưng có ý nghĩa thống kê. Diacerein được chỉ định trong các trường hợp THK hông hoặc gối, không khuyến cáo trên bệnh nhân THK hông có tiến triển nhanh do đáp ứng với thuốc yếu hơn.

Nghiên cứu cũng chỉ ra nguy cơ tiêu chảy đáng kể ở những bệnh nhân sử dụng diacerein [44]. Cần ngừng dùng thuốc và thay thế bằng nhóm khác khi xuất hiện triệu chứng tiêu chảy. Khuyến cáo liều khởi đầu điều trị là 50mg/lần/ngày trong 2-4 tuần đầu tiên. Sau đó có thể tăng lên 50mg x 2 lần/ngày. Nên uống thuốc cùng với bữa ăn. Do các tác dụng không mong muốn nghiêm trọng của thuốc, chống chỉ định dùng trên bệnh nhân cao tuổi (> 65 tuổi), bệnh nhân suy giảm chức năng gan (thuốc gây tăng enzym gan và tổn thương gan cấp tính).

+ ***Piascledin (ASU avocado/soybean unsaponifiables)***

Piascledin là hỗn hợp không xà phòng hóa được chiết xuất từ quả bơ và đậu nành trong đó 1/3 là dầu bơ và 2/3 là dầu đậu nành. ASU có tác dụng bảo vệ sụn khớp thông qua việc ức chế IL-1, PGE2, MMPs và tái tạo sụn khớp nhờ kích thích sản xuất các yếu tố tăng trưởng TGF- β [45].

Theo khuyến cáo của hiệp hội nghiên cứu thoái hóa khớp quốc tế (OARSI) năm 2014, glucosamin, chondroitin và ASU không có giá trị chắc chắn làm giảm triệu chứng của THK và không phù hợp trong vai trò làm cải thiện cấu trúc sụn khớp [44]. Cũng tương tự như vậy, hội thấp khớp học Mỹ (ACR) năm 2012 và hội chấn thương chỉnh hình Mỹ (AAOS) năm 2013 không khuyến cáo sử dụng glucosamin và/hoặc chondroitin, diacerein trong điều trị THK gỏi có triệu chứng [46],[47]. Hội thấp khớp học Châu Âu (EULAR) năm 2003 khuyến cáo sử dụng glucosamin sulphat và chondroitin sulphat, không khuyến cáo sử dụng các chế phẩm khác [48].

+ ***Acid hyaluronic tiêm nội khớp***

Hyaluronic acid (HA) có tác dụng bao phủ và bôi trơn bề mặt sụn khớp, ngăn cản sự mất proteoglycan, gián tiếp làm tăng cường chế tiết ra hyaluronic tự do, tự nhiên hoặc hyaluro hóa bởi các tế bào màng hoạt dịch. Tuy nhiên, phân tích tổng hợp năm 2005 từ 9 thử nghiệm lâm sàng cho thấy không có bằng chứng của sự cải thiện chức năng vận động và giảm đau khi vận động so với giả dược [49]. Theo hướng dẫn của hội chấn thương chỉnh hình Mỹ (AAOS) năm 2013, tiêm nội khớp HA không còn được khuyến cáo [47]. Hội thấp khớp học Châu Âu (EULAR) năm 2003, khuyến cáo việc sử dụng HA trong điều trị thoái hóa khớp gỏi với hiệu quả giảm đau và cải thiện

chức năng. Mặc dù hiệu quả giảm đau được duy trì trong vài tháng so với corticoid chỉ vài tuần nhưng khi sử dụng HA tiêm nội khớp cần lưu ý thuốc khởi phát tác dụng chậm, mỗi tuần tiêm 1 mũi và một đợt điều trị phải tiêm 3-5 mũi, chi phí cao, nguy cơ đau tăng và nhiễm khuẩn khớp sau tiêm [48]. Năm 2014, Hội loãng xương và thoái hóa khớp Châu Âu đã đưa ra khuyến cáo điều trị thoái hóa khớp gối và đã được cập nhật dựa trên bằng chứng vào năm 2016 nhằm hỗ trợ các bác sỹ lâm sàng trong việc đưa ra các quyết định điều trị cho bệnh nhân [50].

- Chất ức chế enzym MMPs

Các enzym tiêu hủy cấu trúc nền - Matrix metalloproteinases (MMPs) được tổng hợp trong đáp ứng với các cytokin gây viêm, chemokin và các protein khác ở phản ứng viêm và miễn dịch [51]. Enzym này tham gia vào cả hai quá trình tái cấu trúc và tiêu hủy sụn khớp. Do đó, việc kiểm soát MMPs sẽ bảo toàn được khớp trong bệnh THK. Hiện nay, có 3 loại chất ức chế MMPs được nghiên cứu:

- Chất ức chế mô của metalloproteinase (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase - TIMPs): Sự tổng hợp MMPs xảy ra trong bất kỳ mô liên kết nào. Vị trí hoạt động của MMPs cũng bị ràng buộc bởi một số protein. Phần lớn trong số này là “chất ức chế mô của metalloproteinase”. Các TIMPs làm giảm hoạt động của MMPs, sẽ đóng góp vai trò trong điều trị THK [52].

- Chất ức chế MMPs không chọn lọc: Do ức chế không chọn lọc nhiều MMPs nên nhóm này có tác dụng không mong muốn thường gặp là hội chứng cơ xương (musculoskeletal syndrome – MSS). Hội chứng này gồm các biểu hiện: sưng khớp, cứng khớp, đau mô mềm, gẫy Dupuytren.

- Chất ức chế MMPs chọn lọc: Nghiên cứu gần đây về sinh lý bệnh của THK cho thấy vai trò của MMP-13, MMP-13 thủy phân collagen loại II và phân cắt cấu trúc ngoại bào, mô liên kết và fibrinogen. Khi thử nghiệm đánh giá sự an toàn của chất ức chế chọn lọc MMP-13 nhận thấy giảm rõ rệt nguy cơ xuất hiện hội chứng MSS [53].

- Chất ức chế ADAMTS

Trong THK thường xảy ra quá trình phân hủy và mất aggrecan – thành phần quan trọng của cấu trúc lưới ngoại bào trong mô sụn. ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) là một nhóm peptidases được tìm thấy ở động vật có vú và động vật không xương sống, đã được chứng minh có vai trò trong sinh bệnh học THK ở chuột [54]. Ức chế ADAMTS có thể hiệu quả trong điều trị THK.

- Chất ức chế tổng hợp iNOS

“Nitric oxid” (NO) là gốc tự do và gây phá hủy sụn thông qua một số cơ chế bao gồm tăng tác dụng của MMPs, ức chế tổng hợp cấu trúc lưới và gây ra sự chết theo chương trình của tế bào sụn. Các cytokin tiền viêm kích thích NO thông qua iNOS (inducible nitric oxid synthase) có vai trò quan trọng trong THK. Một chất ức chế iNOS chọn lọc là “L-NIL” được nghiên cứu trên mô hình THK thực nghiệm ở chó, cho thấy tác dụng ngăn chặn sự tiến triển của bệnh [55]. Ức chế chọn lọc iNOS bởi L-NIL làm giảm sản xuất NO, giảm MMP, IL-1 β và peroxynitrit bên trong sụn và màng hoạt dịch, là một tiềm năng điều trị THK cần được nghiên cứu.

Ngoài ra còn một số các chất khác được cho là có tiềm năng điều trị THK nhưng cần được nghiên cứu nhiều hơn như: FGF-18, BMP-7, vitamin D, vitamin E, chất ức chế cathepsin K, doxycyclin...

*** DMOADs có tác dụng giảm viêm**

- **NSAIDs và corticoid:** đã trình bày ở mục trên.

- Cytokin

Interleukin-1 α and IL-1 β gây phá hủy sụn một phần thông qua tăng cường tổng hợp MMPs, ức chế sản xuất TIMPs và cảm ứng NOS. Ức chế IL-1 và TNF- α dẫn đến giảm MMP-1, MMP-3 và MMP-13 có tác dụng bảo vệ sụn [56]. Đặc biệt, IL – β đóng vai trò quan trọng trong quá trình cân bằng và sửa chữa sụn khớp. Ức chế IL - 1 β thông qua ức chế enzym chuyển IL - 1 β làm chậm quá trình cảm ứng dẫn đến viêm khớp của collagen typ II trên chuột nhắt [57]. Canakinumab là một kháng thể đơn dòng kháng IL-1 β , đã hoàn thành các thử nghiệm pha II. Không thấy hiệu quả điều trị THK của canakinumab trong thời điểm hiện tại, nhưng đã thấy rõ sự giảm phá hủy

sụn trên chuột [58]. Kháng thể đơn dòng kháng IL-1 đã gây giảm số lượng bạch cầu dẫn đến tử vong trên một vài đối tượng tham gia thử nghiệm [59],[60].

- Kháng thể kháng TNF

Thuốc ức chế TNF đã được sử dụng trong điều trị viêm khớp dạng thấp, bệnh lý mà trong đó, sự có mặt của TNF – α dẫn đến phá hủy khớp. TNF – α ức chế quá trình sửa chữa sụn, tăng biểu hiện MMPs, vì vậy nếu ức chế chất này có thể chống được THK. Adalimumab, một kháng thể đơn dòng kháng TNF – α làm chậm tiến triển của THK bàn tay, hiện đang thử nghiệm pha III. Infliximab có thể giảm tỷ lệ mắc bệnh THK thứ phát ở bàn tay bệnh nhân viêm khớp. Hy vọng khi hoàn thành thử nghiệm giai đoạn III sẽ cung cấp một số thông tin hướng tới hiệu quả của loại thuốc này trong việc làm chậm tiến triển THK [61],[62]

*** DMOADs có đích tác dụng là xương dưới sụn**

- Bisphosphonat

Bisphosphonat làm giảm hoạt động của tế bào hủy xương, do đó giảm sự hủy xương và có khả năng bảo vệ xương dưới sụn. Sử dụng alendronat trong thoái hóa cột sống đã được nghiên cứu trong thử nghiệm FIT, cho kết quả làm chậm tiến triển hẹp khoảng đệm giữa các đốt sống [63]. Tiến hành thử nghiệm trên 200 bệnh nhân có thoái hóa cột sống, chụp X-quang cột sống trước và 3 năm sau khi điều trị bằng alendronat hoặc giả dược. Bệnh nhân trong nhóm alendronat biểu hiện ít gai xương trên phim chụp X-quang cột sống và ít triệu chứng hẹp khoảng đệm gian đốt hơn [64].

- Strontium ranelat

Strontium ranelat có tác dụng làm tăng sự tồn tại và hoạt tính của các nguyên bào xương, giảm hoạt tính hủy cốt bào từ đó tăng quá trình tạo xương và giảm quá trình hủy xương. Strontium ranelat đã được chấp nhận để điều trị loãng xương từ năm 2012, khi nghiên cứu nhận thấy thuốc có tác dụng điều trị cả trên người bị THK cột sống có loãng xương và không kèm loãng xương [64]. Tuy nhiên, thuốc có độc tính trên tim mạch nhiều nên chỉ được khuyến cáo dùng trong loãng xương nặng ở phụ nữ sau khi sinh và nam giới có nguy cơ gãy xương cao, không dùng cho bệnh nhân

có tiền sử hoặc đang bị thiếu máu cơ tim cục bộ, bệnh mạch máu ngoại biên, bệnh mạch máu não hoặc bệnh nhân tăng huyết áp khó kiểm soát.

- Calcitonin

Calcitonin là một hormon, một trong số các tác dụng của thuốc là đối kháng hormon cận giáp và do đó ức chế hoạt động của hủy cốt bào. Tác dụng này nhờ có liên kết với receptor calcitonin trên hủy cốt bào và thay đổi cấu trúc bộ khung tế bào. Calcitonin được nghiên cứu rộng rãi trong các thử nghiệm in vitro và in vivo, có tác dụng trên cả cấu trúc xương và sụn khớp [65]. Điều trị bằng calcitonin có thể làm giảm các dấu ấn sinh học của THK trong huyết thanh và nước tiểu ở 41 bệnh nhân THK gối [66]. Calcitonin cũng có tác dụng bảo tồn lượng sụn trong một thử nghiệm trên 1169 bệnh nhân THK gối khi so với giả dược [67]. Tuy nhiên calcitonin không thể hiện tác dụng cải thiện độ hẹp khe khớp, vì vậy cần thêm nhiều nghiên cứu để xác định rõ vai trò điều trị của hormon này.

1.1.5.3. Điều trị nội soi và ngoại khoa THK

❖ Điều trị nội soi

Điều trị thoái hóa khớp qua nội soi khớp bao gồm nội soi rửa khớp đơn thuần (arthroscopic joint lavage), nội soi cắt lọc tổ chức tổn thương (arthroscopic debridement), nội soi khớp có bào khớp (arthroscopic abrasion arthroplasty), thường được chỉ định khi không đáp ứng với điều trị nội khoa. Tuy nhiên, chỉ định và hiệu quả thực sự của các thủ thuật này cho đến nay vẫn còn nhiều tranh cãi. Ngoài ra, qua nội soi khớp, có thể khoan các lỗ nhỏ qua bề mặt sụn thoái hóa sâu xuống vùng xương để tăng tưới máu tại chỗ, nhờ vậy bề mặt sụn bị thoái hóa có thể được phủ bởi sụn mới tạo thành [68],[69].

❖ Điều trị ngoại khoa

Điều trị ngoại khoa thường được chỉ định với các trường hợp hạn chế chức năng nhiều, hoặc đau khớp không đáp ứng với các phương thức điều trị nội khoa và nội soi khớp. Bao gồm: chêm lại khớp, cắt xương chỉnh trục (osteotomy), làm cứng khớp, thay một phần hoặc toàn bộ khớp với mục đích phòng chống thoái hóa khớp hoặc không làm nặng thêm bệnh. Thay khớp gối toàn bộ được chỉ định đối với các thoái

hoá khớp tiến triển, thất bại với điều trị nội khoa, kể cả nội soi khớp, đau dai dẳng đi kèm với tình trạng hạn chế vận động rõ rệt và các dấu hiệu hủy hoại khớp trên X-quang [70].

1.1.5.4. Một số phương pháp điều trị mới

❖ Cấy ghép sụn

Cấy ghép sụn bao gồm cấy ghép sụn tự thân (autograft) và cấy ghép sụn đồng loại (allograft) qua nội soi. Phương pháp này có nhược điểm hay gặp là mảnh sụn được ghép dễ bị bong ra. Do đó, cấy ghép sụn không được áp dụng phổ biến trong điều trị thoái hóa khớp, thường chỉ định cho những bệnh nhân trẻ có tổn thương sụn sau chấn thương [71].

❖ Huyết tương giàu tiểu cầu

Huyết tương giàu tiểu cầu (PRP) đã được chứng minh có chứa các yếu tố tăng trưởng, trong đó, yếu tố tăng trưởng chuyển dạng TGF- β đóng vai trò quan trọng do làm tăng chất nền cho tế bào sụn phát triển, tăng sinh tế bào sụn, điều hòa tổng hợp proteoglycan [72]. Trên thế giới, trong khoảng vài năm trở lại đây, nhiều nghiên cứu đã chứng tỏ PRP tự thân tiêm nội khớp là một liệu pháp có hiệu quả trong điều trị thoái hóa khớp gối [73]. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Bùi Hồng Thiên Khanh [74] đánh giá liệu pháp phối hợp tế bào gốc nguồn gốc mô mỡ với PRP cho thấy hiệu quả trong điều trị THK gối. Bùi Hải Bình cũng báo cáo hiệu quả tốt và tương đối an toàn khi dùng liệu pháp PRP đơn độc trên bệnh nhân THK gối nguyên phát [75].

❖ Liệu pháp tế bào gốc mô mỡ

Tế bào gốc mô mỡ có hiệu quả trong sửa chữa tổn thương sụn khớp do có khả năng biệt hóa thành tế bào sụn và giải phóng các yếu tố hoạt hóa tạo sụn sinh học như yếu tố tăng trưởng chuyển dạng (TGF- β), protein tạo xương (BMPs), yếu tố tăng trưởng kháng lại tình trạng chết theo chương trình và tạo xơ (anti- fibrotic and anti-apoptotic growth factors) [76],[77]. Phương pháp này hiện đang được áp dụng trong điều trị THK gối, là sự phát triển tiềm năng thay thế cho việc thay khớp nhân tạo trong điều trị thoái hóa khớp gối. Ở Việt Nam, chỉ trong một thời gian tiếp cận, nghiên cứu và ứng dụng, nền công nghệ tế bào gốc ở Việt nam đã có những bước tiến lớn,

đạt được những thành tựu đáng ghi nhận trong lĩnh vực cơ xương khớp. Mới đây nhất là nghiên cứu của Phạm Hoài Thu và Nguyễn Thị Ngọc Lan (2017) về hiệu quả của liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân trên bệnh nhân THK gối tự phát, kết quả có sự cải thiện rất rõ các triệu chứng trong 6 tháng điều trị và sau 1 năm theo dõi, đồng thời tỷ lệ xuất hiện tác dụng không mong muốn và tai biến rất thấp [78].

❖ Liệu pháp gen

Ảnh hưởng của các phức hợp yếu tố di truyền lên tỷ lệ mắc và mức độ nghiêm trọng của THK có thể thay đổi tùy thuộc các khớp nhất định và có liên quan đến giới tính, chủng tộc. Có ba loại tế bào được chọn làm đích điều trị trong liệu pháp gen gồm có: tế bào liên kết hoạt dịch (synovial lining cells), tế bào sụn và tế bào gốc trung mô [79]. Một số gen tiêu biểu được lựa chọn trong liệu pháp gen điều trị THK được trình bày trong bảng 1.2.

Đường truyền tín hiệu quan trọng trong sự hình thành khớp được kích thích bởi protein hình thái học (BMPs), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng (TGFs) và họ protein Wnt, tất cả đều tham gia vào bệnh sinh THK [80]. CAP-1 (cartilage acidic protein -1) là protein biểu hiện quá mức trong THK, được sản xuất tại các tế bào sụn và các nguyên bào sợi hoạt dịch bởi các cytokin tiền viêm, làm chậm đáng kể quá trình thoái hóa của sụn, hình thành gai xương và đáng đi bất thường sau chấn thương THK [81].

Bảng 1.2. Gen tiêu biểu trong liệu pháp gen điều trị THK [82]

Gen	Ví dụ
Yếu tố tăng trưởng	IGF-1, TGF- β , BMP-2, -7, FGF
Cytokin/anticytokin	IL-4, IL-1Ra, sIL-1R, sTNFR
Ức chế proteinase	TIMP, PAI, Serpin
Kháng gốc tự do	SOD
TF/phân tử tín hiệu	Sox-5,-6,-9, SMAD
Phân tử chất nền	Type II collagen, COMP
Enzym	GFAT
Ức chế sự chết theo chương trình	Bcl-2

Một số loại thuốc thường dùng trong điều trị THK cũng có ảnh hưởng đến các gen. Steroid và chất ức chế chọn lọc COX-2 làm giảm MMP-1 và tăng biểu hiện gen aggrecan (aggrecan hay chondroitin sulphat proteoglycan -1, là thành phần quan trọng cấu tạo chất nền sụn khớp). Sự gia tăng biểu hiện gen collagen type II cũng được ghi nhận khi sử dụng celecoxib nhưng lại không gặp khi dùng piroxicam [83].

Mặc dù có rất nhiều gen tiềm năng có thể sử dụng trong điều trị THK, nhưng nổi bật nhất là gen IL-1 do có vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh THK. Kỹ thuật chuyển gen IL-1Ra đã mở ra một tương lai hứa hẹn thành công trong điều trị THK [84]. Hiểu biết sâu sắc về biểu hiện gen của THK có thể hỗ trợ việc khai sáng những bí ẩn của cơ chế bệnh sinh THK và hỗ trợ phát hiện các mục tiêu chính xác điều trị viêm khớp. Sử dụng hệ mang thuốc hiện đại bao gồm phân tử RNA nhỏ không mã hóa đặc hiệu cho sụn có thể thúc đẩy sự thành công của phương pháp điều trị mới này [85].

1.1.5.5. Quan điểm y học cổ truyền về thoái hóa khớp gối và một số dược liệu được nghiên cứu trong điều trị thoái hóa khớp

❖ Quan điểm y học cổ truyền về thoái hóa khớp gối

Thoái hóa khớp gối thuộc chứng Tý theo YHCT. Tý nghĩa là bế tắc, chứng tý phát sinh trên cơ sở khí huyết suy kém, âm dương mất điều hòa, tà khí từ bên ngoài thừa cơ xâm phạm vào gân, cơ, xương, kinh lạc hoặc do người già chức năng các phủ tạng suy yếu, thận hư không chủ được cốt tủy, can huyết hư không nuôi dưỡng được gân, tỳ hư cơ nhục yếu mà gây ra xương khớp đau nhức, sưng nề gân cơ cứng, teo cơ, hạn chế vận động... [7],[86],[87].

❖ Phương pháp chữa trị theo YHCT

Điều trị chứng Tý theo YHCT gồm có khu phong, trừ thấp, tán hàn, thông kinh hoạt lạc, tư bổ can thận nhằm khôi phục sự cân bằng âm dương, phù chính khu tà, khôi phục lại cử động bình thường. Hai phương pháp điều trị chính là dùng thuốc và không dùng thuốc (châm cứu, xoa bóp bấm huyệt)

Nhiều bài thuốc cổ phương có giá trị trong điều trị chứng Tý trên lâm sàng, tùy thuộc vào mỗi thể bệnh mà có bài thuốc phù hợp. Một số bài thuốc được dùng như Độc hoạt tang ký sinh, Tam tý thang gia giảm, Quyên tý thang, Phụ tử thang...

Điều trị THK bằng các thuốc có nguồn gốc YHCT đang là một xu hướng mới hiện nay trên thế giới. Các dược liệu nguồn gốc YHCT có nhiều ưu điểm và thích hợp cho điều trị kéo dài, tác dụng không mong muốn thường ít và nhẹ hơn các thuốc tân dược. Số lượng bệnh nhân sử dụng các thuốc y học cổ truyền thay thế/bổ trợ để điều trị bệnh lý về khớp đang tăng dần [88]. Một số nghiên cứu về điều trị THK, bao gồm điều trị triệu chứng đau và viêm trong các bệnh lý về khớp bằng thuốc nguồn gốc y học cổ truyền được trình bày dưới đây:

Bảng 1.3. Một số dược liệu/phối hợp dược liệu có tác dụng điều trị thoái hóa khớp

Tác giả	Năm	Nguyên liệu	Kết quả
Altman RD [88]	1994	Capsaicin từ ớt	Bôi ngoài da trên bệnh nhân THK có tác dụng giảm đau tại chỗ sau 3 tháng
Gyader [88]	1984	Móng vuốt của quỳ (<i>Harpagophytum procumbens</i>)	Làm giảm mức độ nặng của cơn đau sau 1 tháng điều trị, rõ hơn với trường hợp đau mức độ vừa phải
Bliddal [88]	2000	Gừng (<i>Zingiber officinale</i>)	67 bệnh nhân THK háng hoặc gối được sử dụng 170mg gừng chiết xuất, 400mg ibuprofen và giả dược. Kết quả xếp hạng theo hiệu quả cao (qua thang điểm VAS như sau: ibuprofen > gừng chiết xuất > giả dược
Kulkarni [88]	1991	Articulín-F gồm rễ sâm Ấn độ, nhựa bạch đàn, thân rễ nghệ, kẽm	Cải thiện mức độ nghiêm trọng của đau và khả năng vận động sau 3 tháng điều trị trên bệnh nhân THK
Chen CW [89]	2011	Bài thuốc Độc hoạt tang ký sinh	Tác dụng giảm phá hủy sụn khớp trên thỏ thoái hóa khớp
Chen Y [90]	2016	Bài thuốc Độc hoạt tang ký sinh	Tác dụng chống viêm, giảm sự tiêu xương, sụn trên chuột chuyển gen TNF
Supanimit [91]	2004	DJW (gồm 13 dược liệu)	Hiệu quả tương đương diclofenac trên bệnh nhân thoái hóa khớp gối
Zhang [92]	2016	Nước sắc “Độc hoạt ký sinh” và glucosamin/meloxicam/hyaluronat	Tác dụng ức chế sự chết theo chương trình của tế bào sụn trên thỏ thoái hóa khớp

Lưu Thị Hiệp [93]	2005	Bài thuốc Tam tỳ thang	Tác dụng chống viêm, giảm đau, cải thiện chỉ số vận động khớp gối trên bệnh nhân thoái hóa khớp gối trong 4 tuần điều trị
Đào Thị Thanh Hiền [94]	2016	Cao đặc Phong Đan	Tác dụng giảm đau và ức chế phù bàn chân chuột, ức chế tạo u hạt trên chuột.
Nguyễn Thị Huyền [95]	2017	Viên nang cứng Phong Đan	Tác dụng giảm đau, ức chế tạo u hạt, chống viêm cấp trên mô hình gây viêm màng bụng chuột.

1.2. Tổng quan về viên hoàn cứng TD0015

1.2.1. Nguồn gốc

TD0015 gồm các dược liệu được kiểm định chất lượng theo tiêu chuẩn DĐVN V và sản xuất theo tiêu chuẩn cơ sở tại công ty cổ phần Sao thái dương dưới dạng viên hoàn, đóng gói 5g/gói.

1.2.2. Cấu trúc bài thuốc

STT	Vị thuốc	Tỷ lệ	STT	Vị thuốc	Tỷ lệ
1	Hoàng bá	2,26	12	Trần bì	0,22
2	Cam thảo	0,12	13	Bạch thược	0,77
3	Đỗ trọng	0,47	14	Đảng sâm	0,34
4	Ngưu tất	0,03	15	Độc hoạt	0,17
5	Phòng phong	0,23	16	Đương quy	0,34
6	Phục linh	0,47	17	Quế chi	0,08
7	Sinh địa	0,70	18	Tế tân	0,08
8	Tang ký sinh	0,23	19	Xuyên khung	0,17
9	Tần giao	0,23	20	Qui bản	2,97
10	Tri mẫu	0,31	21	Cao xương hổn hợp	0,70
11	Hoa đào	0,26			

Viên hoàn TD0015 có cấu trúc bài thuốc với tỷ lệ như trên, được cải dạng viên hoàn, 5g/ 1 gói. Giới thiệu về từng vị dược liệu của bài thuốc được trình bày trong bảng Phụ lục 1, được trích dẫn từ cuốn Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam của tác giả Đỗ Tất Lợi [96].

1.2.3. Tác dụng

Bài thuốc có tác dụng khu phong, trừ thấp, thông kinh hoạt lạc, bổ can thận. Được chỉ định trong chứng tý mà nguyên nhân là phong thấp tà xâm phạm kèm can thận hư.

1.2.4. Phân tích bài thuốc

TD0015 được tạo thành dựa trên bài thuốc cổ phương Độc hoạt tang ký sinh thang gia thêm các vị: *Hoàng bá, Tri mẫu, Quy bản, Trần bì, cao xương hổn hợp*.

TD0015 có tác dụng khu phong, trừ thấp, thông kinh hoạt lạc, bổ can thận. Trong đó:

- Độc hoạt, Tang ký sinh có tác dụng khu phong trừ thấp, dưỡng huyết hòa vinh, hoạt lạc thông tý.
- Ngưu tất, Đỗ trọng, Sinh địa, Quy bản, cao xương bổ ích can thận, cường gân tráng cốt.
- Xuyên khung, Đương quy, Bạch thược bổ huyết, hoạt huyết.
- Đẳng sâm, Phục linh, Cam thảo ích khí kiện tỳ, các vị này đều có tác dụng hỗ trợ cho Độc hoạt, Tang ký sinh trừ phong thấp.
- Quế chi, Hoa đào để thông kinh, hoạt lạc, hành khí hoạt huyết.
- Tần giao, Tế tân, Phòng phong để khu phong, trừ thấp.
- Hoàng bá, Tri mẫu có tác dụng thanh nhiệt, trừ thấp (do thấp uất lâu ngày hóa nhiệt).
- Trần bì hành khí, kết hợp với các thuốc hoạt huyết để thông kinh hoạt lạc, chỉ thống.

Các vị thuốc hợp lại thành một bài thuốc có tác dụng vừa trị tiêu bản vừa phù chính khu tà, thường được dùng để điều trị các chứng phong thấp tý kèm can thận hư, mệnh môn hỏa hư, khí huyết lưỡng hư, khí trệ huyết ứ. Liên hệ y học hiện đại là các trường hợp thoái hóa khớp, đợt tiến triển của viêm khớp dạng thấp [97].

1.2.5. Một số nghiên cứu về tác dụng điều trị thoái hóa khớp của một số dược liệu thành phần trong viên hoàn cứng TD0015

Các vị thuốc trong viên hoàn cứng TD0015 đã được nghiên cứu trên thế giới

với các tác dụng chống viêm, giảm đau (điều trị triệu chứng của thoái hóa khớp), và tác dụng ức chế phá hủy sụn khớp, cải thiện cấu trúc sụn trong thoái hóa khớp.

Bảng 1.4. Một số nghiên cứu về tác dụng chống viêm, giảm đau, chống thoái hóa khớp của các dược liệu trong TD0015

Dược liệu	Năm nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu
Phòng phong	2002 2016	Tác dụng chống viêm, giảm đau trên chuột cống được gây mô hình viêm khớp [98]. Tác dụng giảm đau do thành phần có cimifugin làm giảm biểu hiện COX-2 [99].
Độc hoạt	2014 2013	Tác dụng chống viêm, giảm đau, ức chế phá hủy sụn khớp, tăng biểu hiện proteoglycan, collagen [100],[101].
Hoàng bá	2001, 2014 2019	Tác dụng chống viêm trên chuột nhắt: làm giảm các interleukin cảm ứng lipopolysaccarid như IL-6, IL-1 β , ức chế tổng hợp nitric oxid, hoạt hóa các NF- κ B thông qua giáng hóa và phosphoryl hóa I κ B α , giảm phosphoryl hóa các protein kinase hoạt hóa ty thể [102],[103],[104],[105].
Bạch thược	2005, 2008, 2011, 2012, 2014	Tác dụng chống viêm, giảm đau nhờ các chất CML-1, JCICM-6, paeoniflorin, albiflorin [106],[107],[108],[109],[110],[111].
Ngưu tất	2013 2014	Tác dụng điều trị thoái hóa khớp của polysaccarid trong Ngưu tất trên chuột cống thông qua tăng sinh sụn và tăng biểu hiện collagen typ II ở sụn [112],[113]. Tác dụng chống viêm, giảm đau mạnh [114],[115]
Quế	2005	Tác dụng chống viêm, giảm đau (CML-1) [106].
Tần giao	2012	Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột (giảm PGE2, COX2, NF- κ B [116],[117].
Cam thảo	2005	Tác dụng chống viêm, giảm đau (CML-1) [106].
Phục linh	2014	Dịch chiết cồn Phục linh có tác dụng chống viêm và giảm đau [118].

Đảng sâm	2008	Các saponin trong Đảng sâm được nhiều tác giả nghiên cứu và cho kết quả tốt [119].
Đương quy	2016	Tác dụng chống viêm (giảm histamin, 5-hydroxytryptamin) và giảm đau [120],[121].
Đỗ trọng	2005	Tác dụng chống viêm, giảm đau (CML-1) [106].
Tế tân	2014	Tác dụng chống viêm, giảm đau, ức chế phá hủy sụn khớp, tăng biểu hiện proteoglycan, collagen [122]
Tri mẫu	2010	WIN-34B chiết từ Tri mẫu có tác dụng giảm đau chống viêm trên chuột nhắt bình thường, tác dụng giảm đau trên mô hình gây thoái hóa khớp bằng monoiodoacetat [123].

Năm 2017, Hoàng Thị Thắng đã nghiên cứu tác dụng của viên hoàn cứng TD0015 kết hợp phương pháp điện châm trên 30 bệnh nhân thoái hóa cột sống cổ có biểu hiện hội chứng cổ vai cánh tay. Kết quả cho thấy, điện châm kết hợp viên hoàn cứng TD0015 có tác dụng giảm đau, cải thiện tầm vận động cột sống cổ, giảm hội chứng rễ, cải thiện chức năng sinh hoạt hàng ngày trên bệnh nhân, đồng thời không gây tác dụng không mong muốn trên lâm sàng và cận lâm sàng [124].

1.3. Mô hình thoái hóa khớp thực nghiệm

Mô hình gây thoái hóa các khớp trên động vật là loại mô hình thực nghiệm tương đối mới, khó thực hiện trong nghiên cứu. Hiện nay có hai mô hình gây thoái hóa khớp chính, là phương pháp phẫu thuật và phương pháp sử dụng hóa chất.

1.3.1. Mô hình sử dụng phẫu thuật gây thoái hóa khớp

Trong các mô hình thực nghiệm, phương pháp phẫu thuật gây thoái hóa khớp là phương pháp kết hợp giữa sự mất ổn định của cấu trúc khớp, biến đổi bề mặt tiếp xúc của khớp và viêm trong khớp. Đặc điểm này mô phỏng mô hình thoái hóa khớp sau chấn thương. Phương pháp gồm có: phẫu thuật cắt bỏ một phần sụn khớp (meniscectomy), cắt dây chằng chéo trước (anterior cruciate ligament transection), phẫu thuật sắp xếp lại xương (osteotomy). Đây là một phương pháp khó, đòi hỏi phương tiện kỹ thuật cao và sự hiểu biết kỹ lưỡng về khớp chọn để phẫu thuật. Khớp

gối là khớp thông dụng nhất được lựa chọn trong nghiên cứu nhưng có sự khác biệt giữa các loài động vật. Ở người và nhiều loài động vật, lực tải chủ yếu được truyền qua phần trong của khớp gối. Vì đây là vùng chịu lực lớn nhất nên sẽ là vị trí tổn thương sớm nhất, do đó, phẫu thuật can thiệp như cắt bỏ một phần sụn khớp nên được thực hiện ở vùng này. Trong khi đó ở thỏ, nơi chịu lực lớn hơn lại là phần khớp gối ngoài, vì vậy, để can thiệp vào khớp thì tiến hành phẫu thuật ở vùng khớp gối ngoài mới cho hiệu quả [125].

Khi so sánh kết quả của các thủ thuật gây thoái hóa khớp thực nghiệm, sự khác biệt về tốc độ và các vị trí thoái hóa rất được quan tâm, vì mỗi phương pháp phẫu thuật có một lợi thế riêng ở từng khớp và về quá trình gây viêm. Để nêu bật những khác biệt này, một nghiên cứu năm 2012 của Moody và cộng sự đã cho thấy sự thay đổi rõ rệt trong các hình thái tiến triển của thoái hóa khớp giữa các mô hình cắt dây chằng chéo trước/dây chằng giữa và mô hình cắt bỏ một phần sụn khớp [126].

1.3.2. Mô hình sử dụng hóa chất tiêm vào khớp gối

Các hóa chất tiêm vào khớp gồm có: các enzym (papain, collagenase, trypsin, hyaluronidase [127],[128], các cytokin (interleukin-1 [129], yếu tố TGF- β [130]), và hóa chất như mono-iodoacetat (MIA) [131]. Phần lớn các tác nhân này gây ra tình trạng viêm cấp tính tại vị trí tiêm nên có thể không mô phỏng được chính xác hoàn toàn quá trình diễn biến tự nhiên của thoái hóa khớp giống như trên người.

Tiêm collagenase nội khớp là một mô hình gây thoái hóa khớp đã được sử dụng chủ yếu để nghiên cứu các cơ chế tổn thương cấu trúc khớp [132], thay đổi mô bệnh học của khớp gối giống với những gì đã được mô tả trên thoái hóa khớp của người, đặc biệt là ở chuột nhắt, thỏ, chuột cống. Collagenase gây ra sự thoái hóa của sụn khớp bằng cơ chế tiêu hủy trực tiếp collagen từ các tổ chức ngoại bào của sụn [133], từ đó dẫn đến tình trạng mất ổn định khớp do tăng lỏng lẻo cấu trúc khớp. Ngoài ra, còn quan sát thấy tổn thương ở các cấu trúc khớp khác như xương dưới sụn và viêm màng hoạt dịch, gây ra triệu chứng đau [133]. Mối liên quan giữa thoái hóa collagen và sự mất ổn định khớp là đặc điểm của thoái hóa khớp, dẫn đến sự thay đổi mô bệnh học, làm cho mô hình thoái hóa khớp gây bởi collagenase trở thành mô hình hữu ích

để nghiên cứu sinh lý bệnh cấu trúc thoái hóa khớp. Mô hình này cũng thích hợp để đánh giá triệu chứng đau trong thoái hóa khớp ở chuột cống thông qua chuyển động và chịu lực của khớp bị ảnh hưởng. Tuy nhiên, các mô hình gây THK bằng các enzym được một số nhà nghiên cứu cho rằng chưa đạt được ổn định và đồng đều ở tất cả các động vật thí nghiệm [125],[127],[128].

Bảng 1.5. Một số phương pháp gây THK phù hợp loài động vật [128]

Phương pháp	Loài	Đặc điểm
THK tự phát	Chuột nhắt (DBA/1, STR/ORT, C57BL/6,C57), chuột lang (Hartley, Duncan-Hartley), khỉ (Rhesus, Cynomolgus)	Tỷ lệ thay đổi tùy giống và giới tính Mô hình gây sau 3 tháng Tuổi thọ cao
Di truyền	Chuột nhắt	Gây mô hình bởi một số gen đặc biệt không giống bệnh lý trên người
Tiêm khớp (steroid, collagenase, papain, iodoacetat, cytokin)	Chuột nhắt, chuột cống, thỏ, ngựa	Thường gây viêm tại chỗ Tiêm các enzym có thể không giống bệnh lý trên người
Cắt dây chằng chéo trước	Chuột cống, chuột lang, thỏ, mèo, chó	Bệnh tiến triển nhanh và nặng hơn trên người
Cắt bỏ một phần sụn khớp	Chuột cống, chuột lang, thỏ, chó, cừu, khỉ	Bệnh tiến triển nhanh và nặng hơn trên người
Phẫu thuật kết hợp	Chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, thỏ	Kết hợp cắt dây chằng chéo trước/dây chằng trong gói/cắt bỏ một phần sụn khớp
Chịu lực tác động mạnh, cắt rạch sụn	Thỏ, chó	Chấn thương cấp trực tiếp vào khớp

Mô hình thực nghiệm được sử dụng phổ biến nhất là dùng chất ức chế chuyển hóa mono-iodoacetate (MIA) tiêm vào khớp gối của chuột cống. Hợp chất này ức chế hoạt tính của glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ở sụn khớp, dẫn đến sự gián đoạn của quá trình chuyển hóa năng lượng từ thủy phân đường, các quá trình tổng

hợp và thậm chí là gây chết tế bào [134], gây ra sự tiến triển lặp đi lặp lại của sự tăng sản hoạt dịch và xâm nhập tế bào viêm, từ đó làm mất dần lớp sụn khớp và tổn thương cấu trúc xương dưới sụn, tạo ra tình trạng bệnh tương tự thoái hóa khớp trên lâm sàng [135]. Mô hình gây thoái hóa khớp bằng MIA được dùng rộng rãi trong các nghiên cứu liên quan đến phản xạ đau và các thuốc giảm đau, mô hình này có ưu điểm là dễ tiến hành và nhanh chóng cho kết quả như ý, mô phỏng tốt nhất mô bệnh học của khớp viêm và thoái hóa trên người. Mức độ nặng của khớp viêm phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tiêm MIA [136],[137],[138]. Mô hình sử dụng MIA thường được lựa chọn trong nghiên cứu tác dụng của các thuốc bảo vệ sụn khớp [139].

1.3.3. Lựa chọn động vật thí nghiệm

Lựa chọn động vật thí nghiệm phù hợp với mô hình nghiên cứu là một việc rất quan trọng, quyết định tính chính xác và thành công của nghiên cứu. Mỗi loại động vật thích hợp với một vài mô hình nghiên cứu khác nhau và có những ưu, nhược điểm nhất định.

Bảng 1.6. Ưu và nhược điểm của một số động vật trong mô hình THK [128]

Loài	Ưu điểm	Nhược điểm
Chuột nhắt	Dễ làm, dễ quản lý. Giá thành rẻ Bệnh khởi phát nhanh Có thể biến đổi di truyền Lượng thuốc thử ít	Kích thước nhỏ Khác biệt về phân tử Khó lấy được dịch khớp Tỷ lệ tế bào với mô đệm ở sụn cao Khó thu được các chỉ số về lâm sàng Khó dùng phương pháp phẫu thuật
Chuột cống	Tương tự chuột nhắt. Có thể làm được mô hình đánh giá đau	Tương tự chuột nhắt Phẫu thuật dễ hơn
Chuột lang	Dễ làm, dễ quản lý Bệnh tự phát	Tương tự chuột nhắt Chưa có bộ gen đầy đủ Chung chuột không có sẵn
Thỏ	Dễ làm, dễ tính liều Có sẵn ở các nước Dễ phẫu thuật	Dễ mắc bệnh khác. Sụn khớp dễ thoái hóa và nhanh phục hồi. Bộ gen chưa hoàn chỉnh

Mèo	Kích thước khớp lớn (dễ lấy mô, dịch khớp) Bộ gen hoàn chỉnh Có thể điều trị nội khớp	Khó khăn về đạo đức Khó quản lý/ Tồn kém Bộ gen thay đổi
Chó	Kích thước khớp lớn Dễ làm, huấn luyện được Điều trị tiêm nội khớp Dễ thu các triệu chứng lâm sàng Bộ gen hoàn chỉnh	Khó khăn về đạo đức Khó quản lý/ Tồn kém Bộ gen thay đổi

1.3.4. Một số chỉ số đánh giá

1.3.4.1. Các chỉ số về hình ảnh

Kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh sử dụng thang điểm Kellgren-Lawrence từ lâu đã được dùng để chẩn đoán và theo dõi tiến triển của thoái hóa khớp trên người. Tuy nhiên, việc áp dụng thang điểm này trên mô hình động vật vẫn còn nhiều khó khăn, chưa được chuẩn hóa và chấp nhận rộng rãi [140]. Các kỹ thuật thăm dò hình ảnh áp dụng trên người gồm có: siêu âm khớp, chụp X quang, CT và cộng hưởng từ nhưng không phải tất cả các kỹ thuật này đều có thể sử dụng trên động vật thí nghiệm.

Các phương pháp chẩn đoán hình ảnh mới hiện nay được áp dụng trong chẩn đoán thoái hóa khớp đặc biệt là cộng hưởng từ và microCT đã cung cấp các phương tiện để theo dõi và phát hiện những thay đổi sớm của bệnh bao gồm: dày sụn, biến đổi mô đệm, viêm màng hoạt dịch, thay đổi cấu trúc xương và mô mềm quanh khớp. Cộng hưởng từ đã được sử dụng trên các mô hình động vật như chuột cống hay chuột lang để đánh giá sự biến đổi khớp và các mô xung quanh liên quan đến sự tiến triển của thoái hóa khớp.

Nghiên cứu các chỉ số trong cộng hưởng từ nhằm phát triển các kỹ thuật phục vụ chẩn đoán lâm sàng và theo dõi không xâm nhập, từ đó có các can thiệp sớm để hạn chế quá trình tiến triển của bệnh. Phương pháp này hiện chỉ thực hiện ở một số quốc gia có nền y học phát triển và chưa có tiêu chuẩn vàng với các chỉ số hình ảnh cho phép nghiên cứu về thoái hóa khớp trên người, cũng như trên mô hình động vật [140].

Ngoài các phương pháp chẩn đoán hình ảnh kể trên, một phương pháp dễ thực

hiện hơn và cho giá trị chính xác trong chẩn đoán xác định thoái hóa khớp cũng như theo dõi điều trị là giải phẫu mô bệnh học khớp viêm. Tuy nhiên phương pháp này chỉ thực hiện được trên mô hình động vật thí nghiệm, không thực hiện trên con người. Các nhà nghiên cứu đã xây dựng các bảng điểm đánh giá cụ thể các tiêu chí trong thoái hóa khớp, cho phép bán định lượng các chỉ số này để đưa vào thống kê.

1.3.4.2. Các chỉ số sinh học

Việc đưa các chỉ số sinh học đặc trưng vào chẩn đoán bệnh thoái hóa khớp rất cần thiết để xác định nguy cơ mắc bệnh của bệnh nhân và nghiên cứu phương pháp điều trị, phòng tránh, giảm tiến triển của bệnh. Các chỉ số sinh học trong dịch khớp, huyết thanh, nước tiểu cho phép đánh giá quá trình bệnh khởi phát cũng như tiến triển [141].

Hiểu biết về sự thay đổi các chỉ số sinh học đặc trưng cho thoái hóa khớp sẽ phục vụ nhiều mục đích trong các mô hình thực nghiệm. Mục tiêu của phân tích các chỉ số này là nâng cao hiểu biết về nguy cơ gây bệnh, tỷ lệ mắc, tiến triển, đáp ứng với điều trị. Các chỉ số sinh học trên mô hình thực nghiệm cũng có thể so với các chỉ số trên người từ đó chọn ra mô hình chính xác nhất thể hiện được tính chất của bệnh.

Phân tích chỉ số sinh học trong huyết thanh và nước tiểu bị ảnh hưởng bởi một vài yếu tố khác trong cơ thể. Phân tích dịch khớp có nhiều ưu điểm hơn vì dịch khớp chỉ có tại vị trí khớp viêm. Dù vậy, phân tích dịch khớp cũng có nhược điểm, khi tiến hành hút dịch lặp đi lặp lại, có hay không kèm rửa khe khớp cũng ảnh hưởng tới quá trình viêm trong khớp, đặc biệt, khó khăn nhất của phương pháp này là không thu được dịch khớp ở các động vật có kích thước nhỏ. Một phương pháp đã được công bố có thể lấy được lượng rất nhỏ dịch khớp thông qua dùng giấy hoặc vật liệu alginate. Tuy nhiên đây là phương pháp đòi hỏi độ chính xác và kỹ thuật rất cao, hiện vẫn chưa được sử dụng phổ biến [142].

Các cytokin (IL-1,6,8), TNF – α là các chỉ số đánh giá đặc hiệu cho bệnh lý thoái hóa khớp, như đã trình bày trong phần cơ chế bệnh sinh.

1.3.4.3. Đánh giá đau, chức năng vận động

Hiện nay, tiêu chuẩn đánh giá đau, phân tích dáng đi và đánh giá chức năng vận động trong mô hình thoái hóa khớp ở động vật vẫn chưa được xây dựng hoàn thiện.

Đây là một trong những lĩnh vực hữu ích liên quan tới việc lượng giá các triệu chứng trên lâm sàng ở bệnh nhân. Đánh giá triệu chứng đau và vận động ở động vật thí nghiệm là một thách thức, cần phải được nghiên cứu sâu [140].

Các mô hình đánh giá triệu chứng đau trên mô hình thoái hóa khớp thực nghiệm hiện nay gồm có: mô hình sử dụng nhiệt độ, mô hình sử dụng sợi von Frey đánh giá ngưỡng rút chân của chuột ở bên khớp viêm [143]. Mô hình gây thoái hóa khớp sử dụng các hóa chất tiêm trực tiếp vào khớp (đặc biệt là mono-iodoacetat) thích hợp với đánh giá các triệu chứng đau hơn là các mô hình dùng phương pháp phẫu thuật tác động trực tiếp vào khớp.

Phân tích đáng đi là phương pháp đánh giá khả năng phối hợp vận động và chịu lực lên hai chân sau ở động vật. Phương pháp phức tạp này thực hiện bởi kỹ thuật đo huỳnh quang trên máy chuyên dụng [144]. Hiện vẫn chưa có phương pháp chuẩn để phân tích đáng đi trong mô hình viêm khớp động vật. Một điểm đáng chú ý nữa là động vật thường đi bằng bốn chân, nên trọng lực được dàn đều lên các chân và có sự bù trừ, do đó đánh giá đáng đi trên động vật cần phải kỹ lưỡng và phù hợp, cần thiết phải xây dựng một hệ quy chuẩn [140].

Từ các phương pháp trên, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn mô hình thoái hóa khớp gối gây bởi MIA trên chuột cống là thích hợp tại Việt Nam, với những phương pháp đánh giá hiệu quả điều trị gồm:

- Đánh giá tác dụng giảm đau, chống viêm trên động vật bình thường
- Đánh giá tác dụng chống viêm dựa trên đường kính khớp gối của chuột thoái hóa khớp.
- Đánh giá tác dụng giảm đau và cải thiện hoạt động khớp gối thông qua phương pháp *Randall – Selitto*, máy rê kim, máy Hot plate.
- Đánh giá tác dụng cải thiện cấu trúc sụn khớp thông qua bảng điểm tổn thương giải phẫu bệnh.
- Sơ bộ xác định cơ chế tác dụng thông qua nồng độ các cytokin đặc hiệu của THK gồm IL-1 β và TNF- α .

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Viên hoàn cứng TD0015 (TD0015) (gói 5g), thành phần gồm:

Bảng 2.1. Thành phần của TD0015

TT	Tên dược liệu làm thuốc	Bộ phận dùng	Tên khoa học bộ phận dùng	Tỷ lệ	Tiêu chuẩn chất lượng
1	Hoàng bá	Vỏ thân, vỏ rễ của cây Hoàng Bì Thụ hoặc cây Hoàng Nhiệt	<i>Cortex Phellodendri amurensi</i>	2.26	Dược điển Việt Nam V
2	Cam thảo	Rễ cây Cam thảo	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	0.12	
3	Đỗ trọng	Vỏ thân phơi khô của cây Đỗ trọng	<i>Cortex Eucommiae</i>	0.47	
4	Ngưu tất	Rễ phơi khô của cây Ngưu tất	<i>Radix Archiranthis bidentatae</i>	0.03	
5	Phòng phong	Rễ phơi khô của cây Phòng Phong	<i>Radix Ledebouriellae</i>	0.23	
6	Phục linh	Nấm mọc ở đầu rễ hay bên rễ cây thông	<i>Poria Cocos</i>	0.47	
7	Sinh địa	Củ tươi hay phơi khô của cây Sinh Địa	<i>Rehmannia glutinosa</i>	0.70	
8	Tang ký sinh	Cây tầm gửi trên cây Dâu	<i>Ramunlus Loranthi</i>	0.23	
9	Tần giao	Rễ phơi khô của cây Tần Giao	<i>Radix gentianae Macrophyllae</i>	0.23	

10	Tri mẫu	Thân rễ phơi khô của cây Tri mẫu	<i>Anemarrhena aspheloides</i>	0.31
11	Hoa đào	Hoa của cây Đào	<i>Prunus persica</i>	0.26
12	Trần bì	Vỏ quýt	<i>Citrus deliciosa</i>	0.22
13	Bạch thược	Rễ cạo bỏ vỏ ngoài của cây Thược dược	<i>Radix Paeoniae Alba</i>	0.77
14	Đảng sâm	Rễ củ cây Đảng sâm	<i>Radix Codonopsis</i>	0.34
15	Độc hoạt	Rễ phơi khô của cây Độc hoạt	<i>Radix Angelicae pubescentis</i>	0.17
16	Đương quy	Rễ phơi hoặc sấy khô của cây Đương Quy	<i>Radix Angenicae sinensis</i>	0.34
17	Quế chi	Cành nhỏ của nhiều loại quế	<i>Ramulus Cinamomi</i>	0.08
18	Tế tân	Rễ cây Tế tân	<i>Asarum hetertropoides</i>	0.08
19	Xuyên khung	Thân rễ phơi khô của cây Xuyên khung	<i>Rhizoma Ligustici wallichii</i>	0.17
20	Quy bản	Yếm con rùa phơi khô, sao vàng	<i>Chinemys recvesil</i>	2.97
21	Cao xương			0.7

- Nơi sản xuất: Công ty Cổ phần Sao Thái Dương, đạt tiêu chuẩn cơ sở (Phụ lục 2)
- Số lô sản xuất: 0115
- Số công bố tiêu chuẩn: 6937/2012/YT-CNTC
- Quy trình sản xuất sản phẩm được trình bày trong Phụ lục 3
- Liều dùng trên người: uống 2 gói/ngày, tương đương 10g/ngày
- Thuốc được pha trong dung môi là nước cất trước khi cho động vật thí nghiệm uống.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Bảng 2.2. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu	Đối tượng	Đặc điểm
Độc tính cấp	Chuột nhắt trắng chủng <i>Swiss</i> (Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp).	Cả 2 giống, khỏe mạnh trọng lượng 20 ± 2 g.
Độc tính bán trường diễn Tác dụng chống viêm cấp	Chuột cống trắng chủng <i>Wistar</i> (Học viện Quân y cung cấp)	Cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 200 ± 20 g
Tác dụng giảm đau Tác dụng chống viêm mạn	Chuột nhắt trắng chủng <i>Swiss</i> (Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp).	Cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 25 ± 2 g.
Tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối	Chuột cống trắng chủng <i>Wistar</i> (Học viện Quân y cung cấp)	Cả 2 giống, khỏe mạnh, trọng lượng 250 ± 20 g

Động vật thí nghiệm được nuôi 7 ngày trước khi tiến hành nghiên cứu để thích nghi với môi trường và điều kiện của phòng thí nghiệm.

Trước và trong suốt quá trình nghiên cứu, động vật thí nghiệm được nuôi bằng thức ăn chuẩn do Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp, uống nước tự do.

2.3. Hóa chất, thuốc, máy và thiết bị phục vụ nghiên cứu

2.3.1. Hóa chất và thuốc

- Aspirin, biệt dược Aspirin-100 viên nén bao tan trong ruột 100mg của Công ty Cổ phần Traphaco, Việt Nam sản xuất.

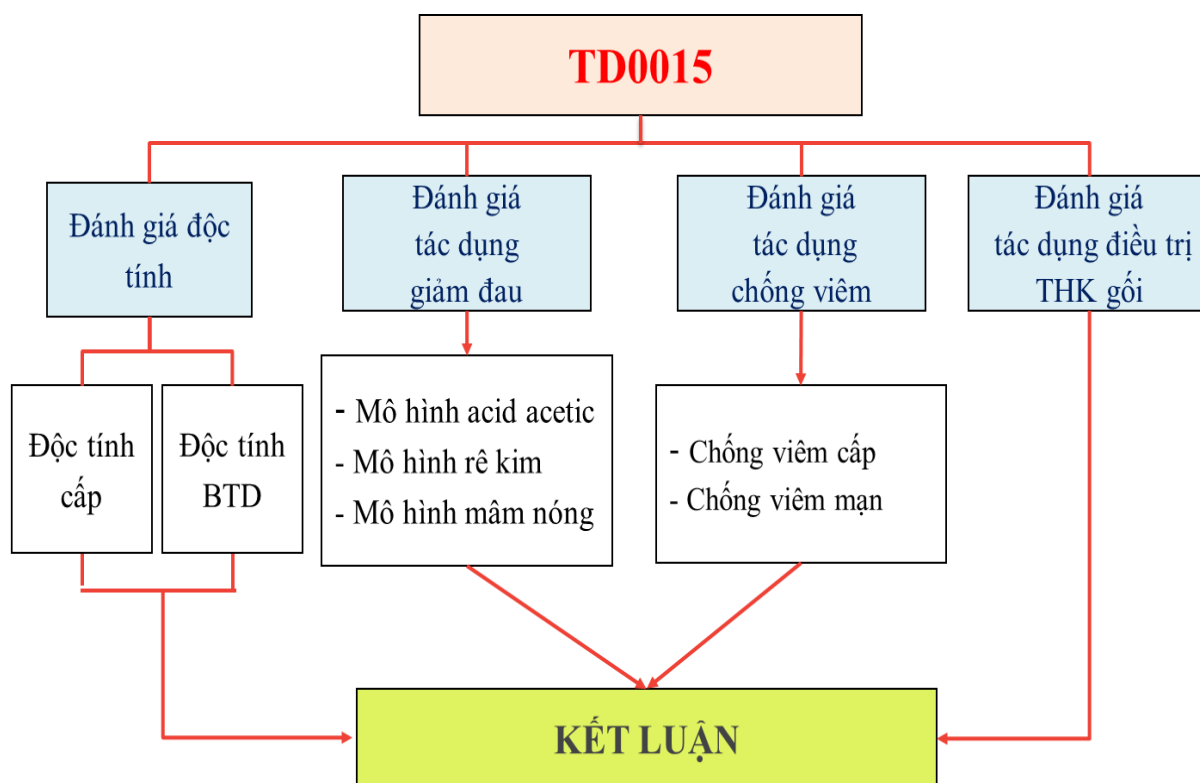
- Methylprednisolon, biệt dược Medrol viên nén 4mg, của hãng *Pfizer* (Ý)

- Diclofenac, biệt dược Voltaren 50, viên nén 50mg của Công ty *Novartis* (Thụy Sĩ) sản xuất
 - Codein phosphat do Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp.
 - Dung dịch acid acetic của hãng *Guangdong Guanghua Sci-Tech Co., Ltd* (Trung Quốc)
 - Bột carrageenin của hãng *BDH Chemicals Ltd.* (Anh)
 - Sợi amiant
 - Monosodium-iodoacetate lọ 25G do hãng *Sigma Aldrich* (Singapore) cung cấp
 - Natri clorid 0,9% do hãng *Braun*, Việt Nam sản xuất
 - Cồn 70 độ của hãng *HDPharma* (Việt Nam)
 - Dung dịch sát khuẩn Betadin của hãng *Mundipharma Pharmaceuticals Ltd.* (Síp)
 - Kit TNF-alpha code SEA133RA dành cho chuột cống của hãng *Cloud Clone Corp.* (USA)
 - Kit IL-1beta code SEA563RA dành cho chuột cống của hãng *Cloud Clone Corp.* (USA)
 - Kit định lượng các enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT (alanin aminotransferase), AST (aspartat aminotransferase), bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần, creatinin của hãng *Dialab* (Áo), định lượng trên máy sinh hóa XC-55 Chemistry Analyzer (Trung Quốc)
 - Các dung dịch xét nghiệm máu của hãng *Exigo*, định lượng trên máy huyết học Exigo, Thụy Điển.
 - Các hoá chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học.
- 2.3.2. Máy và thiết bị phục vụ nghiên cứu**
- Máy xét nghiệm sinh hóa máu XC-55 Chemistry Analyzer của hãng *Meikang medical* (Trung Quốc).

- Máy xét nghiệm huyết học chuyên dụng Exigo – Boule Medical AB của hãng *Exigo* (Thụy Điển)
- Hệ thống xét nghiệm ELISA của hãng *Biotek* (Mỹ)
- Máy Hot plate model – DS37 của hãng *Ugo-Basile* (Ý)
- Máy đo phản ứng đau Dynamic Plantar Aesthesiometer 37450 của hãng *Ugo Basile* (Ý)
- Thuốc điện tử đo độ dày (Độ chính xác: 0,02mm): MC 555 của hãng *Hangzhou tools and measuring tools Co., Ltd* (Trung Quốc)
- Máy li tâm *HETECH* (Đức)
- Cân trọng lượng Precisa LX2200c (độ chính xác 0,01g) (Thụy Sĩ)
- Máy đo ngưỡng đau Analgesy meter 7200 của hãng *Ugo Basile* (Ý)
- Camera Canon Ixus 120IS (Nhật Bản)
- Phần mềm phân tích hình ảnh VLC media player.
- Kim chuyên dụng cho chuột nhắt/chuột cống uống thuốc
- Dụng cụ và vật liệu dùng cho phẫu thuật: kính lúp, dao mổ, kéo, panh, kim chỉ, bông, băng, gạc, bơm tiêm...

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ nghiên cứu được tóm tắt trong hình 2.1



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.4.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của viên hoàn cứng TD0015 trên động vật thực nghiệm

2.4.1.1. Nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức y tế thế giới và hướng dẫn của Bộ y tế Việt Nam về thuốc có nguồn gốc dược liệu. Xác định LD₅₀ của thuốc thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [145],[146],[147]

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

đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc nghiên cứu.

Cách pha thuốc trong đánh giá độc tính cấp: Lấy 20 gói, mỗi gói 5 gam, nghiền trong cối sứ, thêm nước cất thành 200 ml vừa đủ. Như vậy 1 ml chứa 0,5 gam dược liệu. Đây là dung dịch đậm đặc nhất có thể cho chuột nhắt trắng uống bằng kim chuyên dụng. Dung dịch đậm đặc này dùng để nghiên cứu độc tính cấp tính và xác định LD50.

2.4.1.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng theo đường uống theo hướng dẫn của WHO [147]

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

- Lô chứng: uống nước cất 1 ml/100g/ngày

- Lô trị 1: uống TD0015 liều 1,2g/kg/ngày (tương đương liều lâm sàng tính trên chuột cống hệ số 6)

- Lô trị 2: uống TD0015 liều 3,6g/kg/ngày (gấp 3 liều lâm sàng)

Chuột được uống nước hoặc thuốc trong 90 ngày, mỗi ngày một lần vào buổi sáng. Thuốc thử được nghiền trong cối sứ, pha thuốc với nước cất trước khi cho chuột uống.

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

- Tình trạng chung, thể trọng của chuột.

- Đánh giá chức năng tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.

- Đánh giá chức năng gan thông qua chất chuyển hoá trong máu: bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol toàn phần.

- Đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ enzym trong máu: ALT, AST.

- Đánh giá chức năng lọc cầu thận thông qua định lượng creatinin trong máu.

Các thông số theo dõi được kiểm tra tại 4 thời điểm: trước khi uống thuốc, sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống thuốc.

- Mô bệnh học:

Sau 90 ngày uống thuốc, 30% số chuột ở mỗi lô được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan và kiểm tra cấu trúc vi thể gan, thận. Các xét nghiệm vi thể được thực hiện tại Trung tâm nghiên cứu phát hiện sớm Ung thư - Liên hiệp các Hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam, do PGS.TS Lê Đình Roanh đọc kết quả

2.4.2. Đánh giá tác dụng giảm đau của viên hoàn cứng TD0015

2.4.2.1. Đánh giá tác dụng giảm đau bằng máy Hot plate

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (chứng sinh học): uống nước cất liều 0,2ml/10g/ngày.
- Lô 2: uống codein phosphat 20 mg/kg.
- Lô 3: uống TD0015 liều 2,4g/kg/ngày (tương đương liều lâm sàng, hệ số ngoại suy 12).
- Lô 4: uống TD0015 liều 7,2g/kg/ngày (gấp 3 liều lâm sàng)

Chuột các lô được uống nước cất hoặc thuốc thử mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, với thể tích 0,2 mL/10g/ngày trong 5 ngày liên tục. Thuốc thử được nghiền trong cối sứ, pha thuốc với nước cất trước khi cho chuột uống.

Đo thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột trước khi uống thuốc và sau khi uống thuốc lần cuối cùng 1 giờ. Đặt chuột lên mâm nóng (Hot plate) luôn duy trì ở nhiệt độ $55 \pm 1^{\circ}\text{C}$ bằng hệ thống ổn nhiệt. Tính thời gian từ lúc đặt chuột lên mâm nóng đến khi chuột liếm chân sau. Loại bỏ những chuột phản ứng quá nhanh (trước 8 giây) hoặc quá chậm (sau 30 giây). So sánh thời gian phản ứng với kích thích nhiệt trước và sau khi uống thuốc thử [148],[149],[150].

2.4.2.2. *Đánh giá tác dụng giảm đau của TD0015 bằng máy đo ngưỡng đau*

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con

- Lô 1 (chứng sinh học): uống nước cất liều 0,2ml/10g/ngày
- Lô 2: uống codein phosphat 20 mg/kg
- Lô 3: uống TD0015 liều 2,4g/kg/ngày (tương đương liều lâm sàng, hệ số ngoại suy 12).
- Lô 4: uống TD0015 liều 7,2g/kg/ngày (gấp 3 liều lâm sàng)

Chuột các lô được uống nước cất hoặc thuốc thử mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, với thể tích 0,2 mL/10g/ngày trong 5 ngày liên tục. Thuốc thử được nghiền trong cối sứ, pha thuốc với nước cất trước khi cho chuột uống.

Đo thời gian phản ứng với đau của chuột và lực gây đau đối với chuột (sử dụng máy Dynamic Plantar Aesthesiometer 37450 của Ugo Basile) trước khi uống thuốc và sau khi uống thuốc lần cuối cùng 1 giờ. So sánh thời gian phản ứng với kích thích đau trước và sau khi uống thuốc thử [149],[150].

2.4.2.3. *Đánh giá tác dụng giảm đau của TD0015 với phương pháp gây quặn đau bằng acid acetic*

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (chứng): uống nước cất liều 0,2ml/10g/ngày.
- Lô 2 (thuốc đối chứng): uống aspirin 150 mg/kg
- Lô 3: uống TD0015 liều 2,4g/kg/ngày (tương đương liều lâm sàng, hệ số ngoại suy 12)
- Lô 4: uống TD0015 liều 7,2g/kg/ngày (gấp 3 liều lâm sàng)

Chuột các lô được uống nước cất hoặc thuốc mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng, với thể tích 0,2 mL/10g/ngày trong 5 ngày liên tục

Ngày cuối cùng, sau khi uống thuốc 1 giờ, tiêm vào ổ bụng mỗi chuột 0,2 mL dung dịch acid acetic 1%. Đếm số cơn quặn đau của từng chuột trong mỗi 5 phút cho đến phút thứ 30 sau khi tiêm acid acetic [148],[149],[150].

2.4.3. Đánh giá tác dụng chống viêm

2.4.3.1. Đánh giá tác dụng chống viêm cấp

* Đánh giá tác dụng chống viêm cấp của TD0015 trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con.

- Lô 1: (đối chứng): uống nước cất, 1ml/100g.
- Lô 2: uống aspirin liều 200 mg/kg.
- Lô 3: uống TD0015 liều 1,2g/kg/ngày (tương đương lâm sàng, hệ số ngoại suy 6)
- Lô 4: uống TD0015 liều 3,6g/kg/ngày (gấp 3 liều lâm sàng)

Chuột được uống thuốc 5 ngày liên tục trước khi gây viêm. Thuốc thử được nghiền trong cối sứ, pha thuốc với nước cất trước khi cho chuột uống. Ngày thứ 5, sau khi uống thuốc thử 1 giờ, gây viêm bằng cách tiêm carrageenin 1% (pha trong nước muối sinh lý) 0,05 ml/chuột vào gan bàn chân sau, bên phải của chuột.

Đo thể tích chân chuột (đến khớp cổ chân) bằng dụng cụ chuyên biệt vào các thời điểm: trước khi gây viêm (V₀); sau khi gây viêm 2 giờ (V₂), 4 giờ (V₄), 6 giờ (V₆) và 24 giờ (V₂₄).

Kết quả được tính theo công thức của Fontaine [151],[152],[153]

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

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

Trong đó: V₀ là thể tích chân chuột trước khi gây viêm

V_t là thể tích chân chuột sau khi gây viêm

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

$$I\% = \frac{\overline{\Delta V}_c\% - \overline{\Delta V}_t\%}{\overline{\Delta V}_0\%} \times 100$$

Trong đó: $\overline{\Delta V}_c\%$: trung bình độ tăng thể tích chân chuột ở lô đối chứng

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

* Đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây viêm màng bụng chuột

Chuột cống trắng được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con.

Các lô chuột được uống nước, thuốc chứng dương hoặc thuốc thử tương tự như trong thí nghiệm đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin. Thuốc thử được nghiền trong cối sứ, pha thuốc với nước cất trước khi cho chuột uống.

Chuột được uống nước hoặc thuốc 5 ngày liên tục trước khi gây viêm. Ngày thứ 5, sau khi uống thuốc thử 1 giờ, gây viêm màng bụng chuột bằng dung dịch carrageenin 0,05g + formaldehyd 1,5 ml, pha vừa đủ trong 100ml nước muối sinh lý, với thể tích tiêm 1ml/100g vào ổ bụng mỗi chuột.

Sau gây viêm 24 giờ, mở ổ bụng chuột hút dịch rỉ viêm, đo thể tích, đếm số lượng bạch cầu/ml dịch rỉ viêm và định lượng protein trong dịch rỉ viêm [151].

2.4.3.2. *Đánh giá tác dụng chống viêm mạn bằng phương pháp tạo u hạt amiant*

Chuột nhắt trắng, được chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô 10 con.

- Lô 1: (đối chứng): uống nước cất, 0,2 ml/10 g.
- Lô 2: uống methylprednisolon liều 10mg/kg.
- Lô 3: uống TD0015 liều 2,4g/kg/ngày (tương đương liều lâm sàng, tính theo hệ số ngoại suy 12)
- Lô 4: uống TD0015 liều 7,2g/kg/ngày (gấp 3 liều lâm sàng)

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

Sau khi cấy u hạt, các chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử liên tục trong 10 ngày. Ngày thứ 11 tiến hành giết chuột, bóc tách khối u hạt và cân tươi. Chọn ngẫu nhiên mỗi lô 3 khối u hạt để làm xét nghiệm giải phẫu bệnh vi thể. Các khối u hạt còn lại được sấy khô ở nhiệt độ 56°C trong 18 giờ. Cân trọng lượng u hạt sau khi đã được sấy khô [149],[150],[151],[152].

2.4.4. Đánh giá tác dụng điều trị THK gối của viên hoàn cứng TD0015

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

Lô 1A (chứng sinh học): tiêm vào khe khớp nước muối sinh lý, uống nước cất 1ml/100g

Lô 1B (chứng sinh học): tiêm vào khe khớp nước muối sinh lý, uống nước cất 1ml/100g

Lô 2A (mô hình): gây thoái hóa khớp bằng tiêm vào khe khớp MIA 3mg/khớp, uống nước cất 1ml/100g

Lô 2B (mô hình): gây thoái hóa khớp bằng tiêm vào khe khớp MIA 3mg/khớp, uống nước cất 1ml/100g

Lô 3 (chứng dương): gây thoái hóa khớp bằng tiêm vào khe khớp MIA 3mg/khớp, uống diclofenac 3mg/kg

Lô 4 (thuốc thử): gây thoái hóa khớp bằng tiêm vào khe khớp MIA 3mg/khớp, uống TD0015 liều 1,2g/kg/ngày (tương đương liều lâm sàng tính trên chuột cống hệ số 6)

Lô 5 (thuốc thử): gây thoái hóa khớp bằng tiêm vào khe khớp MIA 3mg/khớp, uống TD0015 liều 3,6g/kg/ngày (gấp 3 liều lâm sàng)

Chuột ở các lô được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm 4 tuần trước khi đưa vào nghiên cứu. Tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu, chuột ở lô 2 đến lô 5 được

gây mô hình thoái hóa khớp thực nghiệm theo phương pháp của Kim và cộng sự [139] bằng cách tiêm dung dịch MIA liều 3mg/khớp vào khớp gối bên phải của từng chuột. Riêng chuột lô chứng sinh học được tiêm nước muối sinh lý là dung môi pha thuốc vào khớp gối bên phải của từng chuột. Thể tích dung dịch tiêm vào khớp là 50 μ l/khớp.

Sau khi gây mô hình bằng tiêm MIA 3mg/khớp, các lô 1 và 2 được uống nước, lô 3 uống diclofenac liều 5mg/kg, lô 4 và 5 được uống TD0015 liều 1,2g/kg/ngày và 3,6g/kg/ngày tương ứng. Các lô chuột uống thuốc và nước 1 lần/ngày trong 6 tuần liên tục. Thuốc thử được nghiền trong cối sứ, pha thuốc với nước cất trước khi cho chuột uống.

Các chỉ số đánh giá

2.4.4.1. Đường kính khớp gối

Đường kính khớp gối được đo bằng thước điện tử chuyên dụng, tính đường kính lớn nhất đo được tại khớp gối phải, đo vào các thời điểm: trước nghiên cứu, sau tiêm MIA và uống thuốc 3 ngày, 5 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần và 6 tuần. Chỉ số đánh giá là độ tăng đường kính khớp gối ở mỗi thời điểm nghiên cứu so với trước nghiên cứu, đơn vị là milimet (mm) [154]

$$\Delta d = d_t - d_0$$

d: đường kính khớp gối (mm)

Δd : độ tăng đường kính khớp gối giữa thời điểm t và trước nghiên cứu (mm)

2.4.4.2. Tác dụng giảm đau, cải thiện hoạt động khớp gối

** Tác dụng giảm đau tại khớp của TD0015 bằng máy đo ngưỡng đau theo phương pháp Randall Selitto*

Nghiên cứu được tiến hành dựa trên phương pháp của *Randall Selitto* [149]. Sử dụng máy Analgesy meter 7200 của Ugo Basile để đo lực gây đau tại vị trí khớp gối chân sau, bên phải (được tiêm MIA) của chuột ở các lô, ở các thời điểm trước nghiên cứu, sau tiêm MIA và uống thuốc 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần và 6 tuần, so sánh giữa các lô chuột với nhau.

** Tác dụng cải thiện hoạt động khớp gối của TD0015 bằng máy đo ngưỡng đau sử dụng kim Von frey*

Đo thời gian phản ứng với đau của chuột và lực gây đau đối với chuột (sử dụng máy Dynamic Plantar Aesthesiometer 37450 của Ugo Basile, thông qua thời gian và lực gây đau làm chuột nhấc chân khỏi kim Von frey) tại vị trí gan chân sau, bên phải của chuột trước nghiên cứu, sau tiêm MIA và uống thuốc 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần và 6 tuần, so sánh giữa các lô chuột với nhau. Từ đó đánh giá tác dụng giảm đau và khả năng vận động khớp gối phải của chuột [155].

** Tác dụng cải thiện hoạt động khớp gối của TD0015 bằng phương pháp sử dụng máy Hot plate*

Nghiên cứu gồm hai giai đoạn: huấn luyện và đánh giá hiệu quả [148], [149],[150].

Giai đoạn huấn luyện: thời gian huấn luyện trong 3 tuần, chuột ở cả 5 lô được làm quen với máy *Hot plate*, mỗi chuột được làm quen 3 lần, mỗi lần cách nhau 1 tuần, mục đích để chuột hình thành phản xạ nhảy khỏi mâm nóng khi đến ngưỡng đau do nhiệt. Sau 3 tuần, loại bỏ các chuột không có phản xạ nhảy khỏi mâm nóng.

Nguyên lý của phương pháp sử dụng máy *Hot plate* (mâm nóng): Sử dụng nhiệt độ trên mâm nóng (tiếp xúc trực tiếp) tác động lên gan bàn chân chuột. Nhiệt độ được sử dụng là 55 ± 1 độ C. Sau một thời gian kể khi tiếp xúc với mâm nóng, chuột sẽ xuất hiện các phản xạ tránh đau, như liếm chân, nhấc chân sau, nhảy thoát khỏi mâm nóng [148],[150]. Trong nghiên cứu này chọn hoạt động nhảy thoát khỏi mâm nóng do cần đánh giá sự vận động của khớp gối chân sau.

Giai đoạn đánh giá hiệu quả: chuột ở cả 5 lô được đánh giá một lần bằng máy *Hot plate* trước khi gây mô hình thoái hóa khớp gối. Sau đó chuột ở các lô được gây mô hình bằng tiêm MIA vào khớp gối phải và uống thuốc tương ứng theo từng lô như trên.

Sự vận động khớp gối của chuột được đánh giá bằng máy Hot plate vào các thời điểm sau tiêm MIA 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần và 6 tuần, thông qua các chỉ số sau:

****Thời gian chuột nhảy khỏi mâm nóng***

Đặt chuột lên mâm nóng (máy Hot plate), luôn duy trì ở nhiệt độ 55 ± 1 độ C bằng hệ thống ổn nhiệt. Thời gian phản ứng với kích thích nhiệt khiến chuột nhảy khỏi mâm nóng (tính bằng giây) được tính từ lúc đặt chuột lên mâm nóng đến khi chuột nhảy bật khỏi mâm nóng và thoát ra ngoài máy Hot plate.

****Độ cao đạt được khi chuột nhảy khỏi mâm nóng***

Hệ thống máy Hot plate đi kèm một ống nhựa hình trụ đường kính 26 cm, cao 30cm, được chia vạch tính chiều cao (cm), độ cao đạt được khi chuột nhảy thành công khỏi mâm nóng xác định là độ cao cực đại chuột chạm hai chân sau vào thành ống và bám vào mép trên thành ống để thoát ra ngoài.

****Số lần nhảy đà (nhảy không thành công) khi chuột nhảy khỏi mâm nóng***

Động tác nhảy không thành công (nhảy đà) là khi chuột dậm nhảy nhưng không đủ lực để bám vào thành ống trụ thoát ra ngoài và rơi xuống mâm nóng do hạn chế vận động của khớp gối. Tính số lần nhảy đà của mỗi chuột ở từng lô và so sánh giữa các lô.

Trong quá trình nghiên cứu, chuột ở các lô đều được mã hóa để đảm bảo tính khách quan. Hoạt động của chuột được ghi lại thông qua hệ thống camera đặt song song với ống trụ của máy Hot plate, số liệu được thu thập bởi một nghiên cứu viên để đảm bảo tính chính xác và đồng nhất.

2.4.4.3. Chỉ số cytokin

Interleukin 1 β và TNF α là các chỉ số đặc hiệu, tăng cao trong thoái hóa khớp. Các chỉ số này được định lượng trong huyết thanh của chuột ở thời điểm sau 6 tuần tiêm MIA bằng kỹ thuật ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), sử dụng bộ KIT IL-1 β (SEA563Ra) và TNF α (SEA133Ra) dành riêng cho chuột cống của hãng

Cloud Clone Corp (Mỹ). Xét nghiệm được thực hiện theo quy trình chuẩn và đánh giá bằng nội kiểm tại Bộ môn Sinh lý bệnh – Miễn dịch, Đại học Y Hà Nội.

2.4.4.4. *Đánh giá mô bệnh học khớp gối*

* Sau 2 tuần tiêm MIA

Đánh giá trên chuột ở lô 1B và 2B sau 2 tuần tiêm MIA. Chuột được gây mê và phẫu thuật tách khớp gối phải khỏi cơ thể, bảo quản trong dung dịch formaldehyd 10%.

* Sau 6 tuần tiêm MIA và uống thuốc

Đánh giá trên chuột tất cả các lô còn lại sau 6 tuần tiêm MIA và uống thuốc. Chuột được gây mê và phẫu thuật tách khớp gối phải khỏi cơ thể, bảo quản trong dung dịch formaldehyd 10%.

Mức độ thoái hóa khớp được đánh giá trên tiêu bản giải phẫu mô bệnh học, dựa vào bảng điểm tổn thương (Bảng 2.3) theo phương pháp *Janusz* và *Al Saffar* [156],[157].

Bảng 2.3. Bảng điểm tổn thương khớp trên giải phẫu bệnh [156],[157]

Tiêu chí	Tổn thương	Điểm
<i>Tổn thương xương dưới sụn</i>	Không có tổn thương dưới sụn với xâm nhập tế bào	0
	Tổn thương dưới sụn tối thiểu, < 5% mâm chày	1
	Tổn thương dưới sụn nhẹ, <15% mâm chày	2
	Tổn thương dưới sụn trung bình, <25% mâm chày	3
	Tổn thương dưới sụn nặng, >25% mâm chày	4
<i>Tổn thương proteoglycan</i>	Không mất lớp nhuộm proteoglycan	0
	Mất tối thiểu	1
	Mất nhẹ	2
	Mất trung bình	3
	Mất nặng	4
<i>Tổn thương tế bào sụn</i>	Không tổn thương	0
	Tổn thương sụn bề mặt	1
	Tổn thương 1/3 trên lớp sụn giữa	2
	Tổn thương lớp sụn giữa	3
	Tổn thương lớp đáy	4
	Tổn thương sụn calci hóa	5
<i>Viêm màng hoạt dịch</i>	Lớp tế bào dày 1-2 tế bào	0
	Lớp tế bào dày 3-5 tế bào	1
	Lớp tế bào dày 6-8 tế bào và/hoặc tăng nhẹ mật độ tế bào	2
	Lớp tế bào dày > 9 tế bào và/hoặc tăng mạnh mật độ tế bào	3

2.5. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại các địa điểm sau:

- Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Y Hà Nội
- Bộ môn Sinh lý bệnh – Miễn dịch, Trường Đại học Y Hà Nội
- Bộ môn Giải phẫu bệnh, Trường Đại học Y Hà Nội

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập bằng phần mềm Excel 2013 và xử lý bằng phần mềm SPSS 20, biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$ (với số liệu phân bố chuẩn). Kiểm định các giá trị bằng t-test Student hoặc test trước-sau. Số liệu tổn thương mô bệnh học khớp gối và số lần nhảy đà của chuột xử lý theo test Mann-Whitney dành cho kiểm định phi tham số, biểu diễn dưới dạng trung vị (tứ phân vị thứ 25 – 75). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của viên hoàn cứng TD0015 trên động vật thực nghiệm.

3.1.1. Độc tính cấp của TD0015 theo đường uống trên chuột nhắt trắng

Chuột nhắt trắng được uống thuốc thử TD0015 từ liều thấp nhất đến liều cao nhất có thể cho uống bằng kim chuyên dụng. Lô chuột đã uống đến liều 37,5g/kg thể trọng chuột. Theo dõi thấy không có chuột nào chết, không xuất hiện triệu chứng bất thường nào trong 72 giờ sau uống thuốc thử và sau 7 ngày. Mối tương quan giữa liều dùng TD0015 và tỷ lệ chuột chết ở các lô tương ứng được thể hiện trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Mối tương quan giữa liều dùng TD0015 và tỷ lệ chuột chết

Lô chuột	n	Liều (g dược liệu/kg thể trọng)	Tỷ lệ chết (%)	Dấu hiệu bất thường khác
Lô 1	10	15,0	0	Không
Lô 2	10	22,5	0	Không
Lô 3	10	30,0	0	Không
Lô 4	10	37,5	0	Không

Số liệu ở bảng 3.1 cho thấy, không có chuột chết ở tất cả các lô, vì vậy chưa xác định được LD50 của TD0015 trên chuột nhắt trắng theo đường uống bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

3.1.2. Độc tính bán trường diễn của viên hoàn cứng TD0015 theo đường uống trên chuột cống trắng.

3.1.2.1. Tình trạng chung và cân nặng của chuột cống trắng

Trong thời gian thí nghiệm, chuột ở lô chứng sinh học và lô uống TD0015 cả 2 liều đều hoạt động bình thường, ăn uống tốt, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, phân khô. Không thấy biểu hiện bất thường ở cả 3 lô chuột trong suốt thời gian nghiên cứu.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của TD0015 lên thể trọng chuột

Thời gian	Lô chứng (n=10)		Lô trị 1 (n=10)		Lô trị 2 (n=10)		p
	Trọng lượng (g)	% tăng trọng lượng	Trọng lượng (g)	% tăng trọng lượng	Trọng lượng (g)	% tăng trọng lượng	
Trước uống thuốc	186,50 ± 21,35		184,50 ± 21,66		187,00 ± 20,58		>0,05
Sau 30 ngày uống thuốc	202,00 ± 16,87	8,3	198,00 ± 27,41	7,3	200,00 ± 25,50	7,0	>0,05
p trước – sau	< 0,05		< 0,05		< 0,05		
Sau 60 ngày uống thuốc	205,00 ± 13,54	9,9	189,50 ± 20,61	2,7	190,50 ± 26,92	1,9	>0,05
p trước – sau	< 0,05		> 0,05		> 0,05		
Sau 90 ngày uống thuốc	219,00 ± 12,87	17,4	191,00 ± 32,81	3,5	188,00 ± 31,55	0,5	<0,05
p trước – sau	< 0,05		> 0,05		> 0,05		

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy:

- Sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày, trọng lượng chuột ở lô chứng sinh học đều tăng so với trước khi nghiên cứu, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

- Sau 30 ngày uống thuốc, cân nặng của chuột các lô uống TD0015 liều 1,2g/kg và 3,6g/kg tăng có ý nghĩa so với trước nghiên cứu ($p < 0,05$), không có sự khác biệt

so với lô chứng. Ở thời điểm sau uống thuốc 60 ngày và 90 ngày, cả 2 lô uống thuốc thử đều có hiện tượng giảm cân so với thời điểm sau 30 ngày và chỉ tăng nhẹ so với trước khi nghiên cứu ($p > 0,05$). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$).

3.1.2.2. Ảnh hưởng của TD0015 lên chức năng tạo máu

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của TD0015 lên số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố ở chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng hồng cầu (T/l)			Hàm lượng huyết sắc tố (G/l)			p
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	7,43 ± 0,61	7,48 ± 0,52	7,26 ± 0,91	12,62 ± 1,57	12,84 ± 1,13	12,40 ± 1,33	
Sau 30 ngày	7,50 ± 0,82	7,06 ± 0,60	7,20 ± 0,78	12,17 ± 1,05	12,20 ± 1,01	11,55 ± 0,71	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 60 ngày	7,71 ± 0,75	7,96 ± 0,75	7,59 ± 0,75	13,05 ± 0,78	12,61 ± 1,36	12,14 ± 1,32	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 90 ngày	7,72 ± 0,82	7,94 ± 0,78	7,51 ± 0,85	12,66 ± 0,56	12,53 ± 1,21	12,37 ± 1,13	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của TD0015 lên hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu ở chuột cống trắng

Thời gian	Hematocrit (%)			Thể tích trung bình hồng cầu (fl)			p
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	36,09 ± 4,75	37,66 ± 3,38	36,06 ± 3,71	48,84 ± 1,47	47,75 ± 4,38	48,61 ± 2,96	
Sau 30 ngày	35,20 ± 3,17	34,86 ± 2,21	33,75 ± 2,37	47,24 ± 4,64	48,18 ± 3,14	45,18 ± 5,49	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 60 ngày	38,08 ± 2,18	36,86 ± 3,97	35,99 ± 3,86	46,64 ± 3,17	46,25 ± 1,76	47,13 ± 2,26	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 90 ngày	37,17 ± 3,50	36,90 ± 3,70	35,79 ± 3,09	47,40 ± 1,78	46,50 ± 2,17	47,42 ± 1,73	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Kết quả ở bảng 3.3 và 3.4 cho thấy: Sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống thuốc liên tục, số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu ở chuột cống trắng cả lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của TD0015 lên số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu ở chuột cống trắng

Thời gian	Số lượng bạch cầu (G/l)			Số lượng tiểu cầu (G/l)			p
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	9,15 ± 0,97	9,64 ± 0,88	9,71 ± 0,98	416,40 ± 85,39	404,50 ± 75,31	410,70 ± 87,66	
Sau 30 ngày	9,08 ± 0,89	8,99 ± 1,57	8,90 ± 1,33	382,10 ± 83,29	382,20 ± 77,92	357,60 ± 77,59	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 60 ngày	9,74 ± 1,43	10,03 ± 1,50	10,33 ± 2,13	372,10 ± 73,60	391,90 ± 62,16	371,60 ± 82,70	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 90 ngày	10,03 ± 1,72	10,29 ± 2,29	10,30 ± 2,10	431,30 ± 70,32	469,10 ± 65,26	456,40 ± 92,88	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của TD0015 lên công thức bạch cầu ở chuột cống trắng

Thời gian	% bạch cầu lympho			% bạch cầu trung tính			p
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	71,44 ± 9,83	66,98 ± 7,24	65,07 ± 6,46	28,56 ± 9,83	33,02 ± 7,24	34,93 ± 6,46	
Sau 30 ngày	70,75 ± 8,94	66,36 ± 6,87	66,73 ± 7,86	29,25 ± 8,94	33,64 ± 6,87	33,27 ± 7,86	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 60 ngày	69,24 ± 7,97	65,71 ± 9,31	63,92 ± 8,23	30,76 ± 7,97	34,29 ± 9,31	36,08 ± 8,23	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 90 ngày	74,70 ± 7,86	73,50 ± 8,00	72,60 ± 7,97	25,30 ± 7,86	26,50 ± 8,00	27,40 ± 7,97	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Kết quả ở các bảng 3.5 và 3.6 cho thấy sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống thuốc liên tục, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu và công thức bạch cầu trên chuột cống trắng ở cả lô trị 1 và lô trị 2 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

3.1.2.3. Ảnh hưởng của TD0015 lên chức năng gan

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của TD0015 lên nồng độ albumin và bilirubin toàn phần trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Nồng độ albumin (g/dl)			Nồng độ bilirubin toàn phần (mmol/l)			p
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	3,62 ± 0,32	3,77 ± 0,49	3,69 ± 0,28	13,39 ± 0,47	13,59 ± 0,31	13,69 ± 0,35	
Sau 30 ngày	3,59 ± 0,33	3,50 ± 0,36	3,58 ± 0,27	13,45 ± 0,54	13,55 ± 0,41	13,59 ± 0,46	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 60 ngày	3,66 ± 0,25	3,79 ± 0,23	3,68 ± 0,32	13,43 ± 0,45	13,74 ± 0,52	13,43 ± 0,70	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 90 ngày	3,80 ± 0,40	3,85 ± 0,27	3,87 ± 0,25	13,61 ± 0,41	13,39 ± 0,50	13,55 ± 0,38	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống thuốc liên tục, nồng độ albumin và bilirubin toàn phần trong máu chuột cống trắng ở cả lô trị 1 và lô trị 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với thời điểm trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của TD0015 lên nồng độ cholesterol toàn phần trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Nồng độ cholesterol toàn phần (mmol/l)			P
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	1,53 ± 0,26	1,56 ± 0,18	1,43 ± 0,19	> 0,05
Sau 30 ngày	1,42 ± 0,23	1,41 ± 0,23	1,44 ± 0,20	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 60 ngày	1,57 ± 0,13	1,52 ± 0,23	1,50 ± 0,22	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 90 ngày	1,36 ± 0,12	1,14 ± 0,22	1,10 ± 0,13	< 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	< 0,05	< 0,05	

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Kết quả bảng 3.8 cho thấy: Sau 30 ngày và 60 ngày uống thuốc liên tục, nồng độ cholesterol toàn phần trong máu chuột cống trắng ở cả lô trị 1 và lô trị 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$). Ở thời điểm sau 90 ngày uống thuốc, cả 2 lô uống TD0015 liều 1,2g/kg và 3,6g/kg có nồng độ cholesterol đều giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với thời điểm trước khi uống thuốc ($p < 0,05$).

3.1.2.4. Ảnh hưởng của TD0015 lên mức độ hủy hoại tế bào gan ở chuột cống trắng

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của TD0015 lên hoạt độ AST, ALT trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Hoạt độ AST (UI/l)			Hoạt độ ALT (UI/l)			p
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	122,50 ± 15,10	122,30 ± 20,12	118,30 ± 13,58	55,20 ± 5,25	59,90 ± 16,62	52,50 ± 8,73	
Sau 30 ngày	125,80 ± 27,31	115,00 ± 23,77	127,90 ± 17,12	54,00 ± 11,78	50,20 ± 11,21	55,80 ± 7,27	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 60 ngày	121,20 ± 11,47	121,60 ± 9,54	119,10 ± 15,03	55,70 ± 4,72	58,10 ± 8,09	58,80 ± 7,86	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 90 ngày	130,80 ± 21,04	136,60 ± 34,16	129,10 ± 21,98	65,20 ± 14,97	68,70 ± 9,45	65,10 ± 12,91	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Kết quả ở các bảng 3.8 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống thuốc liên tục, hoạt độ AST, ALT trong máu chuột cống trắng ở cả lô trị 1 và lô trị 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng và so với thời điểm trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

3.1.2.5. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên chức năng lọc của cầu thận ở chuột cống trắng

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của TD0015 lên nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng

Thời gian	Nồng độ creatinin (mg/dl)			p
	Lô chứng (n=10)	Lô trị 1 (n=10)	Lô trị 2 (n=10)	
Trước uống thuốc	1,06 ± 0,08	1,02 ± 0,09	1,04 ± 0,08	
Sau 30 ngày	1,05 ± 0,08	1,04 ± 0,11	1,03 ± 0,09	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 60 ngày	1,05 ± 0,08	1,05 ± 0,07	1,04 ± 0,08	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
Sau 90 ngày	1,04 ± 0,08	1,05 ± 0,07	1,08 ± 0,08	> 0,05
p (trước – sau)	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau.

Kết quả ở bảng 3.10 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống thuốc liên tục, ở cả lô trị 1 và lô trị 2, nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng không có sự khác biệt so với lô chứng và so với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$).

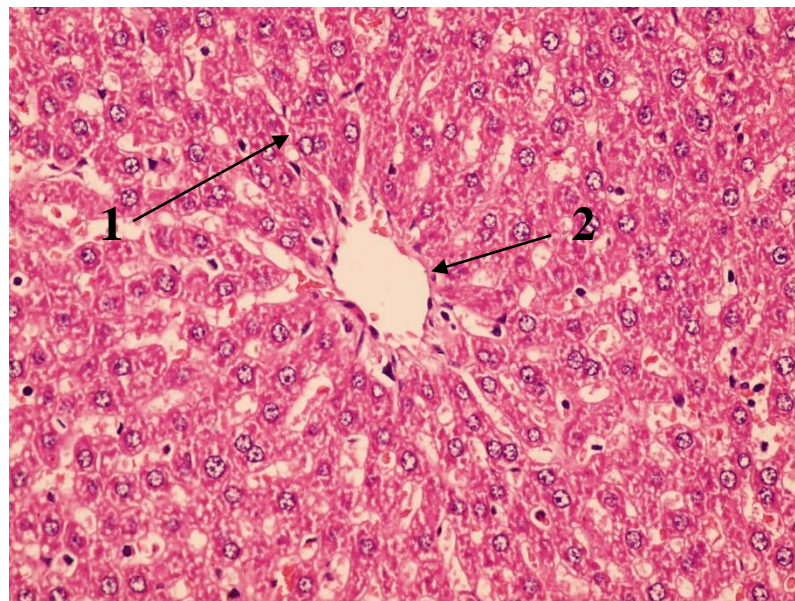
3.1.2.6. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên giải phẫu bệnh gan, thận ở chuột cống trắng

*** Đại thể:**

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

*** Vi thể:**

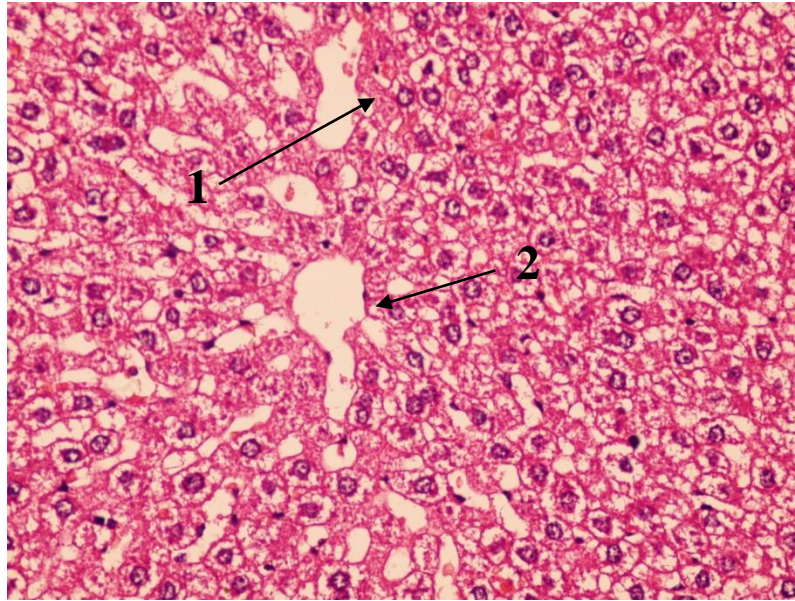
- **Trên cấu trúc vi thể gan:** Ở lô chứng và cả 2 lô trị, cấu trúc gan không bị đảo lộn. Vùng tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy gan và vùng khoảng cửa không bị xơ hóa, không xâm nhập viêm, không tăng sinh ống mật. Các tế bào gan bình thường hoặc thoái hóa rất nhẹ. Không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể gan giữa 2 lô dùng thuốc thử TD0015 với lô chứng.



Hình 3.1. Hình thái vi thể gan chuột lô chứng sau 90 ngày (HE x 400)

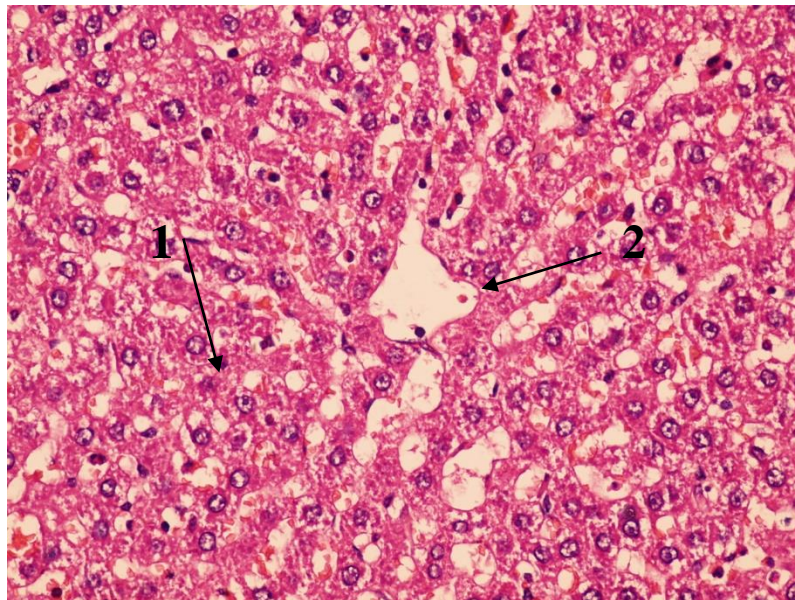
1. Tế bào gan 2. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy

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



Hình 3.2. Hình thái vi thể gan chuột sau 90 ngày uống TD0015 liều 1,2g/kg/ngày (HE x 400)

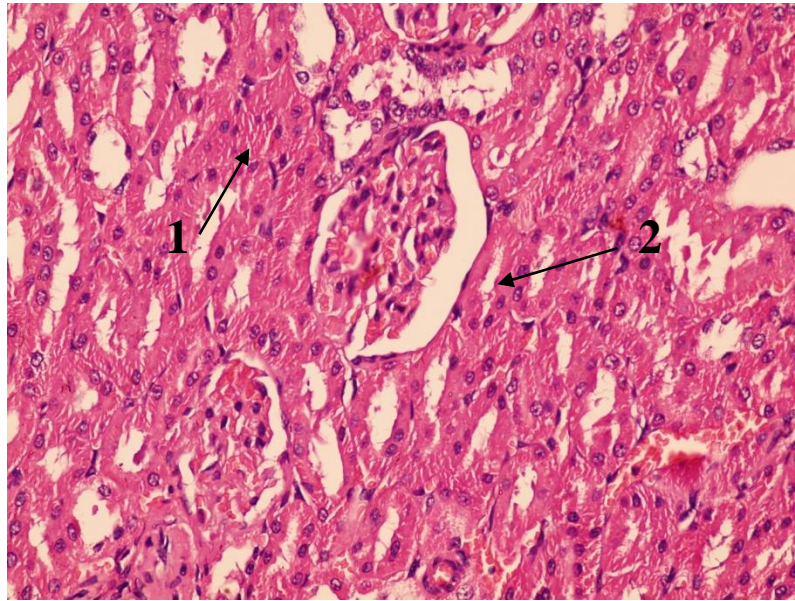
1. Tế bào gan 2. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy



Hình 3.3. Hình thái vi thể gan chuột sau 90 ngày uống TD0015 liều 3,6g/kg/ngày (HE x 400)

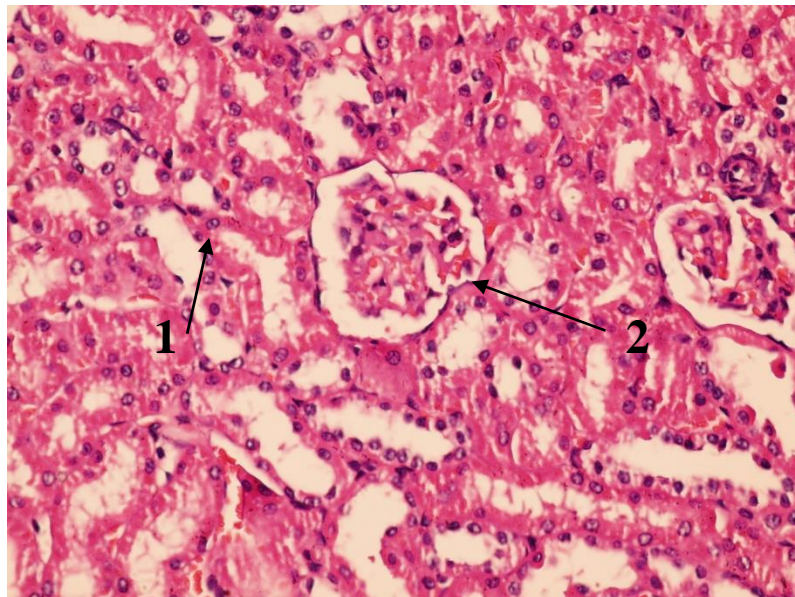
1. Tế bào gan 2. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy

- *Trên cấu trúc vi thể thận*: Ở lô chứng và 2 lô trị dùng TD0015, cầu thận có hình thái, cấu trúc trong giới hạn bình thường, không xơ hóa, không tăng sinh tế bào. Nhu mô thận không viêm, không hoại tử, mô đệm bình thường, không có sự xâm nhập của các tế bào viêm.



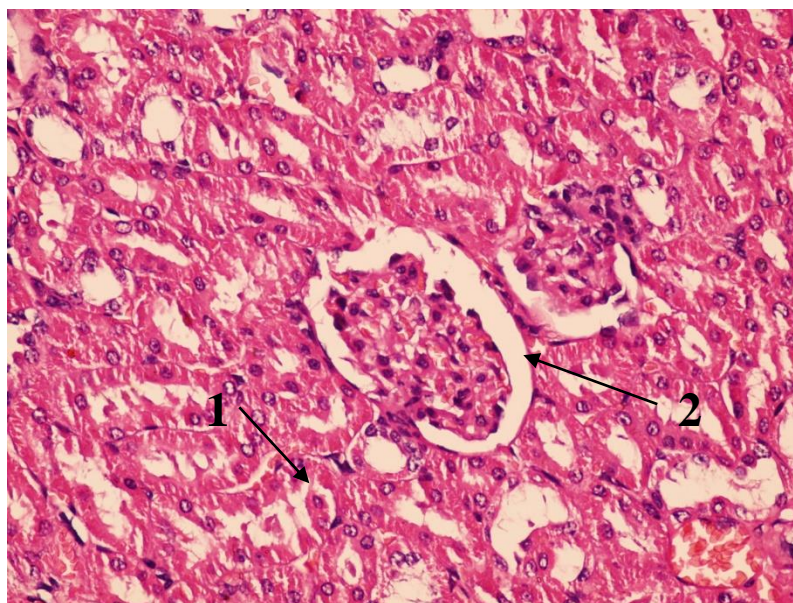
Hình 3.4. Hình thái vi thể thận chuột lô chứng sau 90 ngày (HE x 400)

1. Tế bào thận 2. Cầu thận



Hình 3.5. Hình thái vi thể thận chuột sau 90 ngày uống TD0015 1,2g/kg/ngày

1. Tế bào thận 2. Cầu thận (HE x 400)



Hình 3.6. Hình thái vi thể gan chuột sau 90 ngày uống thuốc TD0015 liều 3,6g/kg/ngày (HE x 400)

1. Tế bào thận 2. Cầu thận

3.2. Đánh giá tác dụng giảm đau của viên hoàn cứng TD0015

3.2.1. Đánh giá tác dụng giảm đau bằng máy Hot plate

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của TD0015 lên thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột nhắt trắng

Lô chuột (n=10)	Thời gian phản ứng với nhiệt độ (giây)		p trước-sau
	Trước	Sau	
Lô 1 (chứng sinh học)	14,97 ± 4,29	14,08 ± 2,50	> 0,05
Lô 2 (Codein phosphat 20mg/kg)	14,25 ± 3,38	17,16 ± 3,62	< 0,05
Lô 3 (TD0015 2,4g/kg/ngày)	13,85 ± 3,00	14,62 ± 4,61	> 0,05
Lô 4 (TD0015 7,2g/kg/ngày)	14,18 ± 4,17	14,39 ± 2,63	> 0,05

* Kiểm định giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng test trước-sau.

Kết quả ở bảng 3.11 cho thấy: Codein có tác dụng kéo dài rõ rệt thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột so với thời điểm trước khi uống codein và so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. TD0015 ở cả 2 liều uống trong 5 ngày liên tục có xu hướng kéo dài thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột nhất trắng so với trước khi uống thuốc và so với lô chứng, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.2.2. Đánh giá tác dụng giảm đau bằng máy đo ngưỡng đau Dynamic Plantar Aesthesiometer

Bảng 3.12. Tác dụng giảm đau của TD0015 trên chuột nhắt trắng bằng máy đo ngưỡng đau

Lô chuột (n=10)	Lực gây đau trên máy đo ngưỡng đau (gam)		Thời gian phản ứng đau (giây)	
	Trước	Sau	Trước	Sau
Lô 1 (chứng sinh học)	10,00 ± 1,54	9,90 ± 1,43	1,89 ± 0,32	1,90 ± 0,30
Lô 2 (Codein phosphat 20mg/kg)	9,32 ± 1,75	11,27 ± 1,15 *	1,84 ± 0,33	2,19 ± 0,24 *
p trước-sau		< 0,01		< 0,05
Lô 3 (TD0015 2,4g/kg/ngày)	9,60 ± 1,49	12,02 ± 2,01*	1,72 ± 0,34	2,34 ± 0,41*
p trước-sau		< 0,01		< 0,01
Lô 4 (TD0015 7,2g/kg/ngày)	9,92 ± 1,37	11,40 ± 1,37 *	1,91 ± 0,28	2,21 ± 0,27 *
p trước-sau		< 0,01		< 0,01

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau. Chú thích: *: $p < 0,05$, p so với lô chứng sinh học.

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy: Codein 20mg/kg có tác dụng làm tăng rõ rệt lực gây phản xạ đau và thời gian đáp ứng với đau trên máy đo ngưỡng đau của chuột (p so với lô chứng sinh học < 0,05, p so với trước khi uống codein p < 0,01, p < 0,05). TD0015 cả 2 liều uống trong 5 ngày liên tục làm tăng rõ rệt lực gây phản xạ đau và thời gian đáp ứng với đau trên máy đo ngưỡng đau của chuột (p so với lô chứng sinh học < 0,05, p so với trước khi uống thuốc p < 0,01, p < 0,05). Tác dụng này tương tự với codein 20mg/kg. Không có sự khác biệt rõ rệt giữa lô uống TD0015 liều 2,4g/kg/ngày với lô uống TD0015 liều 7,2g/kg/ngày.

3.2.3. *Đánh giá tác dụng giảm đau của TD0015 bằng phương pháp gây quặn đau bằng acid acetic*

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của TD0015 lên số cơn quặn đau của chuột nhắt trắng

Lô chuột (n=10)	Số cơn quặn đau (số cơn/5 phút)					
	0-5 phút	> 5-10 phút	> 10-15 phút	> 15-20 phút	> 20-25 phút	> 25-30 phút
Lô 1 (chứng sinh học)	8,10 ± 2,51	14,50 ± 3,06	12,90 ± 3,07	10,60 ± 2,72	7,60 ± 2,32	4,40 ± 1,58
Lô 2 (Aspirin 150mg/kg)	6,00 ± 2,58	11,60 ± 1,65 *	10,60 ± 2,46	6,20 ± 1,75 ***	6,30 ± 2,54	4,00 ± 2,05
Lô 3 (TD0015 2,4g/kg/ngày)	4,30 ± 2,50 **	11,10 ± 4,98	9,20 ± 3,08 *	7,50 ± 2,32 *	5,20 ± 2,66 *	4,10 ± 1,45
Lô 4 (TD0015 7,2g/kg/ngày)	6,00 ± 2,67	10,30 ± 2,31**	9,50 ± 2,51 *	5,80 ± 1,87 ***	5,00 ± 1,76 *	3,10 ± 1,10 *

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student. Chú thích: *, **, ***: p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001, p so với lô chứng sinh học.

Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy: Aspirin liều 150 mg/kg có tác dụng làm giảm số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu, rõ rệt nhất ở thời điểm 10 phút và 20 phút ($p < 0,05$ và $p < 0,001$). TD0015 liều 2,4g/kg/ngày uống trong 5 ngày liên tục có tác dụng làm giảm số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm, nhưng sự khác biệt có ý nghĩa thống kê thể hiện ở các phút thứ 5, 15, 20 và 25 ($p < 0,05$) TD0015 liều 7,2g/kg/ngày uống trong 5 ngày liên tục có tác dụng làm giảm rõ số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê thể hiện từ phút thứ 10 đến phút thứ 30 ($p < 0,05$), đặc biệt ở phút thứ 10 và phút thứ 20 ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). Tác dụng này tương tự với aspirin 150mg/kg. Không có sự khác biệt rõ rệt giữa lô uống TD0015 liều 2,4g/kg/ngày với lô uống TD0015 liều 7,2g/kg/ngày.

3.3. Đánh giá tác dụng chống viêm của viên hoàn cứng TD0015

3.3.1. Đánh giá tác dụng chống viêm cấp

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

Bảng 3.14. Tác dụng chống viêm cấp của TD0015 trên mô hình gây phù chân chuột

Lô (n=10)	Sau 2 giờ (V ₁)	Sau 4 giờ (V ₂)	Sau 6 giờ (V ₃)	Sau 24 giờ (V ₄)
	Độ phù (%)	Độ phù (%)	Độ phù (%)	Độ phù (%)
Lô 1 (chứng sinh học)	34,74 ± 10,69	44,13 ± 8,85	44,45 ± 14,77	25,33 ± 9,42
Lô 2 (Aspirin 200mg/kg)	16,00 ± 6,66***	35,00 ± 8,93*	43,00 ± 10,91	24,00 ± 6,96
% giảm phù so chứng	52,80	21,76	3,90	7,03
Lô 3 (TD0015 1,2g/kg/ngày)	34,33 ± 10,68	37,62 ± 11,13	38,11 ± 10,67	15,02 ± 6,07**
% giảm phù so chứng	1,18	14,75	14,27	40,70
Lô 4 (TD0015 3,6g/kg/ngày)	26,28 ± 5,61*	32,60 ± 13,43*	35,11 ± 8,15	15,12 ± 5,51**
% giảm phù so chứng	24,33	26,14	21,00	40,30

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student. Chú thích: *, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô chứng sinh học.

Kết quả bảng 3.14 cho thấy: Aspirin 200mg/kg có tác dụng chống viêm cấp tại các thời điểm nghiên cứu, rõ nhất vào thời điểm sau gây viêm 2h ($p < 0,001$) sau gây viêm 4h ($p < 0,05$). TD0015 liều 1,2g/kg có xu hướng làm giảm phù chân chuột ở các thời điểm sau gây viêm 2h, 4h, 6h nhưng sự giảm chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở thời điểm sau gây viêm 24h, TD0015 liều 1,2g/kg thể hiện tác dụng làm giảm phù chân chuột rất rõ ($p < 0,01$). TD0015 liều 3,6g/kg có tác dụng làm giảm phù chân chuột ở các thời điểm sau gây viêm, đặc biệt là thời điểm sau 2h, 4h và 24h ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

* Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây viêm màng bụng chuột.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của TD0015 đến thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu, protein trong dịch rỉ viêm của chuột

Lô (n=10)	Thể tích dịch rỉ viêm (ml/100g)	Số lượng bạch cầu (g/l)	Hàm lượng protein (g/l)
Lô 1 Chứng sinh học	3,11 ± 0,73	8,28 ± 1,91	2,78 ± 0,21
Lô 2 Aspirin (200 mg/kg)	2,00 ± 0,41** (↓35,7%)	5,00 ± 1,76** (↓39,6%)	2,51 ± 0,30* (↓9,7%)
Lô 3 TD0015 1,2g/kg	2,00 ± 0,36** (↓35,7%)	5,95 ± 1,45** (↓28,1%)	2,47 ± 0,13** (↓11,1%)
Lô 4 TD0015 3,6g/kg	2,02 ± 0,76** (↓35,0%)	5,49 ± 1,71** (↓33,7%)	2,45 ± 0,24** (↓11,9%)

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student. Chú thích: *, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô chứng sinh học.

Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy:

- TD0015 cả 2 liều 1,2g/kg/ngày và 3,6g/kg/ngày và aspirin liều 200mg/kg/ngày đều làm giảm rõ thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm và hàm

lượng protein so với lô chứng ($p < 0,01$). Không có sự khác biệt giữa các lô uống TD0015 so với lô uống aspirin liều 200mg/kg.

3.3.2. Đánh giá tác dụng chống viêm mạn

Bảng 3.16. Tác dụng của TD0015 lên trọng lượng u hạt

Lô	Trọng lượng u trước khi sấy khô (mg) (n=10)	Tỷ lệ giảm trọng lượng u hạt so với nhóm chứng (%)	Trọng lượng u sau khi sấy khô (mg) (n=7)	Tỷ lệ giảm trọng lượng u hạt so với nhóm chứng (%)
Lô 1 Chứng sinh học	81,42 ± 18,95		13,61 ± 4,07	
Lô 2 Methylprednisolon 10 mg/kg	57,10 ± 20,09*	29,87	9,65 ± 2,17*	29,10
Lô 3 TD0015 2,4g/kg	65,27 ± 13,29*	19,84	10,26 ± 1,37*	24,61
Lô 4 TD0015 7,2g/kg	59,24 ± 14,36**	27,24	9,53 ± 3,91*	29,98

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test Student. Chú thích: *, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, p so với lô chứng sinh học.

Kết quả bảng 3.16 cho thấy:

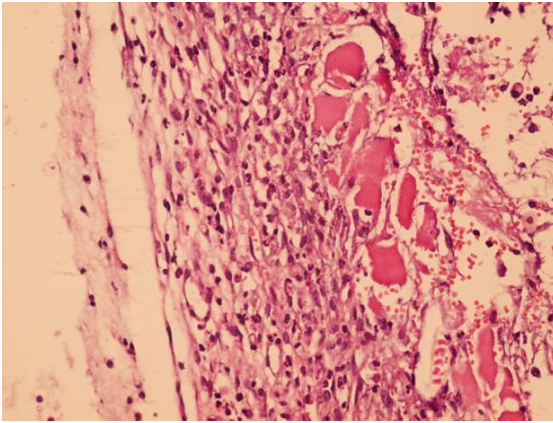
- Methylprednisolon liều 10 mg/kg/ngày làm giảm trọng lượng khối u hạt cả trước và sau sấy khô một cách rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,05$).
- TD0015 liều 2,4g/kg/ngày (tương đương liều lâm sàng) và 7,2g/kg/ngày (gấp 3 liều lâm sàng) có tác dụng làm giảm trọng lượng khối u hạt rõ rệt so với lô chứng ($p <$

0,05, $p < 0,01$). Tác dụng này tương đương so với methylprednisolon liều 10mg/kg ($p > 0,05$).

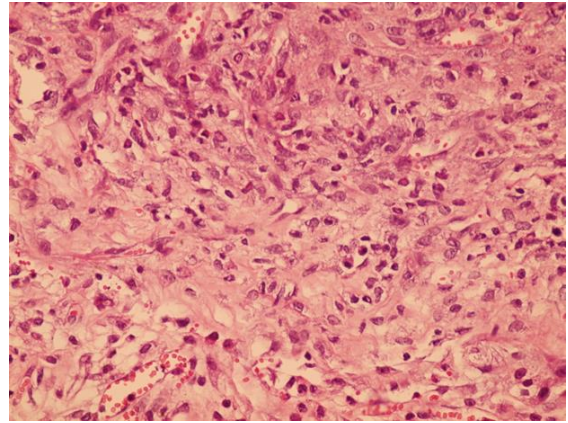
- Tác dụng chống viêm của TD0015 liều 7,2g/kg/ngày mạnh hơn so với liều 2,4g/kg/ngày, thể hiện qua tỷ lệ % giảm trọng lượng khối u hạt so với nhóm chứng.

Bảng 3.17. Kết quả giải phẫu bệnh u hạt trong viêm mạn

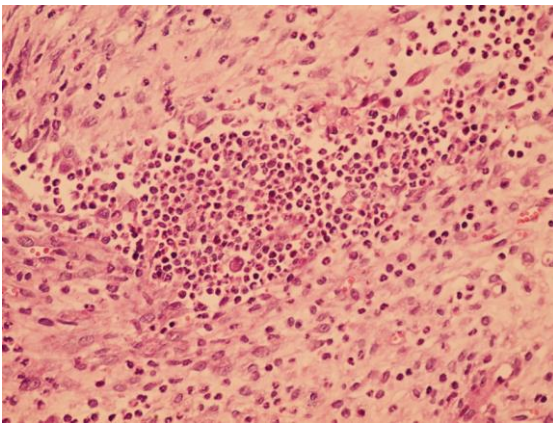
Lô	Kết quả giải phẫu bệnh
Lô 1 Chứng sinh học	Vùng hoại tử trung tâm rộng, nhiều bạch cầu đa nhân thoái hóa. Vùng vách xơ có các nguyên bào xơ và bạch cầu đa nhân, có các lympho bào.
Lô 2 Methylprednisolon 10mg/kg	Vùng trung tâm có xâm nhập các bạch cầu đa nhân, vùng ngoài có ít lympho bào
Lô 3 TD0015 2,4g/kg	Vùng trung tâm có các tế bào xơ và ít bạch cầu đa nhân. Vùng ngoại vi có thêm ít lympho bào và bạch cầu đa nhân rải rác
Lô 4 TD0015 7,2g/kg	Vùng trung tâm có các tế bào xơ và ít bạch cầu đa nhân. Vùng ngoại vi có thêm ít lympho bào và bạch cầu đa nhân rải rác, nguyên bào xơ và huyết quản tân tạo



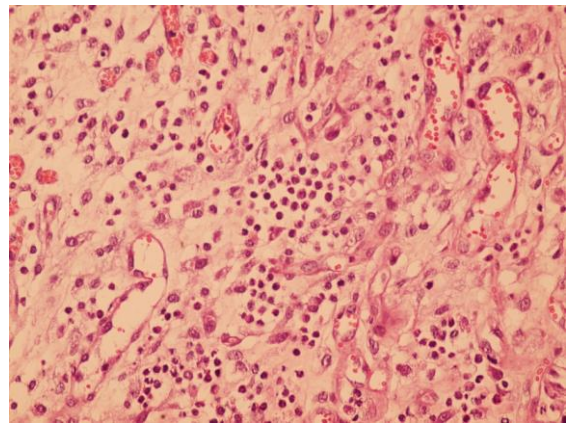
Hình 3.7. Lô chứng sinh học: Vùng hoại tử trung tâm rộng, nhiều bạch cầu đa nhân, thoái hóa (HE x 400) (Chuột số 1)



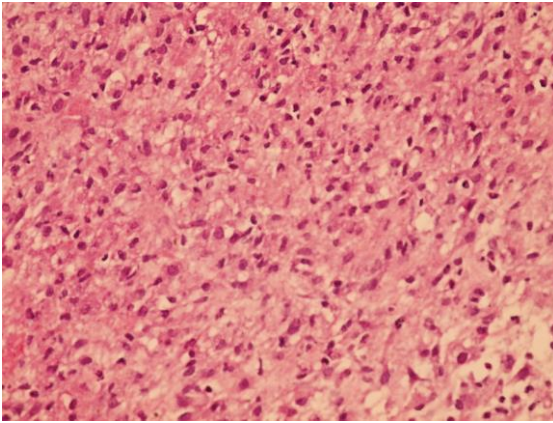
Hình 3.8. Lô chứng sinh học: Nhiều bạch cầu đa nhân thoái hóa, lympho bào, nhiều tế bào xơ non (HE x 400) (Chuột số 2)



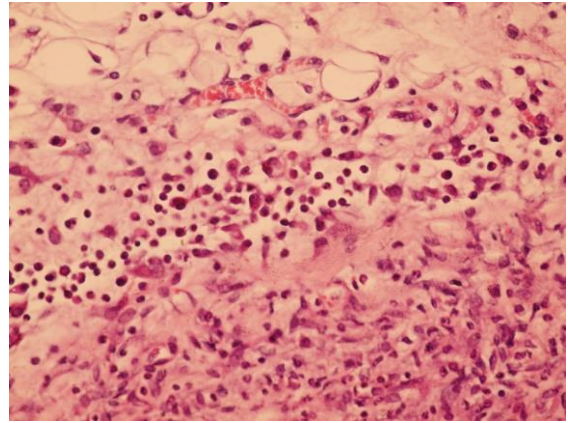
Hình 3.9. Lô uống methylprednisolon: Vùng trung tâm có nhiều bạch cầu đa nhân (HE x 400) (Chuột số 5)



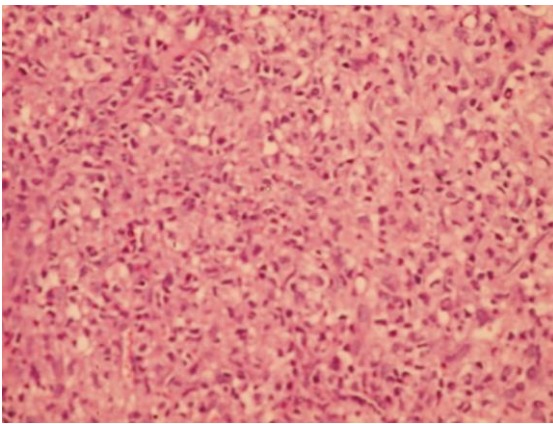
Hình 3.10. Lô uống methylprednisolon: Vùng ngoài có nhiều lympho bào (HE x 400) (Chuột số 6)



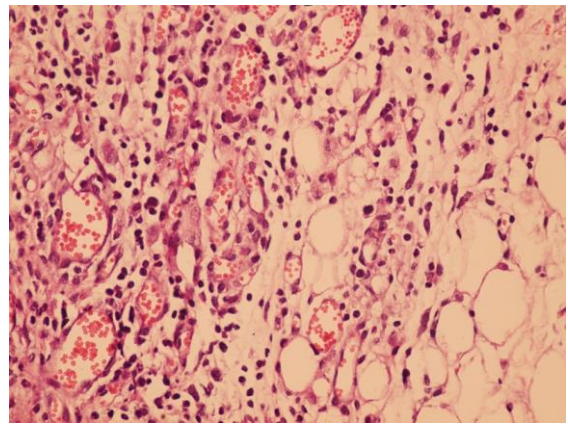
Hình 3.11. Lô uồng TD0015 2,4g/kg:
Vùng gần ổ hoại tử có nhiều bạch cầu
đa nhân và ít nguyên bào xơ
(HE x 400) (Chuột số 10)



Hình 3.12. Lô uồng TD0015 2,4g/kg:
Vùng ngoại vi xuất hiện bạch cầu đa
nhân và lympho bào
(HE x 400) (Chuột số 11)



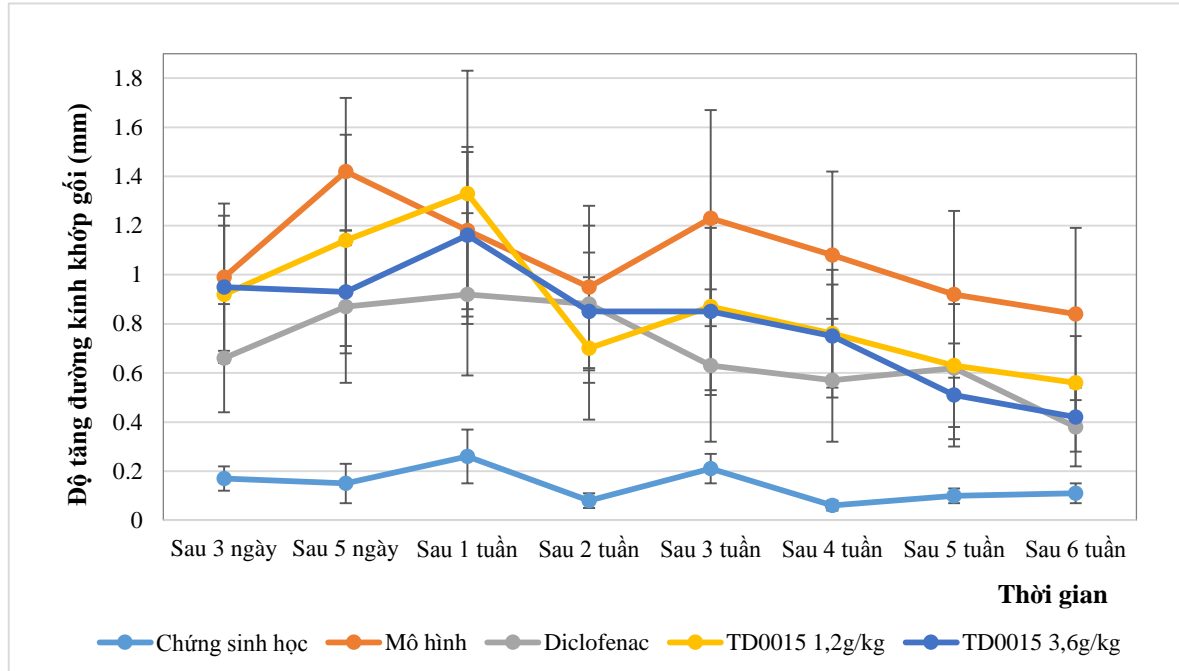
Hình 3.13. Lô uồng TD0015 7,2g/kg:
Vùng gần ổ hoại tử có nhiều bạch cầu
đa nhân và ít nguyên bào xơ
(HE x 400) (Chuột số 8)



Hình 3.14. Lô uồng TD0015 7,2g/kg:
Vùng ngoại vi xuất hiện bạch cầu đa
nhân, ít lympho bào, huyết quản tân
tạo (HE x 400) (Chuột số 9)

3.4. Đánh giá tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của viên hoàn cứng TD0015

3.4.1. Tác dụng lên đường kính khớp gối chuột cống



Biểu đồ 3.1. Sự thay đổi đường kính khớp gối theo thời gian

Biểu đồ 3.1 cho thấy:

- Độ tăng đường kính khớp gối của chuột ở các lô được tiêm MIA gây thoái hóa khớp tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học (chỉ tiêm nước muối sinh lý), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Sự tăng đường kính khớp gối sau tiêm MIA đạt cao nhất vào các thời điểm sau 5 ngày, sau 1 tuần và sau 3 tuần.

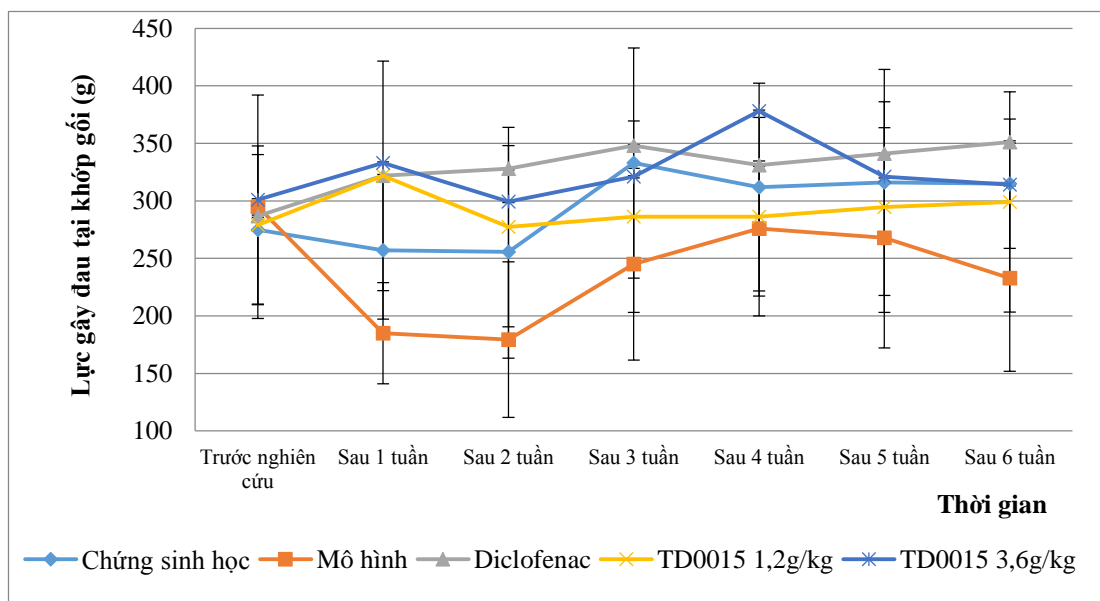
- Ở lô uống diclofenac 3mg/kg, độ tăng đường kính khớp gối trên chuột giảm rõ rệt so với lô mô hình ở tất cả các thời điểm, đặc biệt là thời điểm sau 3 ngày, 5 ngày, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần và 6 tuần tiêm MIA ($p < 0,05$, $p < 0,01$ và $p < 0,001$)

- Ở lô uống TD0015 liều 1,2g/kg, độ tăng đường kính khớp gối trên chuột có giảm so với lô mô hình ở tất cả các thời điểm, nhưng rõ nhất vào thời điểm sau 4 tuần, 5 tuần và 6 tuần tiêm MIA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Mức giảm ở thời điểm sau 4 tuần và 5 tuần tương đương với lô uống diclofenac 3mg/kg ($p > 0,05$), sau 6 tuần kém hơn lô uống diclofenac 3mg/kg ($p < 0,05$).

- Ở lô uống TD0015 liều 3,6g/kg, độ tăng đường kính khớp gối trên chuột giảm rõ so với lô mô hình ở tất cả các thời điểm, rõ nhất là thời điểm sau 3 ngày, sau 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần và 6 tuần tiêm MIA ($p < 0,05$, $p < 0,01$ và $p < 0,001$), mức giảm này tương đương diclofenac 3mg/kg ($p > 0,05$).

3.4.2. Đánh giá tác dụng giảm đau, cải thiện hoạt động khớp gối

3.4.2.1. Tác dụng giảm đau tại khớp bằng máy đo ngưỡng đau theo phương pháp Randall Selitto



Biểu đồ 3.2. Sự thay đổi lực gây đau tại khớp gối theo thời gian

Kết quả biểu đồ 3.2 cho thấy:

- Ở lô chứng sinh học, lực gây đau tại khớp gối của chuột không có sự khác biệt tại tất cả các thời điểm so với trước nghiên cứu ($p > 0,05$).

- Ở lô mô hình, ở tất cả các thời điểm sau khi tiêm MIA, lực gây đau tại khớp gối chuột đều giảm so với trước nghiên cứu, rõ rệt nhất vào thời điểm sau 1 tuần và 2 tuần tiêm MIA ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Lực gây đau khớp gối tại tất cả các thời điểm sau tiêm MIA đều giảm so với lô chứng sinh học, thể hiện rõ nhất ở thời điểm sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 6 tuần tiêm MIA ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

- Ở lô uống diclofenac 3mg/kg, lực gây đau khớp gối tại tất cả các thời điểm sau tiêm MIA không khác biệt so với trước nghiên cứu và so với lô chứng sinh học ($p >$

0,05), nhưng tăng rõ so với lô mô hình, đặc biệt là ở thời điểm sau 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 5 tuần và 6 tuần ($p < 0,05$, $p < 0,01$ và $p < 0,001$).

- Ở lô uống TD0015 liều 1,2g/kg, lực gây đau khớp gối tại tất cả các thời điểm sau tiêm MIA không khác biệt so với trước nghiên cứu và so với lô chứng sinh học ($p > 0,05$), nhưng tăng rõ so với lô mô hình, đặc biệt là ở thời điểm sau 1 tuần và 2 tuần ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). Tác dụng này không mạnh bằng diclofenac 3mg/kg nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

- Ở lô uống TD0015 liều 3,6g/kg, lực gây đau khớp gối tại tất cả các thời điểm sau tiêm MIA không khác biệt so với trước nghiên cứu và so với lô chứng sinh học ($p > 0,05$), nhưng tăng rõ so với lô mô hình, đặc biệt là ở thời điểm sau 1 tuần, 2 tuần, 4 tuần và 6 tuần ($p < 0,05$, $p < 0,01$ và $p < 0,001$). Tác dụng này mạnh hơn so với liều 1,2g/kg, rõ nhất ở thời điểm sau 4 tuần ($p < 0,05$) và tương đương với diclofenac 3mg/kg ($p > 0,05$).

3.4.2.2. Tác dụng cải thiện hoạt động khớp gối bằng máy đo ngưỡng đau sử dụng kim Von frey

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của TD0015 lên thời gian phản ứng với đau

Lô chuột (n = 10)		Chứng	Mô hình	Diclofenac 3mg/kg	TD0015 1,2g/kg	TD0015 3,6g/kg
Thời gian phản ứng với đau (s)	Trước	11,33 ± 2,73	11,55 ± 3,16	11,38 ± 1,74	11,63 ± 3,15	11,66 ± 2,44
	Sau 1 tuần	12,96 ± 3,57	9,96 ± 2,06 *	10,65 ± 1,73	9,05 ± 2,73	10,07 ± 3,00
	Sau 2 tuần	12,08 ± 3,23	11,47 ± 2,08	11,20 ± 3,05	11,16 ± 2,93	11,55 ± 2,70
	Sau 3 tuần	13,83 ± 3,02	14,19 ± 5,21	14,13 ± 4,45	13,83 ± 3,74	13,39 ± 1,84
	Sau 4 tuần	12,28 ± 4,08	13,47 ± 2,34	13,63 ± 2,41	13,91 ± 5,14	13,04 ± 2,89
	Sau 5 tuần	13,45 ± 2,59	16,43 ± 2,58 *	13,26 ± 2,73 ^Δ	14,30 ± 4,10	14,07 ± 4,15
	Sau 6 tuần	13,74 ± 2,15	16,86 ± 3,74 *	13,09 ± 3,38 ^Δ	13,61 ± 2,66 ^Δ	13,45 ± 3,37 ^Δ

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau. Chú thích: *,^Δ: $p < 0,05$, p so với chứng sinh học, p so mô hình

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của TD0015 lên lực gây đau

Lô chuột (n = 10)	Chứng	Mô hình	Diclofenac 3mg/kg	TD0015 1,2g/kg	TD0015 3,6g/kg	
Lực gây đau (g)	Trước	19,55 ± 4,62	19,53 ± 5,19	19,23 ± 2,86	19,64 ± 5,19	19,68 ± 4,02
	Sau 1 tuần	21,84 ± 5,88	16,93 ± 3,43*	18,02 ± 2,87	15,39 ± 3,97	17,09 ± 5,06
	Sau 2 tuần	21,59 ± 3,80	20,33 ± 2,82	18,91 ± 5,02	18,89 ± 4,86	19,08 ± 4,20
	Sau 3 tuần	20,93 ± 3,30	23,86 ± 8,59	23,07 ± 5,40	23,31 ± 6,17	22,52 ± 3,02
	Sau 4 tuần	20,72 ± 6,72	22,63 ± 3,85	22,51 ± 4,53	23,41 ± 8,48	21,92 ± 4,66
	Sau 5 tuần	22,29 ± 5,34	27,08 ± 4,29*	22,37 ± 4,52 ^Δ	23,71 ± 6,15	23,59 ± 6,82
	Sau 6 tuần	22,36 ± 4,11	27,21 ± 4,24*	22,04 ± 5,58 ^Δ	22,86 ± 4,36 ^Δ	22,29 ± 6,00 ^Δ

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau. Chú thích: *,^Δ: p < 0,05, p so với chứng sinh học, p so mô hình

Kết quả ở bảng 3.18 và 3.19 cho thấy:

- Ở lô chứng sinh học, thời gian và lực gây đau làm chuột nhấc chân khỏi kim Von Frey không có sự khác biệt tại tất cả các thời điểm so với trước nghiên cứu (p > 0,05).

- Ở lô mô hình:

+ Thời điểm sau tiêm MIA 1 tuần, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau giảm so với trước nghiên cứu nhưng chưa khác biệt có ý nghĩa thống kê (p > 0,05), và giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học (p < 0,05),

+ Từ thời điểm sau 3 tuần đến sau 4 tuần tiêm MIA, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau tăng lên, không có sự khác biệt so với trước nghiên cứu và so với lô chứng sinh học (p > 0,05)

+ Ở thời điểm sau 5 tuần và 6 tuần tiêm MIA, thời gian phản ứng với đau tăng lên rõ rệt do khớp gối của chuột bị tổn thương thoái hóa. Lực gây đau ở 2 thời điểm này cũng tăng cao có ý nghĩa thống kê so với trước nghiên cứu ($p < 0,01$) và so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$).

- Ở lô uống diclofenac 3mg/kg:

+ Thời điểm sau tiêm MIA 1 tuần, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau giảm so với trước nghiên cứu và so với chứng sinh học, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), thời gian là lực tăng so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

+ Từ thời điểm sau 3 tuần đến sau 4 tuần tiêm MIA, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau tăng lên, không có sự khác biệt so với trước nghiên cứu, so với lô chứng sinh học và so với lô mô hình ($p > 0,05$).

+ Ở thời điểm sau tiêm MIA 5 tuần và 6 tuần, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau không khác biệt so với trước nghiên cứu và so với chứng sinh học ($p > 0,05$), nhưng giảm rõ rệt so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Ở lô uống TD0015 liều 1,2g/kg và 3,6g/kg:

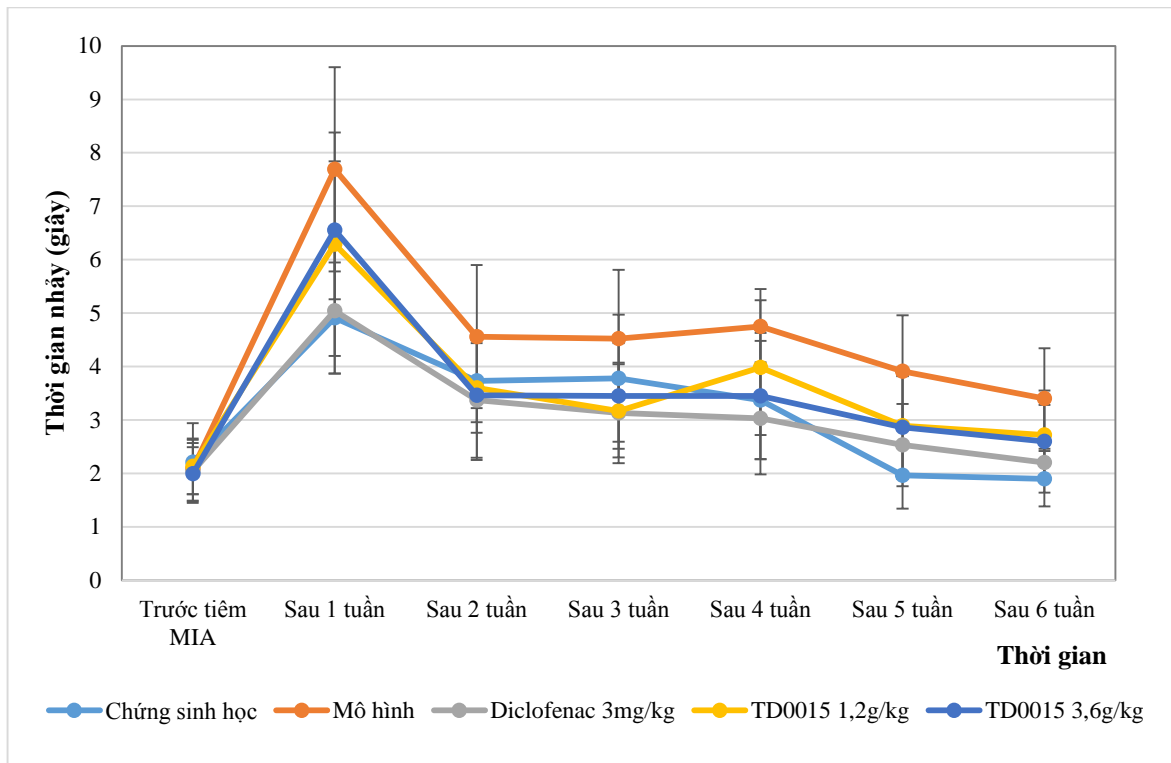
+ Thời điểm sau tiêm MIA 1 tuần, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau giảm so với trước nghiên cứu nhưng chưa khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$), và không khác biệt so với lô mô hình và lô uống diclofenac 3mg/kg ($p > 0,05$).

+ Từ thời điểm sau 3 tuần đến sau 4 tuần tiêm MIA, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau tăng lên, không có sự khác biệt so với trước nghiên cứu và so với lô chứng sinh học ($p > 0,05$).

+ Ở thời điểm sau tiêm MIA 5 tuần, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau tăng so với trước nghiên cứu ($p < 0,05$) nhưng giảm sau 6 tuần, không có sự khác biệt so với trước nghiên cứu ($p > 0,05$). Ở cả 2 thời điểm, thời gian phản ứng với đau và lực gây đau không khác biệt so với chứng sinh học ($p > 0,05$), giảm rõ so với lô mô hình, đặc biệt là thời điểm sau 6 tuần ($p < 0,05$).

+ Tác dụng này tương đương diclofenac 3mg/kg.

3.4.2.3. Tác dụng cải thiện hoạt động khớp gối của TD0015 bằng phương pháp sử dụng Hot plate



Biểu đồ 3.3. Thời gian chuột nhảy thành công khỏi mâm nóng

Biểu đồ 3.3 cho thấy:

- Sau khi tiêm MIA 1 tuần, thời gian để chuột nhảy thành công khỏi mâm nóng là dài nhất, sau đó giảm dần trong các tuần tiếp theo.
- Chuột ở lô mô hình có thời gian nhảy sau tiêm MIA cao hơn lô chứng sinh học ở tất cả các thời điểm, rõ nhất sau 1, 4, 5 và 6 tuần ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).
- Diclofenac 3mg/kg rút ngắn thời gian nhảy của chuột so với lô mô hình ở tất cả các thời điểm một cách rõ rệt ($p < 0,01$).
- TD0015 liều 3,6g/kg làm giảm thời gian chuột nhảy so với lô mô hình ở các thời điểm, rõ nhất là sau 4,5 và 6 tuần ($p < 0,05$, $p < 0,01$).
- TD0015 liều 1,2g/kg làm giảm thời gian chuột nhảy so với lô mô hình ở các thời điểm nhưng thể hiện rõ nhất là sau 3 và 5 tuần ($p < 0,05$).

Bảng 3.20. Độ cao đạt được khi chuột nhảy khỏi mâm nóng

Lô chuột (n = 10)	Chứng	Mô hình	Diclofenac 3mg/kg	TD0015 1,2g/kg	TD0015 3,6g/kg	
Độ cao chuột nhảy (cm)	Trước tiêm MIA	22,20 ± 4,34	23,50 ± 5,80	22,50 ± 4,20	23,70 ± 4,45	23,50 ± 3,63
	Sau 1 tuần	21,40 ± 5,83	19,20 ± 4,16	22,30 ± 4,99	19,80 ± 4,05	21,85 ± 4,82
	Sau 2 tuần	22,40 ± 5,32	21,50 ± 5,10	20,70 ± 4,45	19,40 ± 3,92	20,10 ± 5,17
	Sau 3 tuần	20,80 ± 3,74	19,70 ± 5,74	20,40 ± 2,63	19,90 ± 2,18	19,80 ± 2,82
	Sau 4 tuần	21,60 ± 2,46	19,30 ± 3,43	20,90 ± 4,20	19,10 ± 2,33	19,80 ± 1,81
	Sau 5 tuần	23,30 ± 5,10	18,50 ± 2,01 *	21,10 ± 2,92 Δ	20,40 ± 3,34	21,70 ± 4,22 Δ
	Sau 6 tuần	22,10 ± 3,51	17,00 ± 2,36**	20,10 ± 3,45 Δ	18,40 ± 3,44	19,30 ± 2,06 Δ

* Kiểm định giá trị trung bình của 2 nhóm độc lập, giá trị trung bình ở 2 thời điểm khác nhau bằng T-test Student, test trước-sau. Chú thích: *, **, Δ: $p < 0,05$, $p < 0,01$ p so với chứng sinh học, p so mô hình

Kết quả ở bảng 3.20 cho thấy:

- Ở lô mô hình, sau khi tiêm MIA, độ cao chuột đạt được khi nhảy khỏi mâm nóng thấp hơn so với lô chứng sinh học ở tất cả các thời điểm, rõ nhất sau 5 và 6 tuần ($p < 0,05$, $p < 0,01$).

- Diclofenac liều 3mg/kg và TD0015 liều 3,6g/kg làm tăng độ cao chuột nhảy ở hầu hết các thời điểm so với lô mô hình, thể hiện rõ nhất ở thời điểm sau 5 và 6 tuần ($p < 0,05$). TD0015 liều 1,2g/kg có xu hướng làm tăng độ cao chuột nhảy nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.21. Số lần nhảy đà của chuột

Số lần nhảy đà theo thời gian		Chứng	Mô hình	Diclofenac 3mg/kg	TD0015 1,2g/kg	TD0015 3,6g/kg
Trước tiêm MIA	Không nhảy đà	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Sau 1 tuần	Không nhảy đà	7/10	6/10	8/10	6/10	8/10
	Nhảy 1 lần	3/10	2/10	2/10	3/10	2/10
	Nhảy 2 lần	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10
	Nhảy 3 lần	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10
	Trung vị (25-75)	0 (0-1)	0 (0-1,25)	0 (0-0,25)	0 (0-1)	0 (0-0,25)
Sau 2 tuần	Không nhảy đà	8/10	7/10	7/10	7/10	8/10
	Nhảy 1 lần	2/10	2/10	1/10	2/10	2/10
	Nhảy 2 lần	0/10	1/10	2/10	1/10	0/10
	Trung vị (25-75)	0 (0-0,25)	0 (0-1)	0 (0-1,25)	0 (0-1)	0 (0-0,25)
Sau 3 tuần	Không nhảy đà	9/10	5/10	9/10	7/10	8/10
	Nhảy 1 lần	1/10	3/10	1/10	3/10	1/10
	Nhảy 2 lần	0/10	2/10	0/10	0/10	1/10
	Trung vị (25-75)	0 (0-0)	0,5 (0-1,25)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0,25)
Sau 4 tuần	Không nhảy đà	9/10	6/10	8/10	6/10	6/10
	Nhảy 1 lần	1/10	3/10	2/10	2/10	3/10
	Nhảy 2 lần	0/10	1/10	0/10	1/10	0/10
	Nhảy 3 lần	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10
	Trung vị (25-75)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0,25)	0 (0-1,25)	0 (0-1)
Sau 5 tuần	Không nhảy đà	10/10	7/10	9/10	9/10	8/10
	Nhảy 1 lần	0/10	1/10	1/10	1/10	2/10
	Nhảy 2 lần	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10
	Trung vị (25-75)	0 (0-0)	0 (0-1,25)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0,25)
Sau 6 tuần	Không nhảy đà	10/10	5/10	7/10	7/10	8/10
	Nhảy 1 lần	0/10	5/10	3/10	3/10	2/10
	Trung vị (25-75)	0 (0-0)	0,5 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0,25)

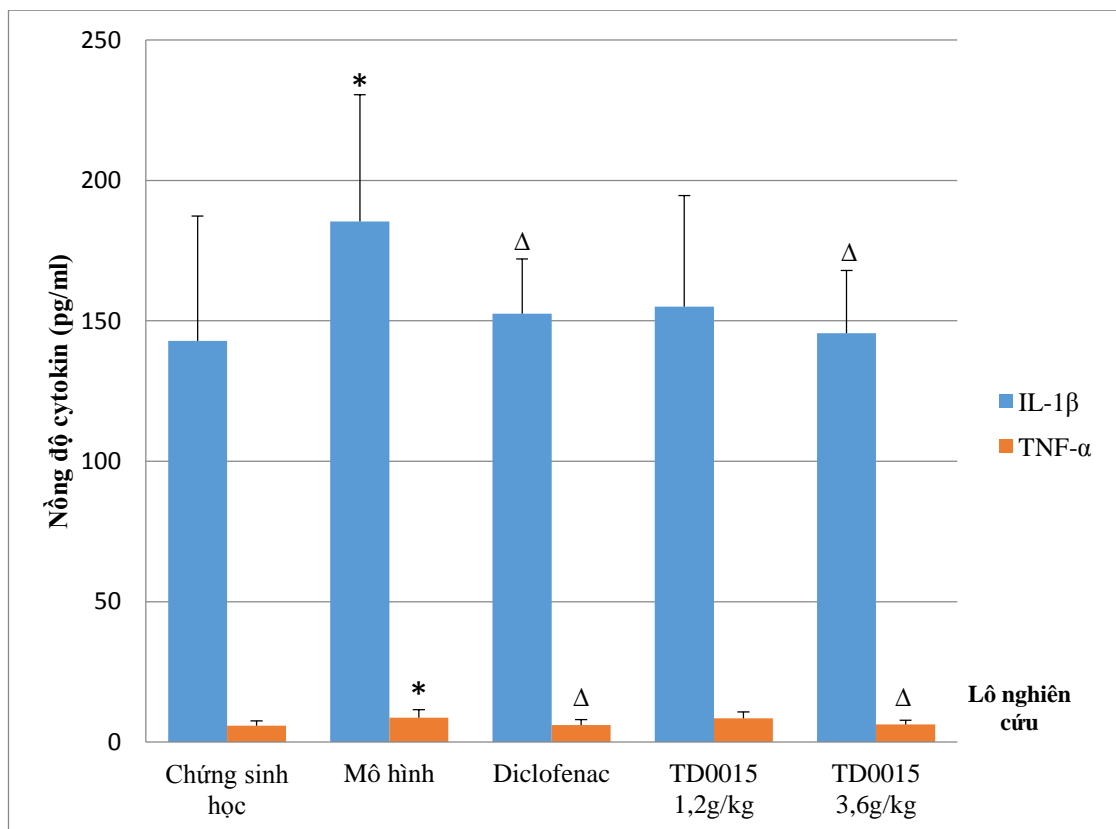
* So sánh 2 nhóm độc lập, sử dụng test Mann – Whitney dành cho kiểm định phi tham số

Bảng 3.21 cho thấy:

- Số lần chuột nhảy đà ở lô mô hình tăng theo thời gian so với chứng sinh học, đặc biệt ở thời điểm sau tiêm MIA 3 tuần đến 6 tuần, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Diclofenac 3mg/kg và TD0015 cả 2 liều đều có xu hướng làm giảm số lần nhảy đà của chuột, rõ nhất ở các thời điểm sau tiêm MIA 3 tuần, 5 tuần và 6 tuần, TD0015 liều 3,6g/kg thể hiện tác dụng rõ hơn liều 1,2g/kg, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.4.3. Tác dụng của viên hoàn cứng TD0015 lên chỉ số cytokin



Biểu đồ 3.4. Nồng độ cytokin ở các lô nghiên cứu

Biểu đồ 3.4 cho thấy:

- Sau 6 tuần tiêm MIA, ở lô mô hình, nồng độ interleukin-1 β (IL-1 β) và TNF- α tăng cao rõ rệt so với chứng sinh học ($p < 0,05$).

- Ở lô uống diclofenac 3mg/kg, nồng độ IL-1 β và TNF- α giảm rõ so với lô mô hình ($p < 0,05$), có xu hướng tăng nhẹ so với chứng sinh học nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Ở lô uống TD0015 liều 1,2g/kg, nồng độ IL-1 β và TNF- α có xu hướng giảm so với lô mô hình nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Ở lô uống TD0015 liều 3,6g/kg, nồng độ IL-1 β và TNF- α giảm rõ so với lô mô hình ($p < 0,05$), nồng độ tương đương với lô chứng sinh học ($p > 0,05$) và có xu hướng giảm hơn lô uống diclofenac 3mg/kg nhưng khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.4.4. Tác dụng của viên hoàn cứng TD0015 lên mô bệnh học khớp gối

3.4.4.1. Sau 2 tuần tiêm MIA

Bảng 3.22 dưới đây trình bày tổn thương mô bệnh học khớp gối của chuột lô chứng sinh học và lô mô hình ở thời điểm sau 2 tuần tiêm MIA thông qua phương pháp cho điểm theo từng mức độ tổn thương của Janusz và Al Saffar. Kết quả cho thấy:

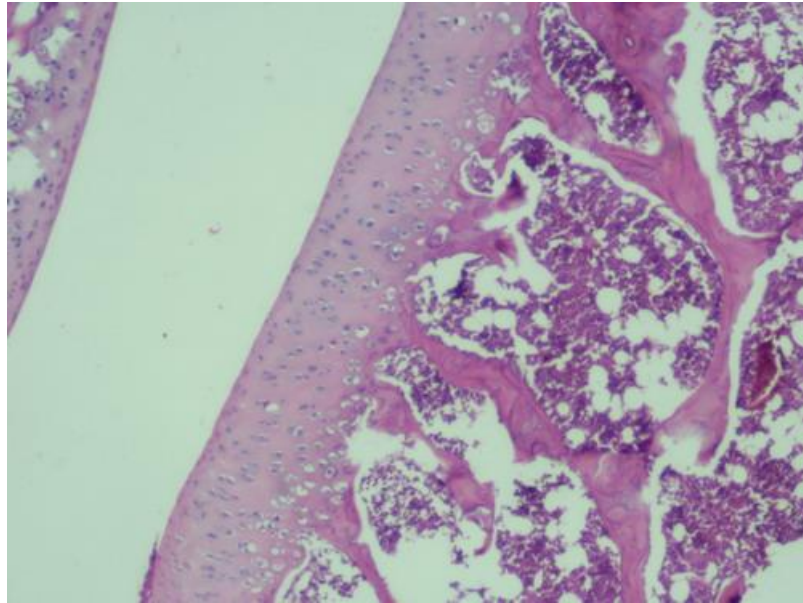
- Ở lô chứng sinh học, mức độ tổn thương là tối thiểu.

- Ở lô mô hình, sau 2 tuần tiêm MIA, các tổn thương dưới sụn, proteoglycan, sự xuất hiện chồi xương và gai xương, tổn thương tế bào sụn đều ở mức độ nhẹ đến trung bình, tăng cao rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Sự viêm màng hoạt dịch ở lô mô hình nặng hơn lô chứng sinh học nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

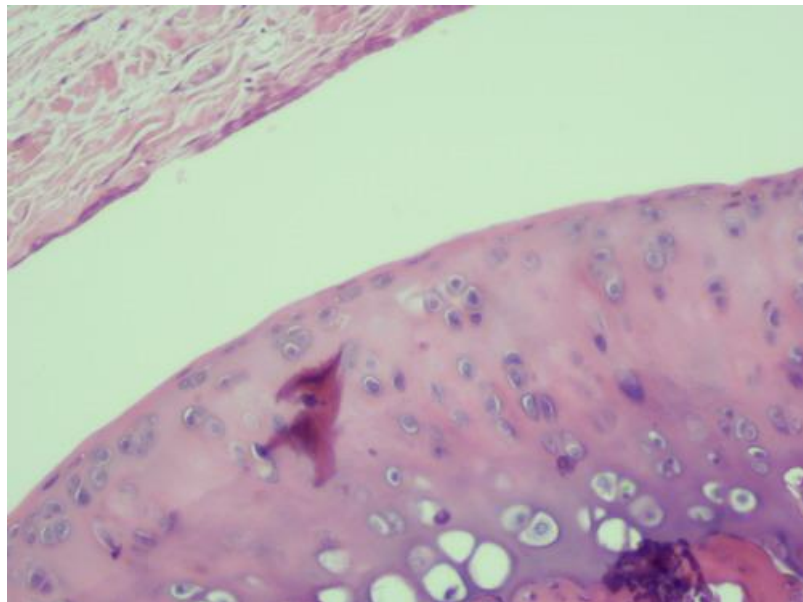
Bảng 3.22. Tổn thương mô bệnh học khớp gối sau 2 tuần tiêm MIA

Tổn thương mô bệnh học			Chứng	Mô hình
Tổn thương xương dưới sụn	Không tổn thương	0	1/10	0/10
	Tối thiểu	1	7/10	2/10
	Nhẹ	2	2/10	7/10
	Trung bình	3	0/10	1/10
	Nặng	4	0/10	0/10
Trung vị (25-75)			1(1-1,25)	2(1,75-2)*
Tổn thương proteoglycan	Không tổn thương	0	1/10	0/10
	Tối thiểu	1	8/10	2/10
	Nhẹ	2	1/10	6/10
	Trung bình	3	0/10	2/10
	Nặng	4	0/10	0/10
Trung vị (25-75)			1(1-1)	2(1,75-2,25)**
Chồi xương gai xương	Không có	0	4/10	0/10
	Nhẹ	1	6/10	0/10
	Trung bình	2	0/10	9/10
	Nặng	3	0/10	1/10
Trung vị (25-75)			1(0-1)	2(2-2)***
Tổn thương tế bào sụn	Không tổn thương	0	8/10	0/10
	Tổn thương sụn bề mặt	1	2/10	0/10
	Tổn thương 1/3 trên lớp sụn giữa	2	0/10	6/10
	Tổn thương lớp sụn giữa	3	0/10	4/10
	Tổn thương lớp đáy	4	0/10	0/10
	Tổn thương sụn calci hóa	5	0/10	0/10
Trung vị (25-75)			1(1-1,25)	2(2-3)***
Viêm màng hoạt dịch	Dày 1-2 tế bào	0	6/10	2/10
	Dày 3-5 tế bào	1	4/10	7/10
	Dày 6-8 tế bào, mật độ tăng nhẹ	2	0/10	1/10
	Dày >9 tế bào, mật độ tăng mạnh	3	0/10	0/10
Trung vị (25-75)			0 (0-1)	1(0,75-1)

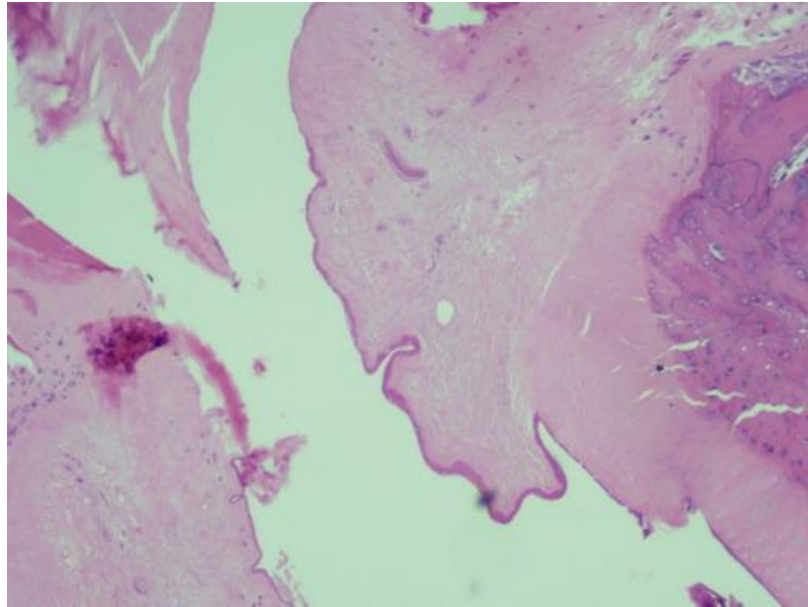
*, **, ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ so với mô hình; Δ , $\Delta\Delta$, $\Delta\Delta\Delta$: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ so với chứng, sử dụng Mann – Whitney U test cho kiểm định phi tham số.



*Hình 3.15. Mô bệnh học khớp gối chuột lô chứng sau 2 tuần (HE x 20)
(Chuột số 1)*

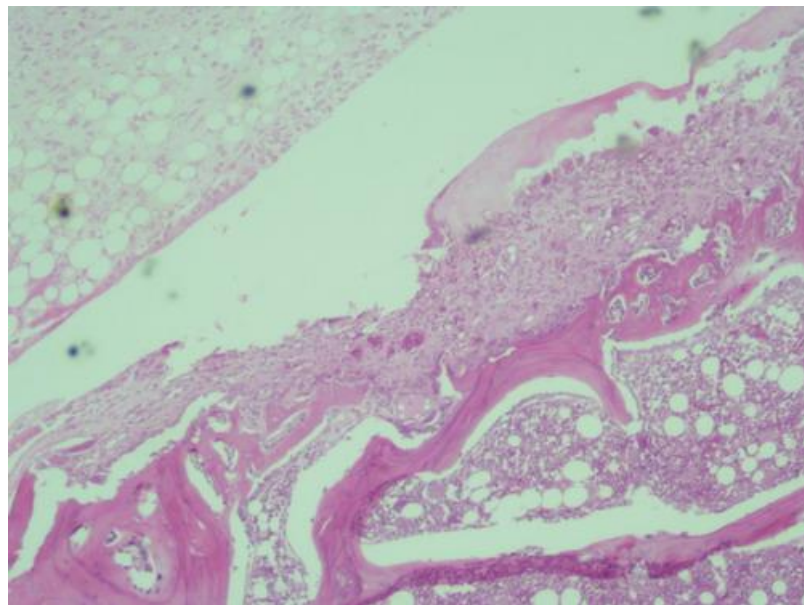


*Hình 3.16. Mô bệnh học khớp gối chuột lô chứng sau 2 tuần (HE x 40)
(Chuột số 2)*



Hình 3.17. Mô bệnh học khớp gối chuột lô mô hình sau 2 tuần (HE x 20)

Hình ảnh chồi xương (Chuột số 17)



Hình 3.18. Mô bệnh học khớp gối chuột lô mô hình sau 2 tuần (HE x 20)

Hình ảnh tổn thương sụn (Chuột số 22)

3.4.4.2. Sau 6 tuần tiêm MIA

Bảng 3.23. Tổn thương mô bệnh học khớp gối sau 6 tuần

Tổn thương mô bệnh học		Chứng	Mô hình	Diclofenac 3mg/kg	TD0015 1,2g/kg	TD0015 3,6g/kg	
Tổn thương xương dưới sụn	Không tổn thương	0	3/10	0/10	0/10	0/10	
	Tối thiểu	1	5/10	2/10	6/10	2/10	8/10
	Nhẹ	2	2/10	5/10	3/10	8/10	2/10
	Trung bình	3	0/10	3/10	0/10	0/10	0/10
	Nặng	4	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10
Median (25-75)		1(0-1,25)	2(1,75-3)^{ΔΔ}	1(1-2)	2(1,75-2)	1(1-1,25)**	
Tổn thương proteogly -can	Không tổn thương	0	2/10	0/10	0/10	0/10	
	Tối thiểu	1	6/10	2/10	7/10	5/10	9/10
	Nhẹ	2	2/10	4/10	2/10	5/10	1/10
	Trung bình	3	0/10	4/10	1/10	0/10	0/10
	Nặng	4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Median (25-75)		1(0,75-1,25)	2(1,75-3)^{ΔΔ}	1(1-2)*	1,5(1-2)*	1(1-1)**	
Chồi xương gai xương	Không có	0	2/10	0/10	0/10	0/10	
	Nhẹ	1	7/10	3/10	8/10	6/10	9/10
	Trung bình	2	1/10	6/10	0/10	4/10	1/10
	Nặng	3	0/10	1/10	2/10	0/10	0/10
Median (25-75)		1(0,75-1)	2(1-2)^{ΔΔ}	1(1-1,5)	1(1-2)	1(1-1)**	
Tổn thương tế bào sụn	Không tổn thương	0	2/10	0/10	0/10	0/10	
	Tổn thương sụn bề mặt	1	8/10	0/10	4/10	4/10	8/10
	Tổn thương 1/3 trên lớp sụn giữa	2	0/10	4/10	4/10	6/10	2/10
	Tổn thương lớp sụn giữa	3	0/10	5/10	0/10	0/10	0/10
	Tổn thương lớp đáy	4	0/10	1/10	2/10	0/10	0/10
Median (25-75)		1(0,75-1)	3(2-3)^{ΔΔΔ}	2(1-2,5)	2(1-2)**	1(1-1,25)***	
Viêm màng hoạt dịch	Dày 1-2 tế bào	0	3/10	0/10	3/10	0/10	0/10
	Dày 3-5 tế bào	1	7/10	2/10	7/10	8/10	8/10
	Dày 6-8 tế bào, mật độ tăng nhẹ	2	0/10	8/10	0/10	2/10	2/10
	Dày >9 tế bào, mật độ tăng mạnh	3	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Median (25-75)		1(0-1)	2(1,75-2)^{ΔΔΔ}	1(0-1)***	1(1-1,25)***	1(1-1,25)***	

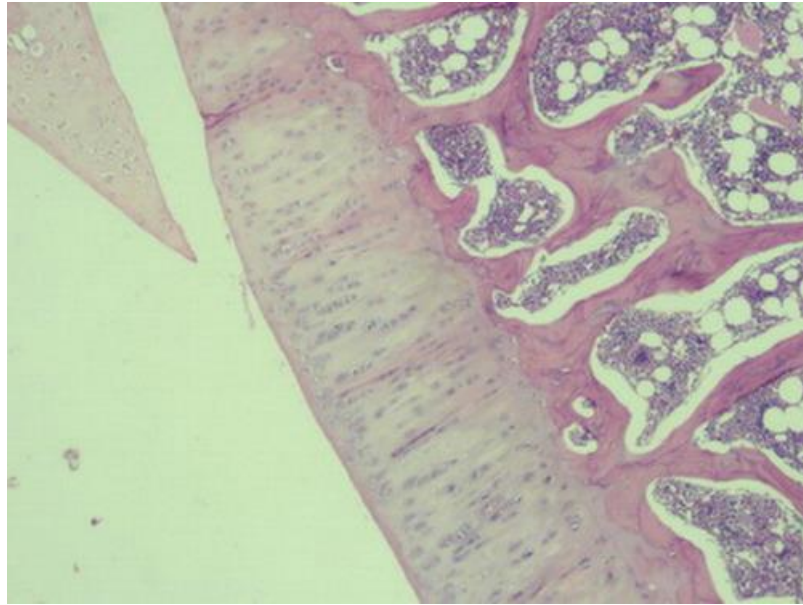
*, **, ***: p<0,05, p<0,01, p<0,001 so với mô hình; Δ, ΔΔ, ΔΔΔ: p<0,05, p<0,01, p<0,001 so với chứng, sử dụng Mann – Whitney U test cho kiểm định phi tham số.

Bảng 3.23 trình bày tổn thương mô bệnh học khớp gối của chuột sau 6 tuần tiêm MIA, thông qua phương pháp cho điểm theo từng mức độ tổn thương của Janusz và Al Saffar. Kết quả cho thấy:

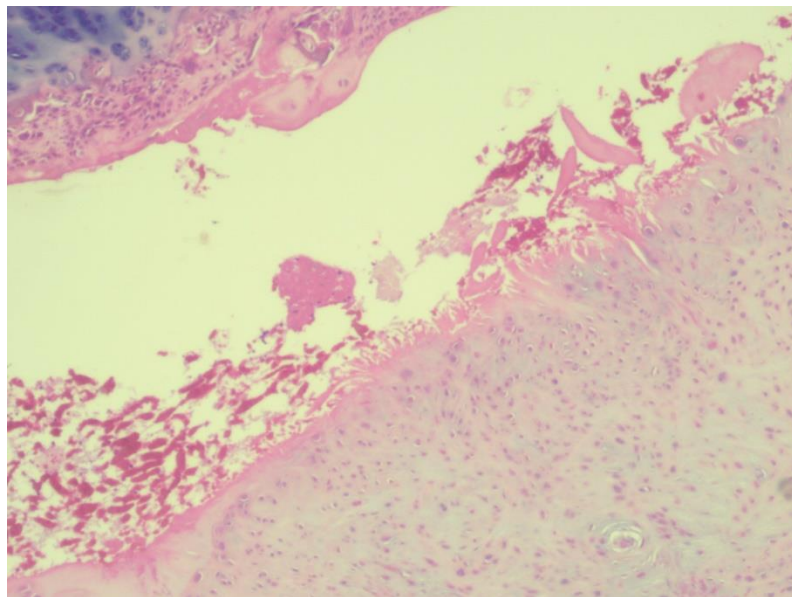
- Ở lô chứng sinh học, mức độ tổn thương là tối thiểu.
- Ở lô mô hình, sau 6 tuần tiêm MIA, các tổn thương ở mức độ nhẹ đến trung bình, tăng cao rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).
- Ở lô uống diclofenac 3mg/kg, mức độ tổn thương giảm so với mô hình, thể hiện rõ nhất ở cấu trúc proteoglycan và màng hoạt dịch ($p < 0,05$, $p < 0,001$).
- Ở lô uống TD0015 liều 1,2g/kg, mức độ tổn thương giảm so với mô hình, rõ nhất ở cấu trúc proteoglycan, tế bào sụn và màng hoạt dịch ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).
- Ở lô uống TD0015, liều 3,6g/kg, tất cả các chỉ số đều giảm rõ rệt so với mô hình ($p < 0,01$, $p < 0,001$), tác dụng này mạnh hơn diclofenac 3mg/kg và TD0015 liều 1,2g/kg.



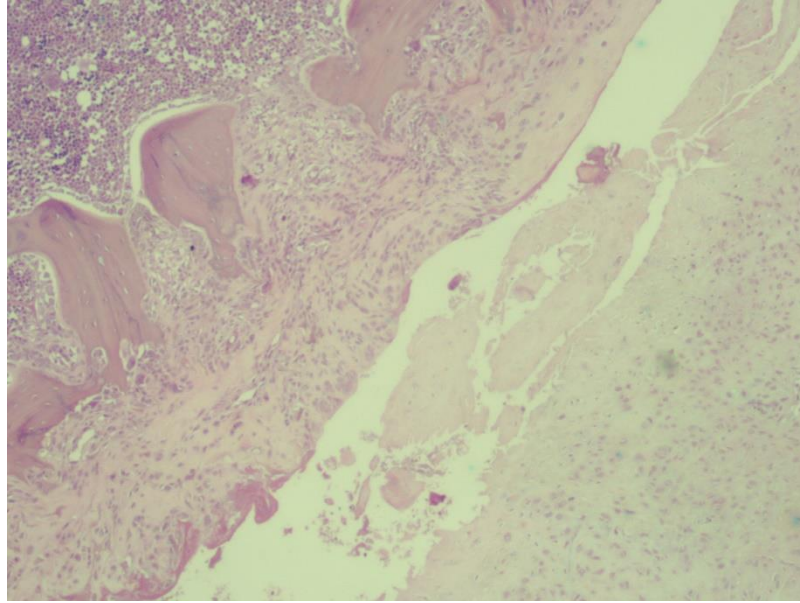
**Hình 3.19. Hình ảnh khớp gối lô mô hình sau 6 tuần tiêm MIA
Màng hoạt dịch viêm**



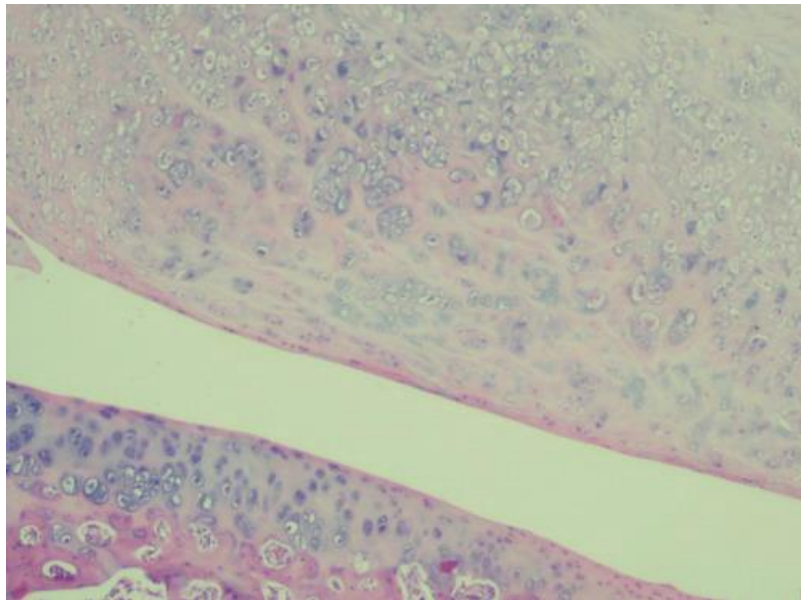
***Hình 3.20. Hình ảnh khớp gối lô chứng sau 6 tuần (HE x 20)
(Chuột số 1)***



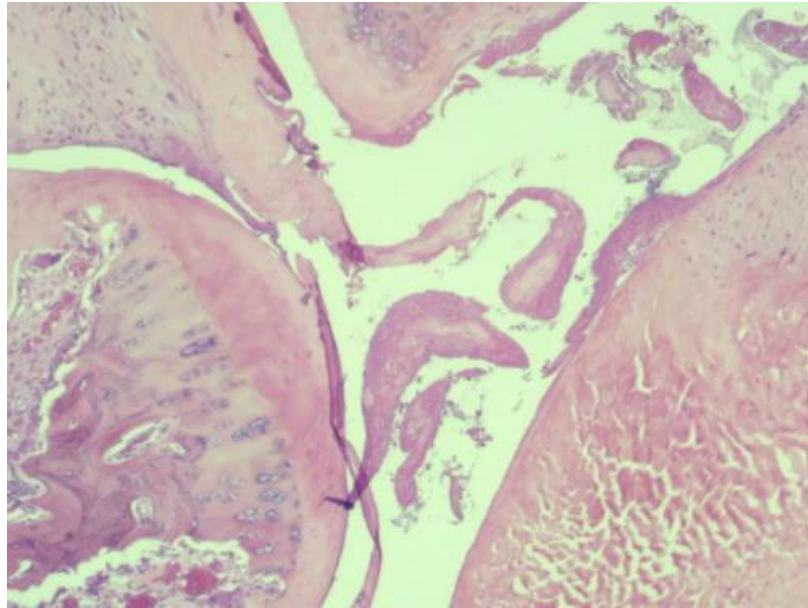
***Hình 3.21. Hình ảnh khớp gối lô mô hình sau 6 tuần (HE x 20)
Hình ảnh lớp sụn bề mặt bào mòn (Chuột số 13)***



Hình 3.22. Hình ảnh khớp gối lô mô hình sau 6 tuần (HE x 20)
Khe khớp hẹp, tổn thương cấu trúc sụn (Chuột số 11)

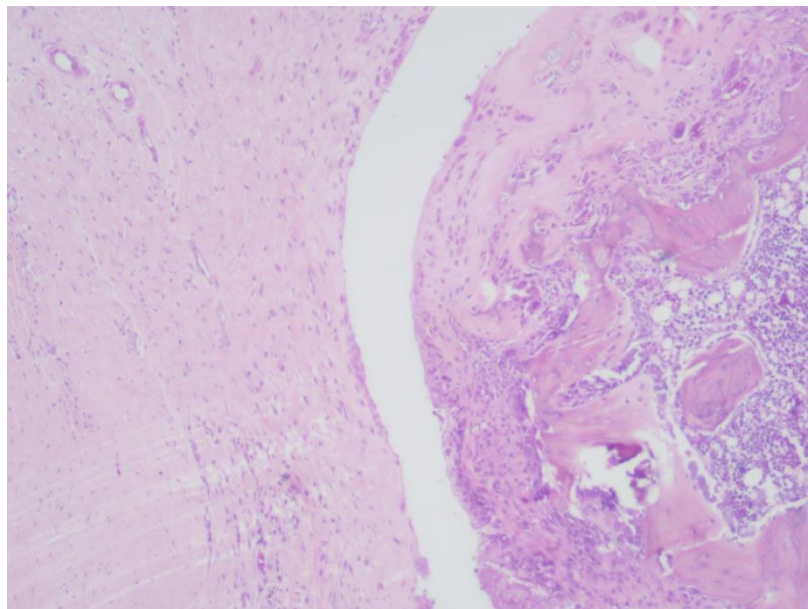


Hình 3.23. Hình ảnh khớp gối lô uống diclofenac sau 6 tuần (HE x 20)
Bề mặt sụn tương đối lành, cấu trúc sụn tổn thương nhẹ
(Chuột số 24)



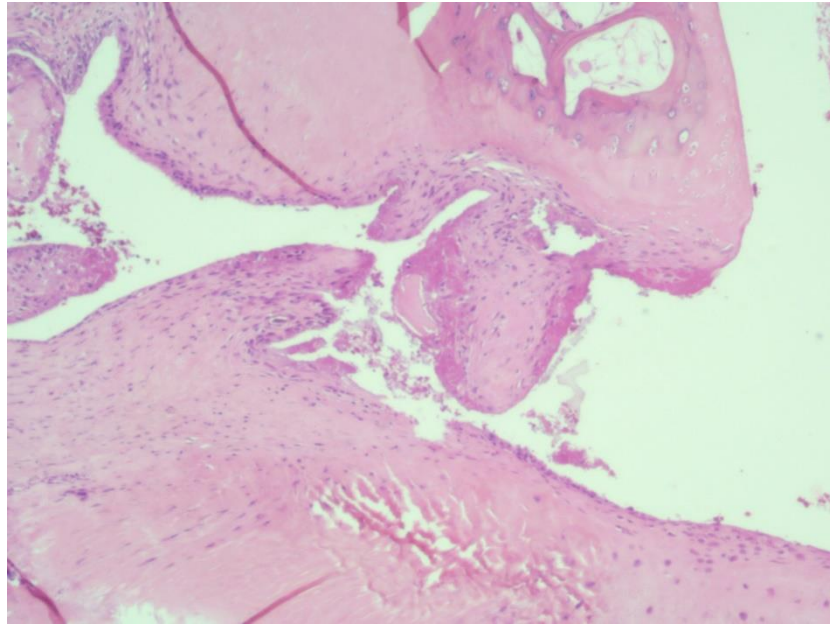
Hình 3.24. Hình ảnh khớp gối lô uống diclofenac sau 6 tuần (HE x 20)

Gai xương mức độ nhẹ (Chuột số 29)

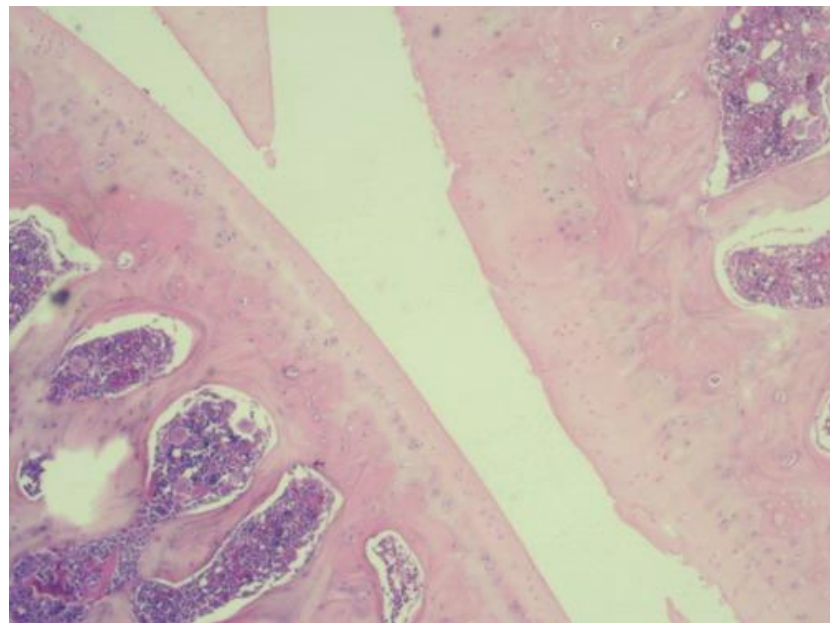


Hình 3.25. Hình ảnh khớp gối lô uống TD0015 liều 1,2g/kg sau 6 tuần (HE x 20)

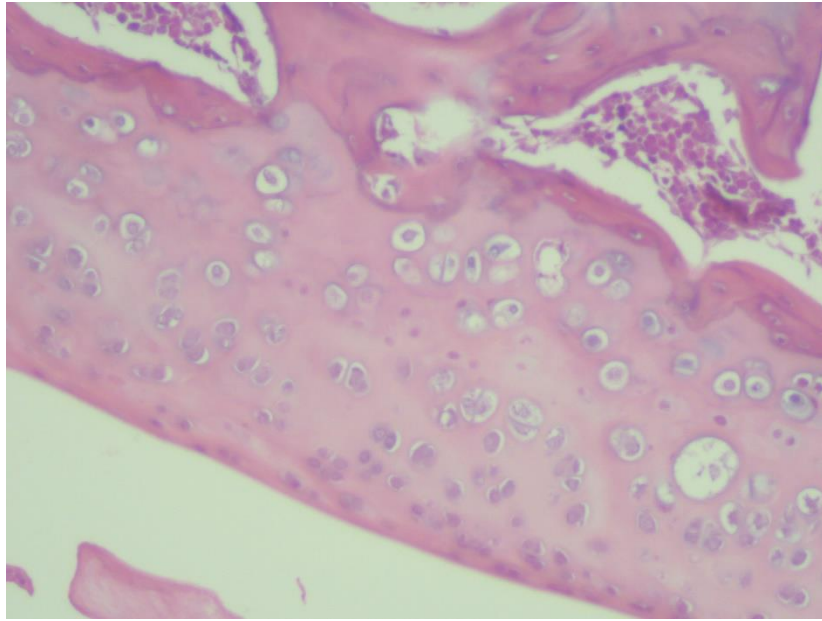
Sụn tổn thương, bề mặt mất nhẵn (Chuột số 47)



**Hình 3.26. Hình ảnh khớp gối lô uống TD0015 liều 1,2g/kg sau 6 tuần (HE x 20)
Gai xương mức độ nhẹ, viêm màng hoạt dịch (Chuột số 48)**



**Hình 3.27. Hình ảnh khớp gối lô uống TD0015 liều 3,6g/kg sau 6 tuần (HE x 20)
Bề mặt sụn tương đối nhẵn, sụn tổn thương nhẹ
(Chuột số 40)**



***Hình 3.28. Hình ảnh khớp gối lô uống TD0015 liều 3,6g/kg sau 6 tuần (HE x 40)
Bề mặt sụn nhẵn, cấu trúc sụn tổn thương mức độ nhẹ
(Chuột số 35)***

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

Viên hoàn TD0015 là phối hợp các dược liệu gồm: *Hoàng bá, Sinh địa, Tri mẫu, Bạch thược, Quy bản, Phục linh, Đỗ trọng, Dương quy, Đảng sâm, Phòng phong, Tang ký sinh, Tần giao, Ngưu tất, Trần bì, Xuyên khung, Cam thảo, Độc hoạt, Qué chi, Tế tân, Hoa đào, cao xương hổn hợp*. Phối hợp này được xây dựng dựa trên cơ sở lý luận của Y học cổ truyền, là bài Độc hoạt tang ký sinh gia thêm các vị: *Hoàng bá, Tri mẫu, Quy bản, Trần bì, cao xương hổn hợp*. Độc hoạt tang ký sinh là bài thuốc cổ phương (trích trong Thiên kim phương) đã được sử dụng nhiều trên các bệnh nhân có bệnh lý viêm khớp và thoái hóa khớp do có tác dụng trừ phong thấp, bổ khí huyết, ích can thận, chỉ thống tý. Thoái hóa khớp theo y học hiện đại là sự tổn thương các cấu trúc tại khớp, gồm hai triệu chứng chính là viêm và đau. Thuốc điều trị thoái hóa khớp hiện nay chủ yếu làm giảm đau, chống viêm và ức chế sự phá hủy sụn khớp. Các dược liệu hoặc phối hợp dược liệu có trong viên hoàn TD0015 đã được chứng minh tác dụng giảm đau, chống viêm, ức chế phá hủy đồng thời tăng sinh sụn và tăng biểu hiện collagen, có hiệu quả trong điều trị thoái hóa khớp. Viên hoàn TD0015 đã được kiểm nghiệm đạt yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở và được sản xuất bởi Công ty Cổ phần Sao Thái Dương.

Liều dự kiến dùng trên người của viên hoàn cứng TD0015 là 10g/ngày, tương đương 0,2 g/kg/ngày (tính trung bình người nặng 50 kg). Ngoại suy liều từ người sang động vật thực nghiệm, chuột nhắt tính theo hệ số 12, chuột cống hệ số 6 [158], liều dùng có tác dụng tương đương trên người của chuột nhắt là 2,4 g/kg, chuột cống 1,2 g/kg. Đây là cơ sở để tính liều dùng trên động vật thực nghiệm trong nghiên cứu này.

4.1. Độc tính của viên hoàn cứng TD0015 trên động vật thực nghiệm

Để có cơ sở khoa học đảm bảo an toàn cho người sử dụng một chế phẩm mới trên lâm sàng, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn của dược liệu nhằm đánh giá tính an toàn trước khi điều trị.

4.1.1. Độc tính cấp

Xác định độc tính cấp của một loại thuốc mới, dược liệu mới hay phối hợp dược liệu là rất cần thiết, cung cấp các thông tin về triệu chứng ngộ độc, thời gian ngộ độc, từ đó ước tính được mức độ gây độc của thuốc thử sau khi uống (thường là liều đơn hoặc đa liều trong 24 giờ kể từ khi tiếp xúc với thuốc thử). Đường dùng trong nghiên cứu độc tính cấp có thể là đường tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, ... hay gặp nhất là đường uống. Tốt nhất là thử nghiệm theo đường dùng dự kiến trên lâm sàng. Các chỉ số cần xác định trong phép thử độc tính cấp bao gồm: liều an toàn; liều dung nạp tối đa; liều gây ra độc tính có thể quan sát được; liều thấp nhất có thể gây chết động vật thí nghiệm (nếu có); liều LD₅₀ (liều gây chết 50% số động vật thực nghiệm) gần đúng (nếu có thể xác định được); và những tác dụng không mong muốn điển hình có thể quan sát được trên động vật cũng như khả năng hồi phục nếu có [146].

Động vật sử dụng trong nghiên cứu độc tính cấp tốt nhất gồm 2 loài: loài gặm nhấm và loài không phải gặm nhấm, thường dùng nhất là chuột cống hoặc chuột nhắt. Động vật giống cái nhạy cảm với độc tính của thuốc hơn nên là lựa chọn thích hợp để xác định các biểu hiện độc cấp tính. TD0015 nhắm đến đích điều trị là thoái hóa khớp, vì vậy đối tượng sử dụng bao gồm cả hai giống. Động vật thí nghiệm được sử dụng trong phép thử độc tính cấp trong luận án này là chuột nhắt trưởng thành cả hai giống với phương pháp tiến hành được lựa chọn thực hiện theo mô hình Litchfield-Wilcoxon [146].

TD0015 gồm 21 vị dược liệu. Độc tính của TD0015 có thể bị ảnh hưởng bởi độc tính của từng vị dược liệu hay tương tác của các vị dược liệu trong bài. Một số nghiên cứu của các tác giả trên thế giới đã công bố LD₅₀ của một số hoạt chất, nhóm hoạt chất, dược liệu là thành phần trong viên hoàn TD0015, số liệu này được tổng hợp trong Bảng 4.1.

Bảng 4.1. Giá trị LD50 của một số dược liệu, hoạt chất, nhóm hoạt chất trong TD0015 [159]

Dược liệu	Động vật	LD50 (g/kg)	Đường dùng
Hoàng bá	Chuột nhắt	2,7	Tiêm màng bụng
Phục linh	Chuột nhắt	> 10 > 2	Uống Tiêm màng bụng
Tần giao	Chuột nhắt	0,48 0,35 0,25-0,3	Uống Tiêm màng bụng Tiêm tĩnh mạch
Bạch thực	Chuột cống Chuột nhắt	81 3,52	Uống Tiêm tĩnh mạch
Đảng sâm	Chuột nhắt	> 10 79	Uống Tiêm màng bụng
Độc hoạt (<i>Xanthotoxin</i> <i>Bergapten</i>)	Chuột cống	0,945	Tiêm bắp
Đương quy	Chuột cống Chuột nhắt	100 > 40	Tiêm tĩnh mạch Uống
Trần bì	Chuột nhắt	72	Tiêm tĩnh mạch
Phòng phong	Chuột nhắt	213,8	Uống
Xuyên khung	Chuột nhắt	0,239 65,86	Tiêm tĩnh mạch Tiêm màng bụng

Nguru tất (Hỗn hợp ecdysteron và inoteosteron)	Chuột nhắt	9	Uống
Đỗ trọng	Chuột nhắt	574,1	Tiêm tĩnh mạch

Bảng 4.1 cho thấy hầu hết các vị thuốc trong TD0015 đều có LD50 lớn, ngay cả với đường dùng là đường tiêm. Khi phối hợp các vị thuốc trong bài thuốc này không thể hiện độc tính cấp trên chuột nhắt trắng ở liều đã dùng, có thể do số lượng mỗi vị trong bài thuốc thấp hoặc tương tác giữa các vị thuốc trong bài đã làm giảm độc tính của mỗi vị.

Chuột nhắt uống TD0015 với liều tăng dần từ 15g/kg/ngày đến 37,5g/kg/ngày (liều lớn nhất có thể cho chuột nhắt trắng uống được bằng kim đầu tù), nhưng không có chuột nào chết và không thấy biểu hiện bất thường nào ở chuột. Giá trị LD₅₀ của TD0015 được ước tính > 37,5 g/kg thể trọng. Liều dùng khuyến cáo trên người là 10 g/ngày, liều ngoại suy tương đương sang chuột nhắt được tính ở trên là 2,4 g/kg/ngày. Như vậy, chuột nhắt trắng đã được uống đến liều gấp 15,625 lần liều dùng trên người nhưng không có biểu hiện độc tính cấp.

4.1.2. Độc tính bán trường diễn

Ngoài một số dược liệu có biểu hiện tác dụng và độc tính nhanh, phần lớn các dược liệu phải dùng thời gian dài mới biểu hiện tác dụng hoặc tác dụng không mong muốn. Vì vậy, khi sử dụng các dược liệu kéo dài trên lâm sàng, việc nghiên cứu độc tính dài ngày là hoàn toàn cần thiết và là yêu cầu bắt buộc để đảm bảo vấn đề đạo đức trong nghiên cứu y sinh.

Dựa vào hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu của Bộ Y tế, khi thuốc thử không thể hiện độc tính cấp hoặc rất ít độc, có thể tiến hành thử độc tính dài ngày trên một loài động vật (gặm nhấm). Do vậy có thể tiếp tục đánh giá độc tính bán trường diễn của TD0015 trên một loài động vật, cụ thể là chuột cống [145].

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn được thực hiện bằng cách cho động vật thí nghiệm uống thuốc thử hàng ngày liên tục trong một khoảng thời gian nhất định. Theo WHO, đối với một thuốc Y học cổ truyền, thời gian nghiên cứu độc tính bán trường diễn phụ thuộc vào thời gian dự kiến dùng trên người. TD0015 dự kiến dùng 3 tháng trên người. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đánh giá độc tính bán trường diễn trên chuột cống với hai liều: liều 1,2 g/kg/ngày là liều có tác dụng tương đương trên người (tính theo hệ số 6) và một liều cao hơn gấp 3 lần liều trên (3,6 g/kg/ngày), uống liên tục trong 90 ngày [145],[147]. Các chỉ tiêu để đánh giá độc tính bán trường diễn bao gồm: tình trạng chung và thay đổi trọng lượng, các chỉ số huyết học, các chỉ số sinh hoá đánh giá chức năng gan, thận và đặc điểm giải phẫu bệnh.

4.1.2.1. Tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng

Khi nghiên cứu độc tính, dù là độc tính cấp hay độc tính dài ngày, đánh giá tình trạng chung của động vật nghiên cứu là một chỉ số rất có ý nghĩa, phản ánh ảnh hưởng của thuốc lên toàn trạng của động vật bao gồm thói quen ăn uống, lượng thức ăn tiêu thụ, tình trạng bài tiết phân và nước tiểu, khả năng vận động. Trong 90 ngày nghiên cứu, chuột cống uống viên hoàn cứng TD0015 ở cả 2 liều đều không có biểu hiện bất thường về khả năng vận động cũng như bài tiết. Tuy nhiên, từ thời điểm sau 60 ngày uống thuốc, chuột cống uống TD0015 ở cả 2 liều có giảm lượng thức ăn tiêu thụ so với lô chứng sinh học nhưng không có biểu hiện bất thường đi kèm. Sự giảm lượng ăn vào của chuột uống TD0015 dẫn đến sự giảm gia tăng trọng lượng của chuột tương ứng từ sau 60 ngày, nhưng trọng lượng giữ ổn định, không giảm so với trước nghiên cứu. Đối chiếu với nồng độ albumin trong máu chuột thấy không có hiện tượng giảm, như vậy sơ bộ nhận định dinh dưỡng của chuột vẫn được đảm bảo.

Sự giảm lượng tiêu thụ thức ăn có thể do nhiều nguyên nhân như: thức ăn không hấp dẫn, giảm cảm giác thèm ăn, chậm tháo rỗng dạ dày... Trong số các vị dược liệu có trong thành phần TD0015, Đảng sâm và Quế chi đã được báo cáo về tác dụng giảm sự gia tăng trọng lượng của chuột cống nhưng cơ chế chưa được làm rõ [159].

Dù không làm tăng cân so với lô chứng sinh học nhưng TD0015 ở các mức liều 1,2 g/kg/ngày và 3,6 g/kg/ngày không làm ảnh hưởng xấu tới tình trạng chung của chuột trong 90 ngày uống thuốc liên tục.

4.1.2.2. Ảnh hưởng đến chức năng tạo máu

Máu là một tổ chức quan trọng trong cơ thể, là cơ quan nhạy cảm nhất với các hợp chất có độc tính. Căn cứ vào các chỉ số thuộc hệ tạo máu, phần nào có thể phản ánh chính xác tình trạng sinh lý và bệnh lý của cơ thể. Nếu thuốc ảnh hưởng đến cơ quan tạo máu thì các thành phần của hệ tạo máu sẽ biến đổi trước tiên. Theo Tổ chức Y tế thế giới, càng nhiều thông số của máu được đánh giá, độc tính của thuốc càng có khả năng xác định chính xác hơn [145],[147]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành định lượng các thành phần của máu gồm: số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.

Huyết sắc tố trong hồng cầu đảm nhận nhiệm vụ vận chuyển oxy tới cơ quan trong cơ thể và lấy CO₂ tại các tế bào khi qua các mao mạch thải qua phổi. Định lượng huyết sắc tố sẽ biết được chức năng của hồng cầu. Thể tích trung bình hồng cầu (MCV) là tỷ lệ giữa hematocrit và số lượng hồng cầu. Hematocrit là tỷ lệ phần trăm giữa khối hồng cầu và máu toàn phần. Nếu thuốc làm giảm số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit sẽ gây nên tình trạng thiếu máu. Kết quả nghiên cứu trong các bảng 3.3 và 3.4 cho thấy, các chỉ số về hồng cầu không có sự khác biệt giữa các lô uống TD0015 và lô chứng sinh học. Như vậy, TD0015 ở cả 2 liều nghiên cứu uống liên tục trong 90 ngày không gây ảnh hưởng tới hồng cầu và không gây thiếu máu.

Số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu trong máu ngoại vi cho phép đánh giá hoạt động của hệ miễn dịch bảo vệ cơ thể cũng như một phần chức năng của hệ tạo máu. Bảng 3.5 và 3.6 cho thấy, không có sự thay đổi giữa số lượng bạch cầu và tỷ lệ phần trăm các loại bạch cầu trong máu của các lô chuột uống TD0015 so với chứng sinh học.

Tiểu cầu có nhiệm vụ chính tham gia vào cơ chế đông - cầm máu. Đánh giá số lượng tiểu cầu sau dùng thuốc là gián tiếp đánh giá sự ảnh hưởng của thuốc lên quá trình đông máu và cầm máu của cơ thể. Số lượng tiểu cầu ở các lô uống TD0015 không có sự khác biệt so với lô chứng sinh học, điều này cho thấy thuốc thử không ảnh hưởng đến quá trình sản xuất tiểu cầu, không gây ra hiện tượng tăng phá hủy tiểu cầu trong máu ngoại vi.

Từ các kết quả trên có thể kết luận rằng, TD0015 liều 1,2 g dược liệu/kg/ngày và 3,6 g dược liệu/kg/ngày uống liên tục trong 90 ngày không có tác động xấu đến chức năng của cơ quan tạo máu trên động vật thực nghiệm.

4.1.2.3. Ảnh hưởng đến các chỉ số đánh giá chức năng gan, mức độ hủy hoại tế bào gan và giải phẫu bệnh gan

* Ảnh hưởng lên một số chức năng gan

Gan có thể coi là cơ quan cửa ngõ của cơ thể, có vai trò rất quan trọng trong việc đảm nhận nhiều chức năng phức tạp, đặc biệt là các quá trình chuyển hóa. Thuốc vào cơ thể, khi chuyển hóa tại gan có thể gây độc cho gan, làm ảnh hưởng đến các chức năng gan. Vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc đến chức năng gan là bắt buộc khi đánh giá độc tính của thuốc thử [145],[147].

Gan có hệ enzym chuyển hóa rất phong phú, nhờ đó mà tham gia vào hầu hết các chức năng chuyển hóa protein, lipid, tạo mật, ... của cơ thể. Với quá trình chuyển hóa protein, gan tổng hợp phần lớn protein trong huyết thanh: albumin, globulin và một số yếu tố đông máu. Albumin chỉ được tổng hợp tại gan nên nồng độ albumin trong máu sẽ phản ánh được một phần chức năng chuyển hóa protein của gan, thậm chí có giá trị hơn xét nghiệm protein toàn phần.

Gan tạo ra mật, bài tiết mật vào tá tràng, tham gia vào quá trình tiêu hoá. Các thành phần của mật bao gồm nước, muối mật, cholesterol, lecithin, sắc tố mật,... Bilirubin là sản phẩm giáng hóa hemoglobin trong hồng cầu, là thành phần chính trong sắc tố mật. Xét nghiệm định lượng bilirubin trong máu để thăm dò chức năng bài tiết và chuyển hoá mật của gan để thực hiện và cho kết quả chính xác. Bilirubin

là sản phẩm thoái hóa của hemoglobin ở lưới nội mạc võng mô như gan, lách, tuỷ xương. Bilirubin toàn phần huyết thanh gồm bilirubin gián tiếp và bilirubin trực tiếp. Bilirubin trực tiếp còn gọi là bilirubin liên hợp (liên hợp với acid glucuronic), liên quan đến chức năng gan và độc tính của thuốc trên tế bào gan [160]. Khi chức năng gan thay đổi do độc tính của thuốc, sẽ làm thay đổi nồng độ bilirubin liên hợp trong huyết thanh, dẫn đến thay đổi nồng độ bilirubin toàn phần. Vì vậy, khả năng bài tiết của gan có thể được đánh giá thông qua định lượng nồng độ bilirubin toàn phần trong huyết thanh. Kết quả bảng 3.7 cho thấy TD0015 cả 2 mức liều đều không làm ảnh hưởng xấu đến chỉ số albumin và bilirubin toàn phần trong máu chuột ở các thời điểm nghiên cứu. Như vậy, TD0015 liều 1,2 g/kg/ngày và 3,6 g/kg/ngày uống 90 ngày liên tục không gây ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa protein và bài tiết mật của gan chuột cống.

Một trong những chức năng quan trọng khác của gan là tổng hợp và chuyển hóa lipid. Cholesterol là một phần của mật, được gan tổng hợp, ester hóa và thải ra ngoài. Vì vậy xét nghiệm định lượng nồng độ cholesterol toàn phần trong máu có thể được sử dụng để đánh giá chức năng chuyển hóa lipid của gan. Kết quả bảng 3.8 cho thấy nồng độ cholesterol toàn phần trong huyết thanh của cả 2 lô trị sau 90 ngày uống thuốc giảm có ý nghĩa thống kê so với trước nghiên cứu và so với lô chứng sinh học cùng thời điểm ($p < 0,05$). Đây khó có thể coi là ảnh hưởng xấu đến chức năng gan vì thông thường, nếu thuốc có độc tính lên chức năng tổng hợp cholesterol sẽ biểu hiện bằng việc tăng nồng độ cholesterol toàn phần. Tuy nhiên, do nghiên cứu không thực hiện định lượng các chỉ số lipoprotein thành phần nên chưa thể xác định rõ biến đổi cụ thể của các thành phần lipid. Cần đánh giá riêng ảnh hưởng của TD0015 lên các chỉ số lipid máu. Mặt khác, có một số nghiên cứu đã chứng minh tác dụng hạ cholesterol máu của các thành phần dược liệu có trong TD0015 như:

- Paeoniflorin phân lập từ dịch chiết cồn của Bạch thược có tác dụng hạ cholesterol trên chuột cống được gây rối loạn lipid máu. Paeoniflorin làm giảm đáng kể nồng độ cholesterol, LDL và triglycerid so với nhóm đối chứng ở liều 200 và 400 mg / kg, uống 1 lần/ngày trong 4 tuần liên tục [159],[161]

- Các thành phần có trong Nguru tất như saponin, polysaccharid có tác dụng hạ lipid máu và chống xơ vữa trên thực nghiệm [96],[162]

- Hesperidin từ Trần bì cũng được báo cáo về tác dụng hạ cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL và acid béo trong máu trên chuột cống đái tháo đường trong các nghiên cứu của Osama và Satoko [163],[164]

Từ các kết quả nghiên cứu trên, có thể cho rằng TD0015 cả 2 liều không có ảnh hưởng xấu đến chức năng gan. Thoái hóa khớp là bệnh lý thường gặp ở người cao tuổi, lứa tuổi này rất hay bị các bệnh lý về chuyển hóa, điển hình là tăng cholesterol máu, vì vậy TD0015 làm giảm nồng độ cholesterol toàn phần là một ưu điểm của thuốc khi điều trị trên lâm sàng với nhóm bệnh nhân có rối loạn chuyển hóa lipid máu đi kèm. Dù vậy, để khẳng định tác dụng này, cần thiết phải có một nghiên cứu riêng rẽ đánh giá tác dụng điều chỉnh rối loạn lipid máu và chống xơ vữa của TD0015 trên thực nghiệm.

* Ảnh hưởng lên mức độ hủy hoại tế bào gan và giải phẫu bệnh gan

Để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan, người ta thường định lượng hoạt độ các enzym có nguồn gốc tại gan trong huyết thanh. Sự tăng hoạt độ các enzym gắn liền với độc tính của thuốc do sự hủy hoại tế bào gan. ALT là enzym có nhiều nhất ở gan, khu trú trong bào tương của tế bào nhu mô gan. Khi tổn thương hủy hoại tế bào gan, thậm chí chỉ cần thay đổi tính thấm của màng tế bào gan, hoạt độ ALT đã tăng cao.

Khác với ALT, AST không đặc hiệu hoàn toàn cho gan vì còn có mặt trong nhiều loại tế bào khác như cơ vân, cơ tim, não, thận, phổi, hồng cầu, bạch cầu, và cũng có thể tăng cao do tổn thương các cơ quan này. Trên lâm sàng, AST còn được sử dụng như một dấu ấn sinh học để chẩn đoán nhồi máu cơ tim cấp. Trong tế bào gan, AST cũng chủ yếu ở trong ty thể, chỉ 1/3 khu trú ở bào tương của tế bào. Khi tổn thương tế bào gan ở mức độ dưới tế bào, AST trong ty thể mới được giải phóng ra ngoài. Vì vậy, trong tổn thương gan, hoạt độ ALT luôn tăng cao hơn AST

[160]. Sự tăng hoạt độ các enzym này thường gắn liền với độc tính của thuốc do có sự hủy hoại tế bào gan.

Giải phẫu đại thể và vi thể các cơ quan, trong đó gan là cơ quan chính chịu trách nhiệm chuyển hóa thuốc, là chỉ số bắt buộc khi đánh giá độc tính bán trường diễn theo hướng dẫn của WHO [147]. Trên tất cả các chuột thực nghiệm (cả lô chứng và 2 lô trị), không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về cấu trúc đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hóa của chuột. Đánh giá trên vi thể có giá trị hơn các xét nghiệm sinh hóa vì tổn thương xuất hiện sớm, đặc hiệu và rõ ràng ngay cả khi các chỉ số enzym gan chưa thay đổi (do chức năng còn bù trừ được). Theo hướng dẫn của WHO, với các nghiên cứu bán trường diễn, khi kết thúc nghiên cứu phải có ít nhất 30% số động vật trong từng lô được đánh giá ngẫu nhiên trên vi thể [147]. Gan chuột ở tất cả các lô không có tổn thương về mặt đại thể cũng như vi thể. Kết quả này phù hợp với xét nghiệm đánh giá chức năng gan và mức độ hủy hoại tế bào gan, đặc biệt là nồng độ AST và ALT ở 2 lô uống TD0015, từ đó cho thấy TD0015 cả 2 liều không gây hủy hoại tế bào gan và không làm biến đổi cấu trúc vi thể gan trong 90 ngày uống thuốc liên tục.

4.1.2.4. Ảnh hưởng của TD0015 đến chức năng lọc của cầu thận và giải phẫu bệnh thận

Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể. Nhu mô thận rất dễ bị tổn thương bởi các chất nội sinh và ngoại sinh [147],[160]. Thận dễ bị ngộ độc hơn các mô khác trong cơ thể vì thận là nơi có nhiều máu đi qua nhất. Vì vậy, khi đưa thuốc vào cơ thể, phần lớn thuốc sẽ được đào thải qua thận, thuốc có thể gây độc, làm tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng đến chức năng thận.

Đánh giá chức năng thận khi dùng thuốc, thường dùng xét nghiệm định lượng creatinin máu. Cũng có thể sử dụng nồng độ ure máu, tuy nhiên, ure trong máu được tạo ra từ quá trình phân hủy protein từ thực phẩm sử dụng hàng ngày, được lọc qua cầu thận và tái hấp thu ở ống thận. Do đó chỉ số này phụ thuộc vào chế độ ăn. Khác với ure, creatinin là chất chuyển hóa cuối cùng do quá trình hoạt động của cơ bắp tiết

ra. Creatinin được bài tiết qua thận nhờ quá trình lọc tại cầu thận và không được tái hấp thu ở ống thận. Creatinin là thành phần đạm trong máu ổn định, hầu như không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý, chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Vì vậy, định lượng creatinin máu là chỉ số đáng tin cậy hơn để đánh giá chức năng lọc của cầu thận. Kết quả bảng 3.10 cho thấy nồng độ creatinin trong máu chuột sau uống TD0015 ở cả hai liều không có sự thay đổi khác biệt với lô chứng và so sánh với trước khi uống thuốc ($p > 0,05$). Như vậy chức năng lọc của cầu thận không bị giảm hay thay đổi khác biệt sau khi uống TD0015 liên tục trong 90 ngày.

Cũng có vai trò quan trọng như gan, thận là cơ quan chính thải trừ thuốc khỏi cơ thể. Đánh giá tổn thương đại thể và vi thể thận là quy trình bắt buộc khi nghiên cứu độc tính bán trường diễn. Kết quả đại thể và vi thể thận chuột trong giới hạn bình thường, cho thấy TD0015 không làm ảnh hưởng đến chức năng và cấu trúc của thận chuột.

Từ các kết quả nghiên cứu trên có thể đưa ra nhận định rằng, TD0015 liều 1,2 g dược liệu/kg/ngày và 3,6 g dược liệu/kg/ngày uống liên tục trong 90 ngày không gây ra độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng, không làm ảnh hưởng đến các chỉ số đánh giá chức năng của cơ quan tạo máu, không gây tổn thương cấu trúc gan, không làm thay đổi một số chức năng gan (chuyển hóa protein, lipid, bài tiết mật), không ảnh hưởng xấu tới chức năng lọc của cầu thận.

Như vậy, có thể xếp TD0015 vào nhóm các thuốc không có độc tính khi sử dụng liều lặp lại dài ngày (90 ngày). Kết luận này phù hợp với một số nghiên cứu trên thế giới về độc tính dài ngày của từng vị dược liệu có trong TD0015 (Bảng 4.2).

Bảng 4.2. Một số nghiên cứu về độc tính liều lặp lại của dược liệu có trong TD0015

Dược liệu	Liều/ thời gian	Động vật	Đường dùng	Độc tính
Đương quy [159],[165]	1,5 và 3g/kg /3 tuần	Chuột cống	Uống	Tăng cholesterol
	1 và 2g/kg /4 tuần	Chuột cống	Uống	Không độc
Xuyên khung [159]	5 và 10mg/kg, 4 tuần	Chuột nhắt	Uống	Không độc
Ngưu tất [159]	60g/kg 30 ngày	Chuột nhắt	Uống	Không độc
Đỗ trọng [159]	200, 600, 1200mg/kg /4 tuần	Chuột cống	Uống	Không độc
Đảng sâm [166]	1,25 2,5 và 5,0g/kg /4 tuần	Chuột cống	Uống	Không độc

4.2. Tác dụng giảm đau của viên hoàn cứng TD0015

Viêm và đau là hai triệu chứng thường đi kèm trong các bệnh lý về xương khớp. Đau có thể do hậu quả của viêm nhưng cũng có thể do tổn thương biến dạng khớp, hẹp khe khớp, tổn thương sụn, bao hoạt dịch...

Tác dụng giảm đau của TD0015 bước đầu được đánh giá trên chuột bình thường, thông qua các mô hình gây đau bằng nhiều tác nhân khác nhau như nhiệt độ (mô hình Hot plate), tác nhân cơ học (phương pháp rê kim) và tác nhân hóa học (mô hình gây quặn đau bằng acid acetic) [149],[150]. Trong đó, mô hình mâm nóng Hot

plate và mô hình sử dụng máy rê kim dùng để đánh giá tác dụng giảm đau theo cơ chế trung ương, mô hình gây quặn đau bằng acid acetic để đánh giá tác dụng giảm đau theo cơ chế ngoại biên.

4.2.1. Tác dụng giảm đau trên mô hình Hot plate

Mô hình mâm nóng sử dụng nhiệt là tác nhân gây đau nhằm đánh giá tác dụng giảm đau trung ương của thuốc và so sánh với tác dụng của codein liều tương đương lâm sàng. Codein phosphat được sử dụng làm thuốc chứng dương bởi codein là dẫn xuất của morphin, có tác dụng giảm đau trung ương nhờ cơ chế làm tăng ngưỡng nhận cảm giác đau, đồng thời ức chế tất cả các điểm chốt trên đường dẫn truyền cảm giác đau của hệ thần kinh trung ương.

Kết quả nghiên cứu cho thấy codein 20mg/kg giảm đau rất rõ so với lô chứng sinh học, trong khi đó TD0015 cả hai liều 2,4g/kg/ngày và 7,2g/kg/ngày mới chỉ có xu hướng giảm đau, chưa thể hiện tác dụng rõ ràng.

Như vậy, theo mô hình này, cường độ kích thích gây ra cảm giác đau là dùng nhiệt tác động vào da và bộ phận nhận cảm giác đau gồm các loại thụ cảm thể nhận kích thích nhiệt. Khi kích thích bằng nhiệt, có sự dẫn truyền từ ngoại vi về tủy sống, từ tủy sống kích thích lên não, chuột có phản xạ liếm chân sau. TD0015 không có tác dụng ức chế phản xạ dẫn truyền thần kinh từ ngoại vi về não, vì vậy, không có tác dụng giảm đau theo cơ chế thần kinh thông qua tác động nhiệt vào da.

4.2.2. Tác dụng giảm đau trên máy rê kim

Phương pháp rê kim sử dụng tác nhân cơ học làm tác nhân gây đau cũng đánh giá tác dụng giảm đau trung ương của TD0015 thông qua đánh giá thời gian phản ứng với đau và cường độ lực gây đau của chuột.

Kết quả thu được cho thấy TD0015 liều 2,4g/kg/ngày và 7,2g/kg/ngày uống trong 5 ngày liên tục làm tăng rõ rệt lực gây phản xạ đau và thời gian đáp ứng với đau trên máy đo ngưỡng đau của chuột, tác dụng này tương đương giữa 2 liều nghiên cứu và tương đương với codein 20mg/kg.

Như vậy, trái với kết quả mô hình Hot plate, trên mô hình sử dụng máy rê kim, TD0015 cả 2 liều đều thể hiện tác dụng giảm đau rất rõ. Tác nhân gây đau trong mô hình này là cơ học, ngưỡng đánh giá là ngưỡng chịu đau của chuột với kim Von frey. Có thể cho rằng, TD0015 có tác dụng giảm đau trung ương với nguyên nhân gây đau là cơ học. TD0015 là thuốc có nguồn gốc cổ truyền, các vị dược liệu cần thời gian đủ để phát huy hiệu quả, thời gian uống thuốc của TD0015 chỉ có 5 ngày, có thể chưa đủ để thể hiện tác dụng giảm đau với nguyên nhân là nhiệt độ.

4.2.3. Tác dụng giảm đau trên mô hình gây quặn đau bằng acid acetic

Mô hình gây đau bằng acid acetic để đánh giá tác dụng giảm đau ngoại biên, dùng acid acetic kích thích gây viêm và đau tại chỗ. Cơ chế gây đau là do hóa chất kích thích các đại thực bào và dưỡng bào có mặt ở phúc mạc giải phóng các chất gây đau: TNF- α IL-1 β , IL-8 [149],[150]. Nhược điểm của phương pháp là chỉ có 1 tiêu chí đánh giá (số cơn quặn đau) nhưng lại được khắc phục bằng cách so sánh số cơn đau trong mỗi khoảng thời gian 5 phút tính từ lúc bắt đầu tiêm acid acetic cho đến hết phút thứ 30.

Trong mô hình này, aspirin được chọn làm chứng dương để đánh giá tác dụng giảm đau ngoại biên của thuốc. Aspirin ức chế sinh tổng hợp prostaglandin do ức chế có hồi phục enzym cyclooxygenase (COX), làm giảm PGF $_2\alpha$, làm giảm tính cảm thụ của các ngọn dây thần kinh cảm giác với các chất gây đau của phản ứng viêm như bradykinin, histamin, serotonin.

Thông qua đánh giá số cơn quặn đau của chuột, nghiên cứu cho thấy TD0015 liều 2,4g/kg/ngày và 7,2g/kg/ngày uống trong 5 ngày liên tục làm giảm số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu. Có sự khác biệt về hiệu quả giảm đau giữa 2 liều TD0015:

- Liều 2,4g/kg có tác dụng giảm đau xuất hiện sớm trong vòng 5 phút kể từ khi gây đau, nhưng chỉ kéo dài đến 25 phút.
- Liều 7,2g/kg xuất hiện tác dụng giảm đau sau 5 phút nhưng kéo dài tác dụng đến 30 phút sau gây đau.

Tuy nhiên, ngưỡng chịu đau của mỗi cá thể chuột không giống nhau nên khó dựa vào kết quả này để kết luận về sự khác biệt giữa tác dụng của 2 liều, nhưng có thể khẳng định được TD0015 có tác dụng giảm đau ngoại biên ngay từ liều lâm sàng.

Từ các kết quả trên, TD0015 đã thể hiện tác dụng giảm đau theo cả cơ chế trung ương và ngoại biên rất rõ. Có những bằng chứng hỗ trợ cho kết quả nghiên cứu của TD0015, một số dược liệu trong bài thuốc đã được chứng minh có tác dụng giảm đau:

- Nghiên cứu của Lee Bomi và cộng sự đã chứng minh Bạch thược có tác dụng làm giảm 39% số cơn quặn đau của chuột khi gây đau bằng tiêm acid acetic vào màng bụng chuột [111]. Paeoniflorin có trong Bạch thược có tác dụng giảm đau trung ương thông qua kappa opioid và alpha 2 adrenoceptor.

- Dịch chiết Độc hoạt, trong nghiên cứu của Xiaorong Li và cộng sự, nồng độ 60% với liều 1,5g/ kg làm giảm 57,4% số cơn quặn đau trong 15 phút của chuột ($p < 0,05$) [101].

- Một nghiên cứu khác của Shikha và cộng sự đã chỉ ra Tần giao có tác dụng làm giảm số cơn quặn đau của chuột cũng như kéo dài thời gian phản ứng với đau phụ thuộc nồng độ thuốc. Cụ thể, dịch chiết Tần giao với các liều 125 mg/kg, 250 mg/kg và 500 mg/kg làm giảm 66,66%, 77,55% và 88,78 % số cơn quặn đau trong 30 phút theo dõi, đồng thời làm tăng rõ rệt thời gian phản ứng với nhiệt của chuột. Tác dụng xuất hiện sau 15 phút và kéo dài ít nhất 180 phút sau uống [117].

- Nghiên cứu của Liu Qing Wu và cs cho thấy POG và chất chuyển hóa của nó là cimifugin có trong Phòng phong có tác dụng giảm đau do giảm biểu hiện của COX-2, tác dụng phụ thuộc liều dùng 1-30mg/kg, với ED50 là 1,6 mg [99].

- Chen YF và cs nghiên cứu trên mô hình mâm nóng, đau quặn bụng cho thấy dịch chiết methanol, chloroform, ethyl acetat của Đương quy có hiệu quả trong giảm đau, trong khi dịch chiết nước không thể hiện tác dụng này [121].

- Dịch chiết Ngưu tất ở liều 200mg/kg có tác dụng giảm đau trên mô hình đau quặn bụng, hiệu quả tương đương ibuprofen [115].

4.3. Tác dụng chống viêm của viên hoàn cứng TD0015

Thoái hóa khớp biểu hiện chủ yếu là đau và viêm tại khớp, ảnh hưởng nhiều đến chức năng vận động của bệnh nhân. Việc điều trị THK hiện nay chủ yếu tập trung vào điều trị chống viêm, giảm đau trong đợt cấp và cải thiện chức năng vận động cho người bệnh. TD0015 nhắm đến mục đích điều trị THK, vì vậy khả năng chống viêm, giảm đau là một tiêu chí quan trọng trong đánh giá hiệu quả của thuốc. Hơn nữa, dựa trên cấu trúc xây dựng bài thuốc gồm nhiều vị có tác dụng chống viêm, giảm đau khi nghiên cứu riêng rẽ, cần thiết phải đánh giá hiệu quả chống viêm, giảm đau của các vị khi phối hợp chung với nhau trong một chế phẩm.

4.3.1. Tác dụng chống viêm cấp

Hiện nay mô hình gây viêm cấp bằng carrageenin được nhiều nhà khoa học trên thế giới áp dụng vì carrageenin gây được các phản ứng viêm gần giống như cơ chế bệnh sinh của viêm [149]. Để so sánh tác dụng chống viêm của TD0015, nhóm nghiên cứu sử dụng chứng dương là aspirin, thuốc chống viêm kinh điển thường được dùng trong các mô hình đánh giá tác dụng viêm cấp với các cơ chế:

- Ức chế sinh tổng hợp prostaglandin do ức chế cyclooxygenase, làm giảm PGE2 là trung gian hóa học của quá trình viêm.
- Làm vững bền màng lysosom, ngăn cản sự giải phóng enzym phân giải, ức chế quá trình viêm.

** Trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin*

Carrageenin là một polysaccharid, khi tiêm vào chân chuột, sẽ khởi động quá trình viêm cấp, bản chất của quá trình này là sự đáp ứng của các tế bào miễn dịch chủ yếu các bạch cầu đa nhân trung tính, gây giãn mạch, bạch cầu xuyên mạch, tăng tiết các chất trung gian hoá học như prostaglandin, histamin, leucotrien... Mặt khác, quá trình viêm do kháng nguyên polysaccharid còn có sự tham gia của đáp ứng miễn dịch dịch thể do các lympho bào B đảm nhận. Các kháng nguyên không phụ thuộc tuyến ức như polysaccharid khi vào cơ thể sẽ được các lympho bào

B nhận diện và tự sản xuất kháng thể đặc hiệu mà không cần sự giúp đỡ của các lympho bào T [149],[150].

Bảng 3.14 cho thấy aspirin liều 200mg/kg có tác dụng làm giảm rõ rệt thể tích chân chuột ở các thời điểm 2 giờ, 4 giờ ($p < 0,05$ và $p < 0,001$). Sau 6 giờ và 24 giờ, thể tích chân chuột ở lô aspirin giảm ít so với lô chứng cho thấy hiệu quả chống viêm cấp của aspirin trong nghiên cứu này xuất hiện rất sớm nhưng tác dụng ngắn. Ở lô uống TD0015 liều 1,2 g/kg làm giảm độ phù chân chuột từ thời điểm sau 4 giờ nhưng rõ nhất sau 24 giờ với mức độ ức chế phù lên đến 40,7% so với chứng sinh học. Lô uống TD0015 liều 3,6 g/kg thể hiện tác dụng này sớm hơn, ngay từ thời điểm sau 2 giờ đã đạt 24,33% ức chế phù, có ý nghĩa thống kê so với chứng nhưng kém hơn so với aspirin, tác dụng này duy trì đến sau 24 giờ với hiệu quả chống viêm cấp tương đương liều 1,2g/kg với mức độ ức chế phù là 40,3%. Điều này cho thấy, TD0015 có tác dụng chống viêm cấp tốt hơn ở liều 3,6g/kg với hiệu quả sớm và kéo dài. TD0015 liều tương đương lâm sàng 1,2g/kg cho tác dụng chống viêm muộn hơn.

** Trên mô hình gây viêm màng bụng bằng formaldehyd và carrageenin*

Phương pháp gây viêm cấp màng bụng được thực hiện để nghiên cứu sâu hơn về tác dụng chống viêm của viên hoàn TD0015. Tác nhân gây viêm được dùng trong mô hình là hỗn hợp carrageenin và formaldehyd tiêm vào màng bụng chuột. Vì vậy mô hình này sẽ khởi động quá trình viêm cấp, bản chất của quá trình này là sự đáp ứng của các tế bào miễn dịch là các bạch cầu đa nhân trung tính nhưng do có mặt formaldehyd nên triệu chứng chủ yếu là tăng tiết dịch vào vị trí gây viêm. Thông qua mô hình này đánh giá được thuốc nghiên cứu có tác dụng làm giảm tính thấm thành mạch, giảm sự xâm nhập bạch cầu vào ổ viêm hay không. Nếu thuốc có tác dụng trên mô hình này sẽ góp phần làm giảm các triệu chứng sưng, nóng, đỏ, đau của phản ứng viêm. Mục đích đánh giá gồm có: sự thoát dịch thông qua định lượng số lượng dịch rỉ viêm, sự di chuyển của bạch cầu thông qua định lượng số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm, hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm [149].

Kết quả bảng 3.15 cho thấy TD0015 cả 2 liều và aspirin 200mg/kg có tác dụng làm giảm thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu và protein rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,01$), mức giảm của TD0015 cả 2 liều tương đương với aspirin 200mg/kg ($p > 0,05$). Như vậy, TD0015 liều 1,2g/kg và 3,6g/kg đều có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây viêm màng bụng, với hiệu quả tương đương.

Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu về tác dụng chống viêm cấp của các vị dược liệu trong TD0015 đã được báo cáo:

- Nghiên cứu của Cuellar và cộng sự trên mô hình gây phù tai chuột bằng 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate đã chứng minh Hoàng bá có khả năng ức chế phản ứng phù tai chuột lên đến 65%, mức giảm có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ [103]

- Chiết xuất Hoàng bá có thể điều chỉnh một cách hiệu quả sự giải phóng lipopolysaccharid (LPS) do NO và iNOS tạo ra. Ngoài ra, chiết xuất Hoàng bá cũng có thể làm giảm sự giải phóng LPS của TNF- α và IL-1 β . Sự ức chế của NO cho thấy Hoàng bá có thể ngăn chặn sự chết tế bào thần kinh do NO gây ra. Magnoforin và phellodendrin trong Hoàng bá chống lại phản ứng quá mẫn do tiếp xúc với oxazolone. Một cơ chế khác trong nghiên cứu này là phellodendrin giảm hoạt động của myeloperoxidase (MPO) đến mức tối đa bằng cách hạn chế sự di động của bạch cầu và / hoặc sự giải phóng chất trung gian hóa học. Các chất hóa học trong Hoàng bá có vai trò chống viêm là berberin, palmatin và phellodendrin [104]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra berberin ức chế sự sản xuất các chất trung gian gây viêm NO, PGE2 và IL8, IL-12 [105].

- Độc hoạt cũng thể hiện khả năng giảm viêm trong nghiên cứu của Xiaorong Li, Jiangning Wang và Lei Gao. Dịch chiết nồng độ 60% với liều 1,5g/ kg có khả năng ức chế phản ứng phù tai chuột 46,29 % ($p < 0,05$) [101].

- Bạch thược có tác dụng chống viêm chủ yếu qua trung gian tế bào thông qua ức chế đại thực bào, lympho bào, đồng thời làm giảm tiết các chất trung gian của phản ứng viêm như PGE2, LTB4, NO và các chất hóa ứng động bạch cầu đến ổ viêm [108],[109].

- Shikha và cộng sự đã chỉ ra tác dụng chống viêm cấp của Tần giao trên mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin. Trong nghiên cứu này, dịch chiết Tần giao với các liều 125mg/kg, 250mg/kg, 500 mg/kg làm giảm lần lượt 56,92%, 61,53% và 75,38% thể tích phù chân sau 3 giờ gây viêm với $p < 0,01$. Cơ chế chống viêm của Tần giao là giảm PGE2, ức chế COX-2 và NF- κ B [116],[117]

- Đương quy cũng thể hiện tác dụng chống viêm tương đương với aspirin liều 200mg/kg. Cụ thể, dịch chiết Đương quy với liều 0,176mL/kg có khả năng ức chế 53,85% phản ứng phù chân chuột. Nghiên cứu cũng chỉ ra cơ chế tác dụng của Đương quy thông qua làm giảm nồng độ histamin và 5-hydroxytryptamin, có vai trò quan trọng trong phản ứng phù viêm [120].

- WIN-34B chiết từ rễ khô của cây Tri mẫu, được Kang và cộng sự báo cáo năm 2010 về tác dụng giảm đau chống viêm hiệu quả trên chuột nhắt trong các mô hình giảm đau sử dụng mâm nóng, tail flick, mô hình chống viêm gây bởi acid acetic, phù chân chuột, dầu croton gây phù tai [123].

Như vậy, TD0015 có tác dụng chống viêm cấp, tác dụng này thể hiện rõ rệt ngay khi sử dụng với liều lâm sàng và tăng lên với liều gấp 3 liều lâm sàng. Cơ chế chống viêm của TD0015 có thể do giảm tính thấm thành mạch, làm giảm dịch rỉ viêm và lượng protein trong dịch rỉ viêm, đồng thời hạn chế sự di chuyển của bạch cầu vào mô viêm thông qua việc ức chế sản xuất các chất trung gian hóa học gây viêm như NO, PG E2, IL8, IL-12 hay histamin và 5-hydroxytryptamin.

4.3.2. Tác dụng chống viêm mạn

Nghiên cứu được thực hiện bằng cách cấy viên amiant đã tẩm carrageenin vào dưới da gây chuột. Amiant là dị vật khó bị loại bỏ khi đưa vào cơ thể. Carrageenin bản chất là polysaccharid, có khả năng kích thích quá trình viêm. Cấy amiant đã tẩm carrageenin vào dưới da gây chuột sẽ kích thích quá trình viêm mạnh hơn khi cấy amiant đơn thuần. Cơ thể sẽ phản ứng bằng cách tập trung nhiều tế bào, tạo ra mô bào lưới, nguyên bào sợi bao quanh vật lạ, tạo nên hình ảnh u hạt của mô hình viêm mạn trên thực nghiệm. Thuốc có tác dụng chống viêm mạn sẽ thể hiện

bằng việc ức chế sự tạo thành u hạt, làm giảm khối lượng u hạt so với nhóm chứng. So sánh trọng lượng u hạt giữa các lô uống thuốc và lô đối chứng giúp đánh giá thuốc có tác dụng chống viêm hay không [149].

Nhóm nghiên cứu chọn methylprednisolon là thuốc chứng dương, đây là một glucocorticoid, dẫn xuất của prednisolon, có tác dụng chống viêm thông qua các cơ chế: làm giảm số lượng các tế bào lympho, bạch cầu ái toan, bạch cầu đơn nhân trong máu ngoại biên và giảm sự di chuyển vào vùng bị viêm, ức chế chức năng của các tế bào lympho, đại thực bào của các mô. Ngoài ra, methylprednisolon còn giảm đáp ứng viêm do giảm tổng hợp prostaglandin vì ức chế phospholipase A2, tăng nồng độ lipocortin, giảm tính thấm mao mạch.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trên chuột nhắt, TD0015 liều 2,4g/kg/ngày (tương đương liều lâm sàng) và liều 7,2g/kg/ngày đều làm giảm trọng lượng khối u hạt cả trước và sau khi sấy khô. Mức giảm của TD0015 liều 7,2g/kg mạnh hơn liều 2,4g/kg và tương đương với tác dụng của methylprednisolon 10mg/kg.

Nghiên cứu có đánh giá thêm giải phẫu bệnh vi thể vùng rìa của 30% khối u hạt ở mỗi lô trước khi sấy khô. Xâm nhập viêm của các tế bào bạch cầu, lympho bào và hình thành vách xơ, huyết quản tân tạo tại khối u hạt, tăng sinh mô liên kết ở lô uống TD0015 cả 2 liều và methylprednisolon ít hơn so với lô chứng sinh học, cho thấy thuốc có khả năng chống tăng sinh và chống viêm mạn. Điều này phù hợp với kết quả về trọng lượng khối u hạt cân được trước và sau khi sấy khô.

Kết quả thu được trên thực nghiệm phù hợp với các nghiên cứu về tác dụng chống viêm mạn của từng vị dược liệu có trong TD0015:

- Xiaorong Li, Jiangning Wang và Lei Gao đã nghiên cứu và cho thấy tác dụng chống viêm mạn của Độc hoạt. Theo đó, dịch chiết 60% của Độc hoạt liều 1,5g/kg làm giảm 32,38% trọng lượng khô của mô hạt hình thành, kết quả có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ [101].

- Một nghiên cứu khác cũng sử dụng viên bông làm tác nhân viêm mạn được Shikha và cộng sự tiến hành. Trong nghiên cứu này, chất JG tách chiết từ Tàn giao với liều 250 và 500 mg/kg làm giảm rõ rệt trọng lượng khô của mô hạt ($p < 0,01$) [117].

- Paeoniflorin là thành phần chính trong Bạch thực có tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây viêm khớp bằng collagen. Cơ chế liên quan đến việc làm giảm biểu hiện của G-protein coupled receptor kinase 2 (GRK2) trên tế bào màng hoạt dịch dạng nguyên bào sợi (fibroblast-like synoviocytes -FLS) [110]

- Dịch chiết cỏ Nguưu tất có tác dụng ức chế gia tăng trọng lượng khối u hạt, tác dụng này phụ thuộc liều dùng và mạnh nhất ở mức liều 375mg/kg, 500mg/kg, hiệu quả tương đương với diclofenac [114].

4.4. Tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của TD0015 trên chuột cống

Đối với ngành công nghiệp dược phẩm, có ba đích quan trọng trong điều trị thoái hóa khớp: giảm đau, phục hồi chức năng, ngăn không cho bệnh tiến triển nặng lên. Việc phát triển thuốc mới nhằm vào cơ chế bệnh sinh của thoái hóa khớp là một hướng đi đúng, tuy nhiên hiện vẫn còn nhiều khó khăn, do vậy, liệu pháp điều trị hiện tại là giảm triệu chứng, phục hồi chức năng. Những biện pháp này chỉ có thể kéo dài thời gian cho tới khi bắt buộc phải phẫu thuật thay khớp để duy trì vận động cho bệnh nhân. Trước thực trạng này, sự phát triển các phương pháp điều trị mới cần thiết phải được xúc tiến và cần có hiểu biết sâu về sinh lý bệnh của thoái hóa khớp, cơ chế bệnh sinh, yếu tố viêm, di truyền, yếu tố nguy cơ từ môi trường, và khả năng xây dựng các mô hình thoái hóa khớp trên động vật mô phỏng được tình trạng bệnh. Với những tiến bộ của y học hiện đại, việc xây dựng mô hình thoái hóa khớp trên thực nghiệm cũng dần được cải thiện, cho phép kiểm soát mức độ và tốc độ tổn thương khớp, từ đó có thể phát hiện, điều chỉnh các triệu chứng và tiến triển của bệnh, tìm ra những phương pháp điều trị mới hiệu quả [140].

4.4.1. Về mô hình gây thoái hóa khớp gối trên chuột cống bằng MIA

Một mô hình thực nghiệm trên động vật lý tưởng là mô hình có chi phí tương đối thấp nhưng mô phỏng được tình trạng bệnh trong một thời gian ngắn, tuy nhiên

cũng không nên tiến triển quá nhanh vì sẽ làm mất triệu chứng ở những giai đoạn trung gian mô phỏng tiến triển của bệnh. Thoái hóa khớp tự phát được quan sát thấy ở một số loài động vật thí nghiệm như chuột lang, chuột hamster, một số chủng chuột đặc biệt, nhưng quá trình này diễn ra rất chậm, gây khó khăn cho việc nghiên cứu. Do vậy, các mô hình sử dụng phương pháp phẫu thuật tác động vào khớp và tiêm các hóa chất gây thoái hóa khớp (MIA – monosodium iodoacetat, collagenase,...) đã được phát triển để bệnh diễn biến nhanh hơn [140].

Phương pháp phẫu thuật gây thoái hóa khớp là một phương pháp khó, đòi hỏi phương tiện kỹ thuật cao và sự hiểu biết về khớp chọn để phẫu thuật. Trong điều kiện Việt Nam, phương tiện tiến hành và kỹ thuật mổ gây thoái hóa khớp trên động vật còn ít kinh nghiệm, việc đảm bảo vô khuẩn, duy trì hô hấp và sinh tồn cho động vật thực nghiệm khó khăn. Vì vậy, gây thoái hóa khớp bằng phương pháp sử dụng hóa chất tiêm tại khớp là lựa chọn thích hợp tại Việt Nam. Việc lựa chọn MIA thay vì collagenase có nhiều lý do [157]:

- Tỷ lệ gây thoái hóa khớp thành công do collagenase thất thường và không cao bằng MIA, có thể do bản chất collagenase là enzym nên hoạt tính không hằng định, dễ bị ảnh hưởng bởi môi trường, sự đáp ứng của mỗi cá thể động vật với collagenase cũng khác nhau, dẫn đến tổn thương thoái hóa tại khớp không có sự đồng đều.

- Thời gian khởi phát thoái hóa khớp gây ra do collagenase chậm hơn hẳn so với MIA. Khớp chuột sau tiêm MIA 2 tuần đã có đầy đủ đặc tính của một khớp bị thoái hóa, trong khi khớp chuột sau tiêm collagenase phải đến tuần thứ 6 mới có các đặc điểm tương tự MIA.

- Mô hình gây thoái hóa khớp bằng MIA được dùng rộng rãi trong các nghiên cứu liên quan đến đánh giá tác dụng giảm đau và tác dụng bảo vệ sụn khớp của thuốc thử.

- Với mục đích đánh giá tác dụng điều trị của thuốc trên mô hình thoái hóa khớp thực nghiệm, cần thiết phải gây được mô hình nhanh và đầy đủ các đặc điểm của một

khớp bị thoái hóa. Do vậy, gây thoái hóa khớp bằng MIA là một phương pháp có nhiều ưu thế.

Trong luận án này, mô hình gây THK gối thực nghiệm bằng MIA (monosodium-iodoacetate) lần đầu được tiến hành tại Việt Nam, sử dụng chất ức chế chuyển hóa MIA tiêm vào khớp gối của chuột. MIA có tác dụng ức chế hoạt tính của glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ở sụn khớp, dẫn đến sự gián đoạn quá trình chuyển hóa năng lượng từ thủy phân đường, các quá trình tổng hợp và thậm chí là sự chết tế bào, gây ra sự tăng sản hoạt dịch và xâm nhập tế bào viêm lặp đi lặp lại nhiều lần, từ đó làm mất dần lớp sụn khớp và tổn thương cấu trúc xương dưới sụn, tạo ra tình trạng bệnh tương tự THK trên lâm sàng. Mức độ nặng của khớp viêm phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tiêm MIA, nhiều nghiên cứu đã chứng minh MIA liều 3mg/khớp tiêm 1 lần có hiệu quả nhất trong việc gây mô hình THK để tiến hành các thử nghiệm [135],[137],[138],[139].

Theo dữ liệu bảng 1.5, áp dụng với điều kiện tại Việt Nam, nhóm nghiên cứu đã sử dụng chuột cống trắng làm đối tượng gây thoái hóa khớp gối với nhiều ưu điểm như: sẵn có, giá thành chấp nhận được, dễ thao tác và đánh giá các chỉ số về khớp, bệnh khởi phát nhanh và tổn thương tồn tại kéo dài.

Chẩn đoán thoái hóa khớp trên động vật thực nghiệm khó hơn trên người do không lượng giá được các triệu chứng cơ năng phụ thuộc người bệnh. Mô hình thoái hóa khớp cũng là một mô hình khá mới trong nghiên cứu thực nghiệm, do vậy đến nay chưa có tiêu chuẩn chẩn đoán rõ ràng, các nghiên cứu chủ yếu dựa vào các yếu tố sau [139],[140],[141],[143].

- Đánh giá triệu chứng viêm, đau, hạn chế vận động
- Định lượng các chỉ số cytokin đặc hiệu trong thoái hóa khớp
- Thăm dò hình ảnh: siêu âm, X-quang khớp (ở Việt Nam còn hạn chế do chưa có phương tiện kỹ thuật phù hợp).

- Đánh giá tổn thương giải phẫu bệnh khớp là tiêu chuẩn vàng trên mô hình thoái hóa khớp thực nghiệm, có giá trị chẩn đoán xác định và đánh giá mức độ, mà không thể thực hiện được trên bệnh nhân.

Trong khuôn khổ luận án, nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá các tiêu chí về đau, viêm, hạn chế vận động, một số chỉ số interleukin và giải phẫu bệnh vi thể khớp gối. Kết quả nghiên cứu trong 6 tuần cho thấy:

4.4.1.1. Về chỉ số đau và viêm

Hạn chế của các nghiên cứu về tác dụng của thuốc điều trị bệnh lý xương khớp trong thời gian trước là chưa gây được mô hình thoái hóa khớp thực nghiệm, do vậy khi đánh giá mới chỉ dừng lại ở tác dụng chống viêm, giảm đau trên các mô hình sử dụng động vật bình thường. Luận án này với mô hình thoái hóa khớp gối đầu tiên tại Việt Nam đã góp phần làm phong phú kho tàng nghiên cứu thực nghiệm, mở ra cánh cửa giúp việc phát triển thuốc mới được dễ dàng.

Chỉ số viêm trong mô hình thoái hóa khớp gối được đánh giá thông qua đường kính khớp gối của chuột [154]. Kết quả biểu đồ 3.1 cho thấy khớp gối ở lô mô hình tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học, thời điểm đạt đỉnh là sau 5 ngày tiêm MIA, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Calado năm 2015, tác giả báo cáo chỉ số đường kính khớp gối chuột tăng cao nhất trong thời gian từ 3 đến 7 ngày sau tiêm MIA [154]. Sau khi tiêm MIA, hóa chất phá hủy sụn khớp, giải phóng các chất trung gian hóa học gây viêm, giai đoạn từ sau 3 đến 7 ngày là lúc phản ứng viêm xảy ra mạnh nhất sau đó đường kính khớp giảm dần nhưng vẫn cao hơn rõ rệt so với lô chứng sinh học.

Trong mô hình thoái hóa khớp gối, đau được lượng giá ngay tại khớp gối tiêm MIA, thông qua phương pháp *Randall Selitto* [149]. Biểu đồ 3.2 cho thấy ngưỡng đau tại khớp gối giảm rõ so với lô chứng sinh học, mạnh nhất ở thời điểm sau 1 và 2 tuần tiêm MIA, có thể giải thích do khớp bị viêm, đặc biệt là giai đoạn ngay sau tiêm MIA, khớp đang viêm và sưng to, nhạy cảm hơn với các kích thích cơ học nên chuột có

phản xạ rút chân nhanh hơn vì đau. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Neugebauer khi tổng hợp các triệu chứng về đau của chuột được gây thoái hóa khớp [143].

Như vậy, qua các kết quả này, MIA đã gây ra tình trạng đau và viêm rất rõ trên khớp gối bị thoái hóa, cho phép đánh giá tác dụng của thuốc điều trị dễ dàng.

4.4.1.2. Về khả năng vận động bị hạn chế

Hạn chế vận động khớp do nhiều nguyên nhân, trong thoái hóa, phần lớn là do viêm, đau và tổn thương sụn dẫn đến các cử động khó khăn. Trên thế giới, việc đánh giá khả năng vận động của động vật thực nghiệm sử dụng những loại máy rất hiện đại, như hệ thống máy phân tích dáng đi, đánh giá khả năng phối hợp vận động và chịu lực lên hai chân sau ở động vật [144]. Điều kiện kỹ thuật tại Việt Nam chưa cho phép nên nhóm nghiên cứu đã áp dụng hai phương pháp khác là: đánh giá khả năng vận động của chuột trên máy rê kim thông qua phản xạ chuột rút chân khỏi kim Von Frey và đánh giá khả năng vận động phối hợp của chuột bằng mâm nóng. Hai phương pháp này cũng được nhiều nhà khoa học ứng dụng trong các nghiên cứu của mình [155].

* Khả năng vận động của chuột trên máy rê kim

Hạn chế hoạt động khớp gối thể hiện qua chỉ số thời gian và lực gây đau làm chuột nhấc chân khỏi kim Von Frey (bảng 3.18 và 3.19). Sau 1 tuần tiêm MIA, các chỉ số này giảm rõ so với lô chứng sinh học do khớp gối chuột trong giai đoạn viêm nên rất nhạy cảm với lực tác động. Các chỉ số này tăng từ tuần thứ 3 và đến tuần thứ 5, thứ 6 bắt đầu tăng có ý nghĩa thống kê so với chứng, do giai đoạn này tổn thương sụn tại khớp gối chuột đã nặng nề, làm cử động của chuột trở nên khó khăn, chậm hoạt động rút chân khỏi kim Von Frey.

Kết quả này có khác biệt so với một số tác giả khác khi sử dụng máy rê kim, các chỉ số lực và thời gian phản ứng của chuột với kim Von Frey giảm trong suốt thời gian nghiên cứu, thậm chí lên đến 10 tuần sau khi tiêm MIA [155]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các chỉ số giảm trong 2 tuần đầu và tăng ở 4 tuần sau đó. Sự khác biệt có thể lý giải do các nghiên cứu trước chỉ đánh giá quá trình tiến triển triệu chứng

đau của chuột khi tiêm MIA nên sử dụng liều tiêm MIA vào khớp gối là 1 đến 2mg/khớp, thấp hơn của chúng tôi là 3mg/khớp. MIA gây tổn thương thoái hóa phụ thuộc vào liều dùng, với liều 1 - 2 mg/khớp, sự phá hủy sụn khớp là rất ít, thậm chí tổn thương sụn không đầy đủ các đặc điểm của một khớp thoái hóa điển hình [135],[137],[138],[139].

* Khả năng vận động của chuột trên máy Hot plate (mâm nóng)

Phương pháp Hot plate (mâm nóng) là một phương pháp kinh điển đánh giá tác dụng giảm đau gây ra bởi nhiệt độ, lần đầu được mô tả bởi Woolfe và Mac Donald năm 1944, sau đó được các nhà khoa học ứng dụng linh hoạt để phù hợp với mục đích nghiên cứu [150]. Trong mô hình kinh điển, tác nhân nhiệt độ gây cảm giác đau cho bàn chân chuột, thông số đánh giá là động tác liếm chân sau, co chân hay nhảy khỏi mâm nóng bám vào thành ống trụ của máy Hot plate. Một số tác giả cũng đã sử dụng mô hình này để đánh giá đau trong thoái hóa khớp, tuy nhiên mới chỉ dừng lại ở mức đánh giá phản ứng với đau do nhiệt của bàn chân chuột bên khớp thoái hóa, chưa lượng giá được cảm giác đau và sự vận động của khớp gối bị thoái hóa [155].

Trong quá trình thực hiện nghiên cứu, chúng tôi đã phát hiện được một số hành vi liên quan đến đau và cử động linh hoạt khớp gối của chuột khi thử nghiệm phương pháp Hot plate. Chuột chưa tiêm MIA sau thời gian huấn luyện sẽ hình thành phản ứng với đau do nhiệt rất nhanh, khi thả chuột lên mâm nóng được ổn nhiệt ở mức 55-56 độ C, chuột tới ngưỡng đau sẽ nhảy bật khỏi mâm nóng và bám vào thành ống trụ để thoát ra ngoài, độ cao này khác nhau ở mỗi chuột. Ngược lại, sau khi tiêm MIA, khớp gối chuột bị đau và hạn chế vận động, dẫn đến kéo dài thời gian nhảy thoát khỏi mâm nóng, đồng thời giảm độ cao khi nhảy và xuất hiện nhảy đà, là động tác nhảy khỏi mâm nóng không thành công, không bám được vào thành ống khiến chuột rơi xuống mâm nóng và phải nhảy lại lần nữa. Như vậy, thay vì lượng giá phản ứng với đau do nhiệt ở bàn chân chuột qua động tác liếm chân hoặc co chân sau hoặc chỉ cần nhảy lên khỏi mâm nóng, chúng tôi sử dụng nhiệt độ mâm nóng làm tác nhân kích thích chuột phải nhảy, từ đó lựa chọn ba thông số khác để đánh giá đau và cử động

linh hoạt khớp gối gồm có: (1) độ cao chuột đạt được trong lần nhảy thành công (bám vào mép trên thành ống), (2) thời gian từ khi được thả vào mâm nóng đến lúc nhảy thành công, (3) số lần nhảy đà. Với những kết quả thu được, bước đầu có thể khẳng định giá trị của ba chỉ số này.

Ở thời điểm sau tiêm MIA 1 tuần, thời gian nhảy thành công của chuột ở tất cả các lô đều tăng cao so với trước nghiên cứu, có thể giải thích sự kéo dài thời gian này là do phản ứng màng hoạt dịch tại khớp gối sau tiêm MIA hoặc nước muối sinh lý, điều này cũng tương xứng với đường kính khớp gối tăng mạnh nhất sau tiêm 1 tuần đã được báo cáo ở trên. Từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 6, phản ứng màng hoạt dịch mất dần nên chuột đỡ đau và nhanh nhẹn hơn. Chuột ở lô mô hình có thời gian nhảy thành công cao hơn rõ rệt so với chứng sinh học ở tất cả các thời điểm chứng tỏ tổn thương tại khớp gối là dai dẳng, không thể trở về bình thường như trước khi tiêm MIA.

Kết quả cũng phù hợp với độ cao chuột đạt được ở lần nhảy thành công, chuột tiêm MIA nhảy thấp hơn chứng sinh học và so với trước nghiên cứu, nhưng rõ nhất ở thời điểm tuần thứ 5 và thứ 6, có thể lý giải lúc này tổn thương thoái hóa khớp đã hình thành rõ nét với sự phá hủy sụn và cấu trúc quanh khớp, làm cản trở độ mở góc rộng cũng như chịu lực của khớp gối, ảnh hưởng trực tiếp đến động tác nhảy và bám của chuột.

Về số lần nhảy đà của chuột, nhận thấy số chuột phải nhảy đà và số lần nhảy đà của mỗi chuột trong từng lô có sự tương xứng với 2 chỉ số trên, ở lô mô hình, số lần nhảy đà cao hơn lô chứng sinh học, cho thấy sự hạn chế vận động rất rõ ở chuột tiêm MIA.

Động tác nhảy bật của chuột là một động tác phối hợp trong đó vai trò của khớp gối chân sau là chủ yếu, vì vậy khi khớp bị thoái hóa, chuột sẽ gặp khó khăn khi nhảy, thậm chí không thể nhảy được, và đi kèm với một số động tác bất thường khi nhảy. Trong nghiên cứu này, chúng tôi quan sát thấy ở những chuột tiêm MIA, chân bên khớp gối bị thoái hóa có hiện tượng cứng khớp khiến chân không co được trong động tác nhảy như chân bên lành, làm ảnh hưởng đến độ cao đạt được và sự thành công

của lần nhảy. Tuy nhiên, chỉ số này khó đánh giá và không có tiêu chí cụ thể nên chúng tôi chỉ mô tả đơn thuần.

Một số tác giả khi đánh giá đau trong thoái hóa khớp mới chỉ dừng lại ở thời gian chuột liếm chân sau hoặc nhảy lần đầu tiên trên mâm nóng, do vậy đánh giá chưa toàn diện được vận động khớp gối của chuột, không phản ánh được chính xác sự hạn chế trong cử động khớp khi có tổn thương [155]. Vì vậy, việc mở rộng chỉ số đánh giá trong phương pháp này là một ưu điểm cho phép đánh giá tác dụng cải thiện triệu chứng vận động khớp gối của các thuốc điều trị một cách dễ dàng hơn.

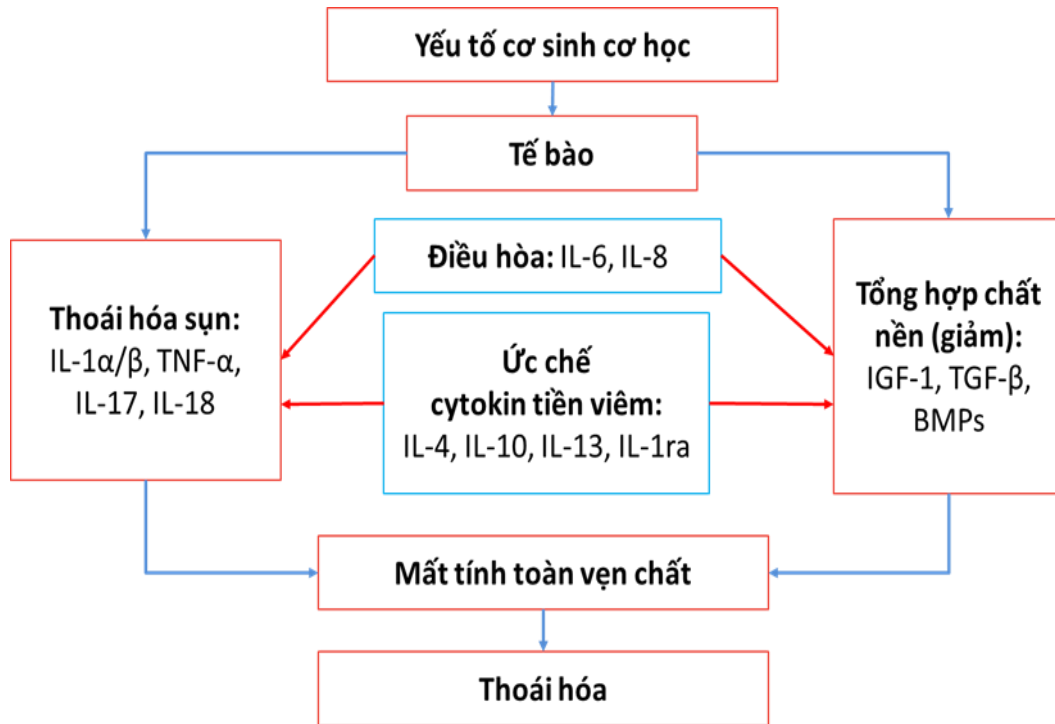
4.4.1.3. Về chỉ số cytokin

Cytokin, các proteinase (chủ yếu là MMPs), các chất trung gian lipid và các gốc oxy tự do đều kích thích tế bào sụn giải phóng các enzym phân hủy sụn. Phân tích các nguyên bào xương có nguồn gốc từ gai xương chứng minh nồng độ IL-6, IL-8 và MMP-13 được tăng lên rất nhiều ở bệnh nhân thoái hóa khớp [167]. Áp dụng một tải trọng cơ học phi vật lý lên các nguyên bào xương cũng làm tăng sự biểu hiện gen của IL-6 và IL-8, mức tăng phụ thuộc vào cường độ, càng cho thấy tầm quan trọng của các yếu tố gây viêm trong tế bào xương. Hơn nữa, IL-6 trực tiếp cảm ứng tổng hợp và tăng biểu hiện MMP-13 từ gai xương trong nguyên bào xương ở thoái hóa khớp và nguyên bào xương dưới sụn khi không bị thoái hóa khớp. Sự biểu hiện tăng của IL-8 và MMP-13 có thể thúc đẩy sự thoái hóa sụn thông qua sụn phi đại [167].

Các nghiên cứu in vitro và in vivo đã chứng minh rằng, IL-1 (chủ yếu là IL-1 β) và TNF- α là các cytokin dị hoá nổi trội tham gia vào quá trình phá huỷ sụn khớp trong bệnh thoái hóa khớp. Ngoài hiệu quả cảm ứng các tế bào sụn tăng tổng hợp các enzym proteinase khác ra, IL-1 và TNF- α còn làm tăng quá trình tổng hợp các cytokin tiền viêm khác nữa, ví dụ như cytokin IL-17 và IL-18, và các cytokin này tiếp tục tham gia vào quá trình tăng thoái hóa khớp [20],[167].

Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn 2 chỉ số đặc hiệu là IL-1 β và TNF- α để đánh giá tình trạng thoái hóa khớp trên chuột. Nhiều tác giả cũng lựa chọn các chỉ số này trong nghiên cứu [139],[168]. Kết quả biểu đồ 3.4 cho thấy ở lô mô

hình, IL-1 β và TNF- α đều tăng rõ so với chứng sinh học. Nồng độ IL-1 β và TNF- α máu ngoại vi ở lô chứng sinh học nằm trong giới hạn bình thường của chuột cống [169]. Kết quả này chứng tỏ nồng độ cytokin gắn liền với bệnh sinh thoái hóa khớp, MIA trong mô hình đã mô phỏng được bệnh cảnh lâm sàng. Từ đây cũng cho phép đánh giá cơ chế tác dụng của các thuốc điều trị thoái hóa khớp một cách rõ ràng hơn.

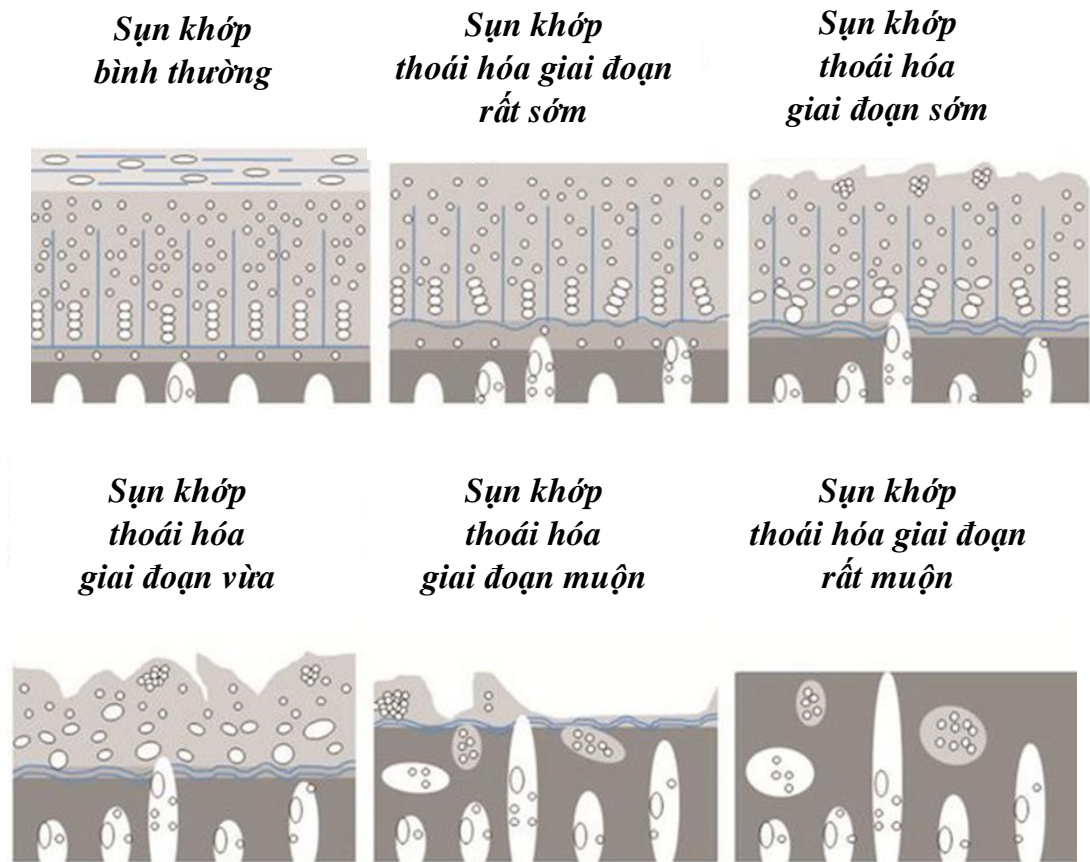


Hình 4.1. Vai trò của cytokin trong thoái hóa khớp [23]

4.4.1.4. Về tổn thương sụn khớp trên vi thể

Chẩn đoán thoái hóa khớp trên giải phẫu bệnh có từ rất sớm, vào năm 1999, với mô tả đặc trưng của O' Connell gồm [170]:

- Tế bào sụn mất nhân hoặc hoại tử, mất ranh giới giữa sụn và xương dưới sụn.
- Lớp sụn mỏng bất thường, nứt vỡ, phân mảnh.
- Nang dưới sụn chứa dịch vây quanh bởi cấu trúc xơ xương
- Sự xuất hiện của các thành phần phản ứng viêm không có ý nghĩa, dù có hiện tượng viêm màng hoạt dịch.
- Có thể giống với tình trạng viêm dưới sụn cấp tính vô khuẩn



Hình 4.2. Các giai đoạn thoái hóa khớp trên vi thể [171]

Những tiêu chuẩn này dần được cụ thể hơn và xây dựng thành những bảng điểm đánh giá tổn thương chi tiết, cho phép lượng giá được những tổn thương vốn chỉ mang đặc điểm định tính, dễ dàng so sánh bằng thuật toán thống kê. Phương pháp nhuộm tiêu bản sụn khớp có nhiều loại: sử dụng hematoxylin – eosin, safranin – O fast green, và toluidin blue. Về mặt lý thuyết, sử dụng càng nhiều phương pháp nhuộm càng cho kết quả chi tiết và chính xác hơn, phản ánh rõ ràng từng cấu trúc của mô sụn, tuy nhiên không phải tất cả các loại thuốc nhuộm và kỹ thuật nhuộm đều sẵn có ở mỗi quốc gia, trong điều kiện thực hiện luận án, nghiên cứu chỉ làm được với phương pháp nhuộm hematoxylin - eosin . Trên thế giới có rất nhiều cách đánh giá tổn thương giải phẫu bệnh, nghiên cứu này chọn cách đánh giá của hai tác giả Januzs và Al Safar vì bảng điểm rõ ràng, chi tiết và đánh giá được trên tiêu bản sụn khớp nhuộm bằng hematoxylin – eosin [156],[157].

Nhằm mục đích kiểm chứng tác dụng của MIA trong mô hình gây thoái hóa khớp gối, nhóm nghiên cứu đã tăng số lượng chuột của lô mô hình và lô chứng sinh học lên gấp đôi. Ở thời điểm sau 2 tuần tiêm MIA, chuột được gây mê, phẫu tách khớp gối và đánh giá tổn thương giải phẫu bệnh ở một nửa số chuột lô chứng và lô mô hình. Kết quả trong bảng 3.22 và 3.23 cho thấy sự thành công của mô hình gây thoái hóa khớp gối trên chuột cống bằng MIA, các tổn thương sụn hình thành rõ ràng từ sau 2 tuần và nặng hơn ở thời điểm sau 6 tuần, hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Al Safar khi tiêm MIA cùng liều 3mg/khớp trên chuột cống [157]. Đối chiếu với tổn thương theo giai đoạn của thoái hóa khớp trong Hình 4.2, ở thời điểm sau 2 tuần tiêm MIA, khớp tổn thương ở giai đoạn vừa là chủ yếu, sang thời điểm sau 6 tuần, tổn thương thoái hóa khớp đã vào giai đoạn vừa và muộn.

4.4.2. Tác dụng của viên hoàn cứng TD0015 trên chuột gây thoái hóa khớp gối bằng MIA

Viên hoàn TD0015 thể hiện tác dụng chống viêm, giảm đau rõ trên các mô hình đánh giá tác dụng chống viêm, giảm đau ở chuột bình thường. Tuy nhiên, tác dụng điều trị thật sự được khẳng định bằng hiệu quả điều trị trên động vật thực nghiệm được gây mô hình thoái hóa khớp gối mô phỏng giống với bệnh cảnh trên lâm sàng. Mô hình thoái hóa khớp gối bằng MIA tiêm nội khớp trong nghiên cứu này đã biểu hiện những đặc điểm tương xứng bệnh lý thoái hóa khớp gối trên lâm sàng, vì vậy, việc đánh giá tác dụng điều trị của viên hoàn TD0015 ở 2 mức liều 1,2 g/kg và 3,6 g/kg được thực hiện dễ dàng hơn.

Do tính chất phá hủy sụn khớp của MIA rất nhanh nên hầu hết các nghiên cứu trên thế giới đều cho động vật sử dụng thuốc thử ngay sau khi tiêm MIA, như vậy sẽ đánh giá được tác dụng của thuốc thử trên từng giai đoạn và thuốc thử thể hiện tác dụng bảo vệ sụn khớp được hiệu quả hơn [135],[136],[139],[154]

Theo hướng dẫn mới nhất của NICE và OARSI năm 2019, NSAIDs có tác dụng tại chỗ và paracetamol được sử dụng trên những bệnh nhân thoái hóa khớp có triệu chứng đau mức độ nhẹ. Ở mức độ nặng hơn, lựa chọn giảm đau ưu tiên trên nhóm bệnh

nhân không có loét dạ dày tá tràng là các NSAIDs giảm đau tại chỗ và NSAIDs không chọn lọc đường uống. Đối với nhóm bệnh nhân có loét dạ dày tá tràng, ưu tiên lựa chọn thuốc ức chế chọn lọc COX-2 rồi đến NSAIDs không chọn lọc [172],[173].

Trong nghiên cứu này, với tính chất tổn thương do MIA gây ra, chúng tôi chọn diclofenac làm thuốc chứng dương. Diclofenac là thuốc NSAIDs sẵn có, giá thành rẻ, được dùng rộng rãi trong phác đồ điều trị THK, ức chế tổng hợp các prostaglandin, từ đó giảm triệu chứng đau và viêm hiệu quả. Diclofenac cũng được sử dụng làm chứng dương trong nghiên cứu của tác giả Joon Ji Kim khi gây mô hình thoái hóa khớp gối bằng MIA liều 3mg/kg. Tuy nhiên, trong báo cáo, tác giả sử dụng diclofenac liều 5mg/kg, còn nghiên cứu của chúng tôi đã điều chỉnh liều xuống 3mg/kg để giảm bớt tác dụng không mong muốn trên dạ dày. Điều này là hợp lý vì nghiên cứu của Joon Ji Kim kéo dài 4 tuần còn nghiên cứu của chúng tôi kéo dài 6 tuần, diclofenac 3mg/kg là liều cao nhất dùng được trên chuột cống mà không gây biểu hiện bất thường trong thời gian nghiên cứu [139].

Thời gian uống thuốc kéo dài 6 tuần liên tục vì 2 lý do: (1) là thời gian điều trị trung bình của TD0015 trên thực tế lâm sàng từ 4 tuần đến 12 tuần, vì vậy 6 tuần là thời gian thích hợp để xác định hiệu quả tác dụng của thuốc; (2) là, với liều MIA 3mg/khớp thì 6 tuần là thời gian thể hiện tổn thương thoái hóa khớp rõ ràng nhất, từ đó đánh giá tác dụng điều trị của thuốc được toàn diện hơn [157].

4.4.2.1. Tác dụng giảm đau và chống viêm

Sụn khớp không có hệ thần kinh, vì vậy đau có thể do các cơ chế sau [174]:

- Viêm màng hoạt dịch.
- Do kích thích của các vết rạn nứt nhỏ ở vùng đầu xương dưới sụn.
- Mọc gai xương làm kéo căng các đầu mút thần kinh ở màng xương.
- Sự co kéo của dây chằng trong khớp.
- Viêm bao khớp hoặc bao khớp bị căng phồng do phù nề quanh khớp.

- Các cơ bị co thắt.

Sự tăng biểu hiện của IL-6 và IL-8 cũng là một yếu tố cảm ứng gây viêm hoạt dịch, liên quan đến đau trong thoái hóa khớp [167].

Xương chứa các sợi cảm nhận đau, các tổn thương tương tự như phù tủy xương dưới sụn (BMLs) đã được ghi nhận thường xuyên trong thoái hóa khớp [174],[175]. Rất nhiều thử nghiệm nghiên cứu cho thấy mối liên quan chặt chẽ giữa BMLs với tổn thương sụn và tổn thương dây chằng. Phân tích gen cho thấy BMLs gắn liền với các con đường kinh điển liên quan đến tín hiệu chemokin, integrin và cytokin. Như vậy, các cơ chế làm giảm những chất này sẽ làm giảm hình thành BMLs từ đó giảm đau trong thoái hóa khớp [176].

Kết quả biểu đồ 3.1 và 3.2 cho thấy: diclofenac 3mg/kg và TD0015 liều 3,6g/kg có tác dụng giảm đường kính khớp gối của chuột rõ rệt ở các thời điểm nghiên cứu với hiệu quả tương đương. TD0015 liều 1,2g/kg thể hiện tác dụng rõ rệt từ tuần thứ 4 sau tiêm MIA. Tương ứng với đường kính khớp, ngưỡng đau tại khớp theo phương pháp *Randall - Selitto* cũng cho thấy hiệu quả giảm đau của diclofenac và TD0015 rõ nhất vào thời điểm sau 1 và 2 tuần tiêm MIA, hiệu quả kéo dài đến 6 tuần tiêm MIA. Có được tác dụng này là nhờ cơ chế chống viêm, giảm đau của các vị dược liệu trong thành phần TD0015 đã trình bày ở phần trước.

4.4.2.2. Tác dụng cải thiện hoạt động khớp gối

* Cải thiện khả năng vận động của chuột trên máy rê kim

Ở thời điểm sau 1 và 2 tuần tiêm MIA, khi phản ứng viêm tại khớp gối đang diễn ra rất mạnh, các chỉ số thời gian và lực gây đau của lô uống diclofenac và TD0015 cả 2 liều đều có xu hướng tăng so với lô mô hình, thể hiện tác dụng giảm đau chống viêm dẫn đến giảm sự nhạy cảm quá mức của chuột với các kích thích cơ học. Sang đến tuần thứ 5 và thứ 6, khi thời gian và lực gây đau tăng cao ở lô mô hình do vận động khớp gối của chuột bị hạn chế bởi tổn thương sụn khớp thì diclofenac có tác dụng giảm rõ rệt các chỉ số này, TD0015 cả 2 liều thể hiện tác dụng rõ nhất ở tuần thứ 6, cho thấy sự hạn chế vận động khớp gối của chuột đã được giảm đáng kể.

* Cải thiện khả năng vận động của chuột trên máy Hot plate

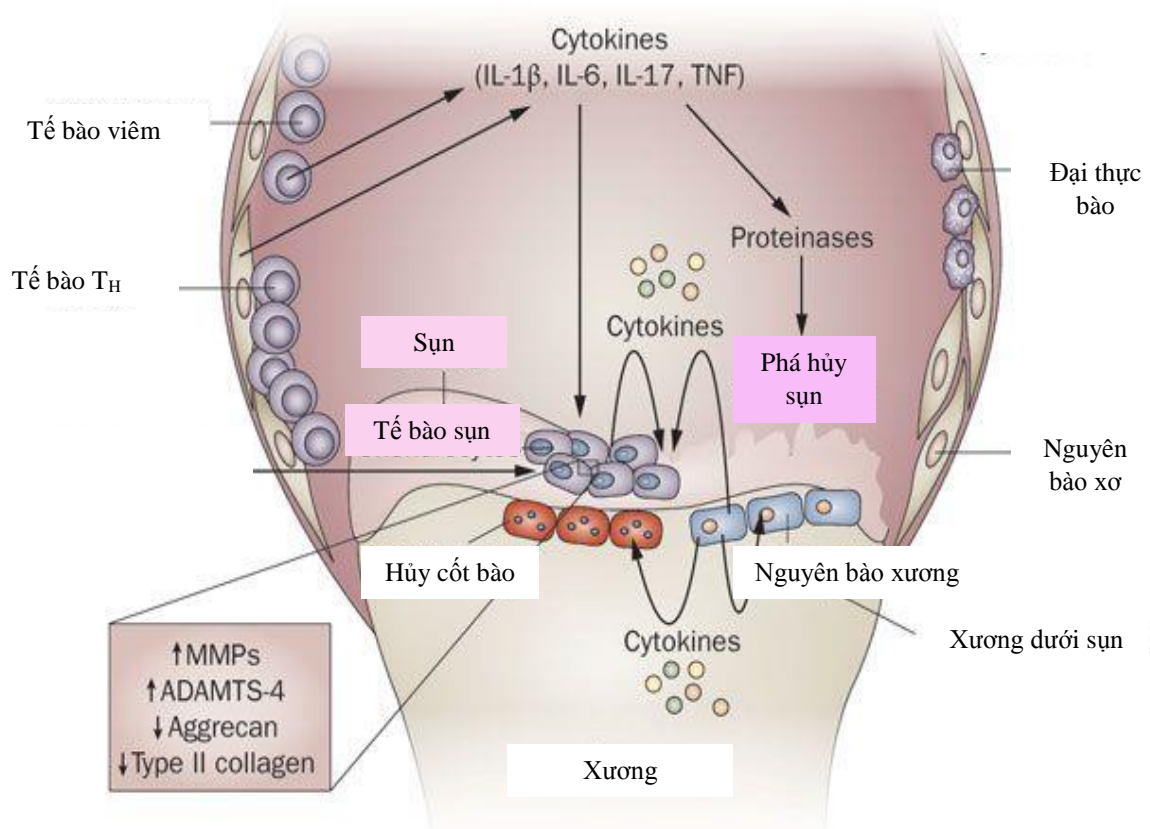
TD0015 cả 2 liều đều không có tác dụng giảm đau trên mô hình sử dụng mâm nóng, do vậy khi đánh giá cùng diclofenac trong phương pháp này sẽ có kết quả khách quan, không bị yếu tố nhiễu ảnh hưởng. Tác nhân nhiệt độ sẽ chỉ đóng vai trò là yếu tố kích thích cho chuột nhảy khỏi mâm nóng. Thuốc có tác dụng trên mô hình này chủ yếu là làm cho cử động của chuột được linh hoạt hơn, dễ nhảy khỏi mâm nóng hơn.

Diclofenac liều 3mg/kg và TD0015 ở cả 2 liều đều rút ngắn thời gian nhảy thành công của chuột so với mô hình, có thể do thuốc có tác dụng giảm đau, chống viêm tại khớp nên cử động khớp trở nên linh hoạt và dễ dàng hơn. Tác dụng của TD0015 liều 3,6g/kg và diclofenac 3mg/kg cũng thể hiện rõ sự cải thiện hoạt động khớp ở tuần thứ 5 và tuần thứ 6 qua việc tăng độ cao nhảy của chuột so với lô mô hình. TD0015 liều 1,2g/kg mới chỉ thể hiện xu hướng làm tăng độ cao nhảy của chuột, cho thấy hiệu quả tác dụng của thuốc là phụ thuộc liều dùng.

Về số lần nhảy đà của chuột, diclofenac 3mg/kg và TD0015 ở cả 2 liều (đặc biệt là liều 3,6g/kg) có số lần nhảy đà giảm hẳn so với mô hình, tuy nhiên khi so trị số p chưa có sự khác biệt rõ rệt, có thể do số lượng chuột mỗi lô còn thấp ($n = 10$) nên thống kê chưa đủ mạnh để thể hiện sự khác biệt.

4.4.2.3. Tác dụng lên chỉ số cytokin và cấu trúc sụn khớp

Như đã phân tích, các chỉ số cytokin đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh thoái hóa khớp và là yếu tố chỉ điểm cho cơ chế tác dụng của thuốc điều trị. Cytokin gắn liền với phản ứng đau, viêm và là chìa khóa dẫn đến quá trình tổn thương sụn khớp [177].



Hình 4.3. Mối liên quan giữa cytokin và tổn thương sụn khớp [177]

Kết quả nghiên cứu cho thấy, diclofenac 3mg/kg và TD0015 liều 3,6g/kg có tác dụng giảm nồng độ IL-1 β và TNF- α rõ rệt so với lô mô hình, trong khi TD0015 liều 1,2g/kg chưa thể hiện tác dụng này. Kết quả phù hợp với sự cải thiện cấu trúc sụn khớp sau 6 tuần điều trị, TD0015 liều 3,6g/kg làm giảm số điểm tổn thương sụn khớp ở cả 5 tiêu chí so với lô mô hình. TD0015 liều 1,2g/kg chỉ cải thiện được 3/5 tiêu chí cho thấy tác dụng không hiệu quả như liều 3,6g/kg. Diclofenac 3mg/kg thể hiện tác dụng cải thiện tổn thương cấu trúc sụn khớp không nhiều, chỉ đạt 2/5 tiêu chí.

Từ các kết quả này, sơ bộ có thể khẳng định TD0015 có tác dụng bảo vệ sụn khớp không chỉ thông qua việc ức chế các cytokin tiền viêm như IL-1 β và TNF- α , hay các cơ chế liên quan đến quá trình viêm như giảm hóa ứng động bạch cầu, giảm tính thấm mạch, bởi diclofenac cũng thể hiện hiệu quả này rất rõ nhưng lại không làm biến đổi sụn khớp. Dựa theo Hình 4.1 và 4.3, ảnh hưởng lên cấu trúc sụn khớp

không chỉ có các cytokin mà còn có vai trò của các chất khác gồm MMPs, ADAMTS, IGF-1, TGF- β , BMPs.... Vì điều kiện luận án không cho phép nên chúng tôi chưa thể đánh giá cơ chế liên quan đến nhóm các chất thuộc yếu tố tăng tổng hợp chất nền sụn khớp này.

Với tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối thông qua các chỉ số trên của TD0015, cơ chế tác dụng của bài thuốc được giải thích bởi tác dụng riêng lẻ của từng vị dược liệu hay tác dụng của phối hợp các vị dược liệu có trong TD0015 đã được công bố rộng rãi:

- Tác dụng chống viêm của Hoàng bá liều 200mg/kg trên chuột nhắt làm giảm các interleukin cảm ứng lipopolysaccharid như IL-6, IL-1 β , đồng thời ức chế tổng hợp nitric oxid, hoạt hóa các NF- κ B thông qua giáng hóa và phosphoryl hóa I κ B α , giảm phosphoryl hóa các protein kinase hoạt hóa ty thể [102].

- Tác dụng điều trị thoái hóa khớp của polysaccharid trong Ngưu tất trên chuột cống SD thông qua hoạt hóa con đường truyền tin Wnt/ β – catenin ở sụn, từ đó tăng sinh sụn và tăng biểu hiện collagen typ II ở sụn [112]. Tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của Ngưu tất, Đương quy cũng được báo cáo trong nghiên cứu của Liu J. [113].

- Trên mô hình gây thoái hóa khớp dùng monoiodoacetat, WIN-34B có trong Tri mẫu với liều 400mg/kg cho tác dụng giảm đau tương tự hoặc mạnh hơn celecoxib [123].

- Tác dụng chống viêm, giảm đau của Bạch thược (tinh chất JCICM-6), dịch chiết cồn Phục linh, các saponin trong Đảng sâm cũng được nhiều tác giả nghiên cứu và đều cho kết quả tốt [107],[118],[119].

- Tác dụng điều trị thoái hóa khớp của Độc hoạt và Tế Tân được Xu Y và cộng sự báo cáo năm 2014. Nghiên cứu cho thấy tác dụng ức chế phá hủy sụn khớp và phản ứng viêm hoạt dịch, ức chế sự chết theo chương trình của các tế bào sụn và sự giải phóng các IL-1 β và TNF- α , tăng biểu hiện proteoglycan, collagen [100],[122].

- Nghiên cứu trên 200 bệnh nhân thoái hóa khớp gối, DJW (Độc hoạt, Ngưu tất, Dương quy, Tang kí sinh, Địa hoàng, Xuyên khung, Quế chi, Phòng phong, Bạch thược, Đảng sâm, Cam thảo, Phục linh, Tế tân) hiệu quả tương đương diclofenac nhưng khởi phát tác dụng chậm và tác dụng phụ tương đương diclofenac [91].

- DHJST (Đương quy, Tang kí sinh, Ngưu tất, Tàn giao, Quế chi, Tế tân, Phục linh) dùng ở liều 0,923g/kg/ngày nghiên cứu trong 10 tuần trên mô hình thỏ thoái hóa khớp cho thấy thuốc có tác dụng ức chế sự chết theo chương trình của tế bào sụn liên quan đến việc điều chỉnh biểu hiện của HIF-1 (yếu tố được cảm ứng bởi tình trạng thiếu oxy) và VEGF (yếu tố phát triển nội mạch) [89].

- Phạm Thị Tâm và Lưu Thị Hiệp nghiên cứu tác dụng kháng viêm giảm đau của bài thuốc “Tam tỳ thang” trên bệnh nhân thoái hóa khớp gối cho thấy cao thuốc có tác dụng giảm đau và cải thiện được các chỉ số độ vận động khớp trong suốt 4 tuần điều trị mà không gây bất cứ một khó chịu nào cho bệnh nhân. So sánh với nhóm chứng là Voltaren có hiệu quả tương đương [93].

- Zhang Wenming và cộng sự phân tích trong 12 thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên với 982 bệnh nhân thoái hóa khớp gối cho thấy việc dùng phối hợp nước sắc “Độc hoạt ký sinh” và glucosamin hoặc meloxicam, glucosamin hoặc tiêm hyaluronat có hiệu quả trong giảm đau, cải thiện các chức năng sinh lý khớp [92].

- Hoàng Thị Thắng cũng đã nghiên cứu tác dụng của TD0015 kết hợp điện châm trên bệnh nhân có hội chứng cổ vai cánh tay do thoái hóa cột sống cổ, kết quả cho thấy thuốc có tác dụng giảm đau và cải thiện hoạt động của bệnh nhân rất rõ [124].

4.5. Những hạn chế của đề tài luận án

Bất cứ đề tài nghiên cứu nào cũng sẽ có những khó khăn và hạn chế nhất định. Trong quá trình thực hiện, đề tài luận án này gặp phải hạn chế sau đây:

- Mô hình thoái hóa khớp gối trên chuột cống lần đầu tiên được thực hiện tại Việt Nam, mang tính mới và giá trị khoa học cao. Do là mô hình mới nên chưa có nghiên cứu nào tương tự được thực hiện trong nước để có thể so sánh kết quả.

- Thuốc nghiên cứu trong đề tài luận án là bài thuốc xây dựng theo kinh nghiệm, gia giảm từ bài thuốc cổ phương, gồm 21 vị dược liệu phối hợp. Khi thuốc nghiên cứu gồm quá nhiều vị kết hợp sẽ gây khó khăn trong việc định hướng cơ chế tác dụng và xác định hiệu quả điều trị, sự an toàn khi sử dụng.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu về độc tính và tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của viên hoàn TD0015, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Độc tính

- **Độc tính cấp:** Chưa xác định được độc tính cấp khi cho chuột nhắt trắng uống đến liều 37,5g/kg/ngày, là liều gấp 15,625 lần liều dùng dự kiến trên lâm sàng.

- **Độc tính bán trường diễn:** TD0015 liều 1,2 g được liệu/kg/ngày và 3,6 g được liệu/kg/ngày uống trong 90 ngày liên tục không làm ảnh hưởng đến tình trạng chung, các chỉ số đánh giá chức năng tạo máu, chức năng gan, mức độ hủy hoại tế bào gan và chức năng lọc của thận, không ảnh hưởng đến hình ảnh giải phẫu bệnh gan và thận. Chỉ số cân nặng và cholesterol toàn phần có giảm nhưng không gây bất thường trên chuột.

2. Tác dụng chống viêm và giảm đau

Tác dụng chống viêm cấp

- TD0015 liều 1,2g/kg chưa thể hiện rõ tác dụng chống viêm cấp ở chuột cống trắng trên mô hình gây phù chân chuột, chỉ có tác dụng ở thời điểm sau 24 giờ gây viêm, và có tác dụng chống viêm cấp khi nghiên cứu trên mô hình gây viêm màng bụng chuột.

- TD0015 liều 3,6g/kg có tác dụng chống viêm cấp rõ rệt ở chuột cống trắng trên mô hình gây phù chân chuột, thể hiện ở tất cả thời điểm và có tác dụng chống viêm cấp khi nghiên cứu trên mô hình gây viêm màng bụng chuột.

Tác dụng chống viêm mạn

TD0015 liều 2,4g/kg/ngày và liều 7,2g/kg/ngày có tác dụng chống viêm mạn tính trên mô hình gây viêm mạn ở chuột nhắt trắng thông qua giảm trọng lượng u hạt, giảm số lượng tế bào viêm ở vùng vỏ khối u hạt. Tác dụng này tương đương methylprednisolon liều 10mg/kg/ngày.

Về tác dụng giảm đau

TD0015 liều dùng 2,4g/kg/ngày và liều 7,2g/kg/ngày có tác dụng giảm đau trên

mô hình gây đau bằng acid acetic và trên máy đo ngưỡng đau ở chuột nhắt trắng, không có tác dụng giảm đau khi nghiên cứu trên mô hình mâm nóng.

3. Tác dụng điều trị thoái hóa khớp

- TD0015 liều 1,2g/kg có tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối trên chuột cống thể hiện qua:

+ Làm giảm đường kính khớp gối, giảm đau và cải thiện hoạt động khớp gối trên mô hình sử dụng máy đo ngưỡng đau theo phương pháp *Randall Selitto*, máy rê kim và máy Hot plate.

+ Cải thiện cấu trúc sụn khớp gối

- TD0015 liều 3,6g/kg có tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối trên chuột cống thể hiện qua:

+ Làm giảm đường kính khớp gối, giảm đau và cải thiện hoạt động khớp gối trên mô hình sử dụng máy đo ngưỡng đau theo phương pháp *Randall Selitto*, máy rê kim và máy Hot plate.

+ Làm giảm các chỉ số interleukin-1 β và TNF- α là các chỉ số đặc hiệu trong thoái hóa khớp.

+ Cải thiện cấu trúc sụn khớp

+ Tác dụng của TD0015 liều 3,6g/kg mạnh hơn liều 1,2g/kg.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu về độc tính và tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của viên hoàn cứng TD0015, chúng tôi đề xuất một số kiến nghị như sau:

1. Tiến hành các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng để đánh giá về tính an toàn và hiệu quả của viên hoàn cứng TD0015 trên bệnh nhân bị thoái hóa khớp gối.
2. TD0015 liều cao gấp 3 liều tương đương lâm sàng cho kết quả tốt hơn liều tương đương lâm sàng, đồng thời chưa phát hiện độc tính khi dùng 90 ngày liên tục. Do đó có thể khuyến cáo dùng liều cao gấp 3 khi điều trị.

CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Thanh Hà, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương (2018). Tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của TD0015 trên thực nghiệm. *Tạp chí Nghiên cứu Y học* 113(4), tr1-9
2. Nguyễn Thị Thanh Hà, Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Hương Liên (2018). Tác dụng cải thiện hoạt động khớp gối của TD0015 bằng phương pháp Hot Plate ở chuột cống thoái hóa khớp gối. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 472(1), tr139-143

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Warren Kaplan, Veronika J. Wirtz, Aukje Mantel-Teeuwiesse et al (2013). Priority diseases and reasons for inclusion. *Priority medicines for Europe and the World 2013 update*, WHO Library Cataloguing in Publication, 126-128.
2. Trần Ngọc Ân và Nguyễn Thị Ngọc Lan (2004). Thoái hóa khớp [hư khớp] và thoái hóa cột sống. *Bệnh học nội khoa tập I (dùng cho đối tượng sau đại học)*, Nhà xuất bản Y học, 422-435.
3. Li Meihan, Xiao Rong, Li Jing et al. (2017). Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(10), 1577-1587.
4. Da Costa BR, Hari R, Jüni P (2016). Intra-articular Corticosteroids for Osteoarthritis of the Knee. *JAMA*, 316(24), 2671-2672
5. He WW, Kuang MJ, Zhao J et al (2017). Efficacy and safety of intraarticular hyaluronic acid and corticosteroid for knee osteoarthritis: A meta-analysis. *Int J Surg*, 39, 95-103
6. Jones IA, Togashi R, Wilson ML et al (2019). Intra-articular treatment options for knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 15(2), 77-90.
7. Trần Thúy, Phạm Duy Nhac, Hoàng Bảo Châu (2005). *Bài giảng Y học cổ truyền tập II*, Nhà xuất bản Y học, 164
8. Reginster Jean-Yves (2018). Chapter 1: Introduction: historical and current perspective on osteoarthritis. *Atlas of osteoarthritis, 3rd edition*, Springer Healthcare Ltd, 11-17
9. Gardner DL. (1994). Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat*, 184, 465-476
10. Zhang Y, Jordan J. (2010). Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*, 26, 355-369
11. Arden N, Nevitt M. (2006). Osteoarthritis: Epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20, 3-25

12. Oliveria S, Felson D, Reed J, Cirillo P, Walker A. (1995). Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum*, 38, 1134-1141
13. Cyrus Cooper, Kassim Javaid, Nigel Arden (2018). Chapter 2: Epidemiology of osteoarthritis. *Atlas of osteoarthritis, 3rd edition*. Springer Healthcare Ltd, 18-30
14. Zhang Y, Jordan J. (2010). Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*, 26, 355-369.
15. Nevitt M, Xu L, Zhang Y, et al. (2002). Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum*, 46, 1773-1779
16. Zhang Y, Xu L, Nevitt M, et al. (2003). Lower prevalence of hand osteoarthritis among Chinese subjects in Beijing compared with white subjects in the United States: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum*, 48, 1034-1040
17. Jayashree A.G., Sally R.F., Paul E.D. (2004). Estrogen and Osteoarthritis. *American journal of orthopedics*, 33(2), 71-80
18. Marks R. (2018). Vitamin D and Osteoarthritis: What is the Consensus? *International Journal of Orthopaedics*, 5(1), 849-862
19. Bayliss E, Ellis J, Steiner J. (2007). Barriers to self-management and quality-of-life outcomes in seniors with multimorbidities. *Ann Fam Med*, 5, 395-402
20. Francois Rannou (2018). Chapter 3: Pathophysiology of osteoarthritis. *Atlas of osteoarthritis, 3rd edition*. Springer Healthcare Ltd, 34-49
21. Berenbaum F. (2008). Osteoarthritis. B. Pathology and pathogenesis. In: *Klippel JH, Stone JH, Crofford LJ, White PH, eds. Primer on the Rheumatic Diseases*. New York, NY: Springer Science+Business Media, LLC, 229-234
22. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*, 64, 1697-1707
23. Goldring MB, Goldring SR. (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol.*, 213, 626-634

24. Horton WE Jr, Bennion P, Yang L. (2006). Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 6, 379-381
25. Sellam J, Berenbaum F. (2012). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 6, 625-635
26. Scanzello CR, Goldring SR. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*, 51, 249-257
27. Hasegawa A, Otsuki S, Pauli C, et al. (2012). Anterior cruciate ligament changes in the human knee joint in aging and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 64, 696-704
28. Leong DJ, Sun HB. (2011). Events in articular chondrocytes with aging. *Curr Osteoporos Rep*, 9, 196-201
29. Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, et al. (2011). Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res*, 29, 1114-1120
30. Hwang HS, Kim HA (2015). Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.*, 16(11), 26035-54
31. Mobasheri A. (2012). Osteoarthritis 2012 year in review: biomarkers. *Osteoarthritis Cartilage*, 20, 1451-1464
32. Henrotin Y, Gharbi M, Mazzucchelli G, et al. (2012). Fibulin 3 peptides Fib3-1 and Fib3-2 are potential biomarkers of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 64, 2260-2267
33. Wang Y, Li D, Xu N, et al. (2011). Follistatin-like protein 1: a serum biochemical marker reflecting the severity of joint damage in patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.*, 13, R193
34. J.Hawkeswood, R.Reebye (2010). Evidence-based guidelines for the nonpharmacological treatment of osteoarthritis of the hip and knee. *BC Medical Journal*, 52 (8), 399-403
35. Sudano I, Flammer A.J, Périat D. et al (2010). Acetaminophen increases blood pressure in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2, 122 (18), 1789-

36. McAlindon T, Bannuru R, Sullivan M. et al (2014). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, 363-388
37. Nguyễn Thị Ngọc Lan (2015). Thoái hóa khớp. *Bệnh học cơ xương khớp nội khoa*, NXB Giáo dục, 138-151
38. Richmond John, Hunter David, Irrgang Jay et al (2009). Treatment of Osteoarthritis of the Knee (Nonarthroplasty). *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 17, 591-600.
39. David Hunter (2018). Chapter 6: Treatment of osteoarthritis. *Atlas of osteoarthritis, 3rd edition*. Springer Healthcare Ltd, 80-99
40. Zhang W, Moskowitz R, Nuki G. et al (2008). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, 137-162
41. Jordan KM, Arden NK, Doherty M et al (2003). EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.*, 62(12), 1145-55.
42. Olivier Bruyère, Cyrus Cooper, Jean-Yves Reginster (2018). Chapter 7: SYSADOAs. *Atlas of osteoarthritis, 3rd edition*. Springer Healthcare Ltd, 100-110
43. Daniel O, Domenic J, Crystal L. et al (2006). Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. *The New England Journal of Medicine*, 354 (8), 795-808
44. McAlindon T, Bannuru R, Sullivan M. et al (2014). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, 363-388
45. Emmanuel M, Bernard M, Jean-Pierre V. et al (2004). Symptomatic efficacy of

- avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of osteoarthritis of the knee and hip: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial with a six-month treatment period and a two-month follow up demonstrating a persistent effect. *Arthritis & Rheumatism*, 41 (1), 81–91
46. Marc C, Roy D, Karine T.P. et al (2012). American College of Rheumatology 2012 Recommendations for the Use of Nonpharmacologic and Pharmacologic Therapies in Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care & Research*, 64 (4), 465–474.
 47. American Academy of Orthopaedic Surgeons Board of Directors (2013). Treatment of osteoarthritis of the knee, 262-341.
 48. Jordan K, Arden N, Doherty M. et al (2003). Extended report: EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*, 62, 1145–1155.
 49. Arrich J, Piribauer F, Mad P. et al (2005). Intraarticular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee: systematic review and meta- analysis. *CMAJ*, 172, 1039-1043.
 50. Olivier Bruyère, Cyrus Cooper, Jean-Pierre elletier et al (2016). A consensus statement on the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(4), S3-S11.
 51. Parks WC, Wilson CL, Lo´pez-Boado YS. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 4, 617-29
 52. Wei S, Chen Y, Chung L, et al. (2003). Protein engineering of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) inhibitory domain. In search of selective matrix metalloproteinase inhibitors. *J Biol Chem*, 278, 9831-4
 53. Baragi VM, Becher G, Bendele AM, et al. (2009). A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of

- osteoarthritis:evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum*, 60, 2008-18
54. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al. (2005). ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*, 434, 648-52
 55. Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, et al. (2000). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum*, 43, 1290-9
 56. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, et al. (2005). Role of interleukin-1 and tumour necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 52, 128-35
 57. Ku G, Faust T, Lauffer LL, et al. (1996). Interleukin-1 beta converting enzyme inhibition blocks progression of type II collagen-- induced arthritis in mice. *Cytokine*, 8, 377-86
 58. Alten R, Gram H, Joosten LA, et al. (2008). The human anti-IL-1 beta monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 10, R67
 59. Cohen SB, Proudman S, Kivitz AJ, et al. (2011). A randomized, double-blind study of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL 1R1) in patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Res Ther*, 13, R125
 60. Chevalier X, Conrozier T, Richette P. (2011). Desperately looking for the right target in osteoarthritis: the anti-IL-1 strategy. *Arthritis Res Ther*, 13, 124
 61. Verbruggen G, Wittoek R, Vander Cruyssen B, et al (2009). Preliminary results of a phase II placebo controlled trial with adalimumab in erosive hand osteoarthritis: predictors of erosive evolution and the potential effect of adalimumab in specific subgroups. *Arthritis Rheum*, 60(10), 856
 62. Guler-Yuksel M, Allaart CF, Watt I, et al. (2010). Treatment with TNF-alpha inhibitor infliximab might reduce hand osteoarthritis in patients with rheumatoid

- arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 18, 1256-62
63. Neogi T, Nevitt MC, Ensrud KE, et al. (2008). The effect of alendronate on progression of spinal osteophytes and disc-space narrowing. *Ann Rheum Dis*, 67, 1427-30
 64. Peter SE Davies, Simon M Graham, Robert J MacFarlane et al (2013). Disease-modifying osteoarthritis drugs:in vitro andin vivo data on the development of DMOADs under investigation. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 22(4), 423-441
 65. Karsdal MA, Sondergaard BC, Arnold M, et al. (2007). Calcitonin affects both bone and cartilage: a dual action treatment for osteoarthritis? *Ann NY Acad Sci*, 1117, 181-95
 66. Manicourt DH, Azria M, Mindeholm L, et al. (2006). Oral salmon calcitonin reduces Lequesne's algofunctional index scores and decreases urinary and serum levels of biomarkers of joint metabolism in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 54, 3205-11
 67. Karsdal MA, Alexandersen P, John MR, et al. (2011). 64 Oral calcitonin demonstrated symptom-modifying efficacy and increased cartilage volume: results from A 2-year phase 3 trial in patients with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(1), S35
 68. Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ et al (2002). A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*, 347, 81-88.
 69. Siparsky P, Ryzewicz M, Peterson B et al (2007). Arthroscopic treatment of osteoarthritis of the knee: are there any evidence-based indications? *Clin Orthop Relat Res*, 455, 107-112
 70. A Pendleton, N. Arden, M. Dougados et al (2000). EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*, 59, 936-944
 71. McNickle A.G, L'Heureux D.R, Yanke A.B. et al (2009). Outcomes of autologous chondrocyte implantation in a diverse patient population. *Am J*

- Sports Med*, 37 (7), 1344-1350.
72. Knop E, Paula LE, Fuller R (2016). Platelet-rich plasma for osteoarthritis treatment. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*, 56(2), 152-64.
 73. Gato-Calvo L, Magalhaes J, Ruiz-Romero C et al (2019). Platelet-rich plasma in osteoarthritis treatment: review of current evidence. *Ther Adv Chronic Dis.*, 2019 Feb 19;10:2040622319825567. doi: 10.1177/2040622319825567. eCollection 2019.
 74. Bui Hong Thien Khanh, Triet Dinh Duong, Nhan Thanh Nguyen et al (2014). Symptomatic knee osteoarthritis treatment using autologous adipose derived stem cells and platelet-rich plasma: a clinical study. *Biomedical Research and Therapy*, 1 (1), 2-8
 75. Bùi Hải Bình (2016). *Nghiên cứu điều trị bệnh thoái hóa khớp gối nguyên phát bằng liệu pháp huyết tương giàu tiểu cầu tự thân*. Luận án tiến sỹ Y học, Trường đại học Y Hà Nội.
 76. Freitag J, Bates D, Wickham J et al (2019). Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Regen Med*, 14(3), 213-230.
 77. Niada S, Giannasi C, Gomarasca M et al (2019). Adipose-derived stromal cell secretome reduces TNF α -induced hypertrophy and catabolic markers in primary human articular chondrocytes. *Stem Cell Res*, 38, 101463. doi: 10.1016/j.scr.2019.101463.
 78. Phạm Hoài Thu (2017). *Nghiên cứu kết quả điều trị bệnh thoái hóa khớp gối nguyên phát bằng liệu pháp tế bào gốc mô mỡ tự thân*. Luận án tiến sỹ, Trường Đại học Y Hà Nội
 79. Goldring MB, Berenbaum F (2015). Emerging targets in osteoarthritis therapy. *Curr Opin Pharmacol.*, 22, 51-63
 80. Sandell LJ. (2012). Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. *Nat. Rev. Rheumatol*, 8(2), 77–89
 81. Ge X, Ritter SY, Tsang K et al. (2016). Sex-specific protection of osteoarthritis

- by deleting cartilage acid protein 1. *PLoS One*, 11(7), e0159157
82. Tamer A Gheita (2017). Targeted gene therapy in the management of osteoarthritis: back to the future with great expectations. *Int. J. Clin. Rheumatol*, 12(4), 105-107
 83. Cho H, Walker A, Williams J, et al. (2015). Study of osteoarthritis treatment with anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase-2 inhibitor and steroids. *Biomed Res. Int*, 595273, doi: 10.1155/2015/595273
 84. Wang G, Evans CH, Benson JM et al. (2016). Safety and biodistribution assessment of sc-rAAV2.5IL-1Ra administered via intra-articular injection in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 3, 15052.
 85. Asahara H. (2016). Current status and strategy of microRNA research for cartilage development and osteoarthritis pathogenesis. *J. Bone Metab*, 23(3), 121–127
 86. Khoa Y học cổ truyền Trường Đại học Y Hà Nội (2012), *Bệnh học nội khoa Y học cổ truyền*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 149 - 151, 152 – 155
 87. Hoàng Bảo Châu (2006), *Nội khoa học cổ truyền*, Nhà xuất bản Y học, 528
 88. L. Long, K. Soeken, E. Ernst (2001). Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systemic review. *Rheumatology*, 40, 779-793
 89. C. W. Chen , J. Sun, Y. M. Li et al (2011). Action Mechanisms of Du-Huo-Ji-Sheng-Tang on Cartilage Degradation in a Rabbit Model of Osteoarthritis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(2011), 571479
 90. Chen Y , Li J, Li Q et al (2016). Du-Huo-Ji-Sheng-Tang Attenuates Inflammation of TNF-Tg Mice Related to Promoting Lymphatic Drainage Function. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 12.
 91. Supanimit Teekachunhatean, Puongtip Kunanusorn, Noppamas Rojanasthien et al (2004). Chinese herbal recipe versus diclofenac in symptomatic treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial [ISRCTN70292892].

BMC Complementary and Alternative Medicine, 4(1), 19.

92. Zhang W , Wang S, Zhang R, et al (2016). Evidence of Chinese herbal medicine Duhuo Jisheng decoction for knee osteoarthritis: a systematic review of randomised clinical trials. *BMJ Open*, 6(1), e008973, doi: 10.1136/bmjopen-2015-008973.
93. Lưu Thị Hiệp , Phạm Thị Minh Tâm (2005). Khảo sát tác dụng giảm đau kháng viêm của bài thuốc "Tam tỳ thang" trên bệnh nhân thoái hóa khớp gối. *Tạp chí y học Tp. Hồ Chí Minh.*, 9(1), 255 – 264
94. Đào Thị Thanh Hiền, Nguyễn Quốc Thịnh (2016). Đánh giá một số tác dụng sinh học của cao đặc bài thuốc chữa thấp khớp Phong Đan. *Tạp chí Dược liệu*, 21(4), 266-270
95. Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Thanh Hà, Mai Phương Thanh, Phùng Minh Dũng (2017). Tác dụng chống viêm, giảm đau của viên nang cứng Phong Đan trên động vật thực nghiệm. *Tạp chí Nghiên cứu Y dược học cổ truyền Việt Nam*, 53, 68-76
96. Đỗ Tất Lợi (2015). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr. 48, 55, 65, 112, 197, 222, 309, 384, 507, 566, 654, 666, 721, 768, 811, 837, 857, 863, 1000.
97. Nguyễn Nhược Kim (2009). *Phương tế học*, Nhà xuất bản Y học, tr.66.
98. Kim Hyun-Woo, Kwon Young-Bae, Ham Tae-Won et al. (2003). The Antinociceptive and Anti-inflammatory Effect of Ethylacetate Extracts from Bang-Poong (*Radix ledebouriellae*) on the Freund's Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *Journal of veterinary science*, 3, 343-9.
99. Wu Liu-Qing et al. (2016). Antinociceptive Effects of Prim-O-Glucosylcimifugin in Inflammatory Nociception via Reducing Spinal COX-2. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(4), 418-25.
100. Xu Y, Dai GJ, Liu Q et al (2014). Effect of Ermiao Recipe with medicinal guide *Angelicae Pubescentis Radix* on promoting the homing of bone marrow stem

- cells to treat cartilage damage in osteoarthritis rats. *Chin J Intergr Med*, 20(8), 600-9
101. Li, X., Wang, J., & Gao, L. (2013). Anti-inflammatory and analgesic activity of R.A.P. (Radix Angelicae Pubescentis) ethanol extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*, 10 (3), 422-6.
 102. Choi YY., Kim MH., Han JM at al (2014). The anti-inflammatory potential of Cortex Phellodendron in vivo and in vitro: down-regulation of NO and iNOS through suppression of NF- κ B and MAPK activation. *The Immunopharmacol.*, 19(2), 214-20
 103. Cuellar M.J, Giner R.M and Recio M.C et al (2001). Topical antiinflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. *Fitoterapia*, 72, 221-229.
 104. Sun, Yue, Lenon, et al (2019). Phellodendri Cortex A Phytochemical, Pharmacological, and Pharmacokinetic Review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. 45. 10.1155/2019/7621929.
 105. Dai X, Ding M, Zhang W, et al. (2019). Anti-Inflammatory Effects of Different Elution Fractions of Er-Miao-San on Acute Inflammation Induced by Carrageenan in Rat Paw Tissue. *Med Sci Monit.*, 25, 7958–7965.
 106. Eum HA, Lee WY, Kim SH et al (2005). Anti-inflammatory activity of CML-1: an herbal formulation. *Am J Chin Med.*, 33(1), 29-40
 107. Wong YF, Zhou H, Wang JR et al (2008). Anti-inflammatory and analgesic effects and molecular mechanisms of JCICM-6, a purified extract derived from an anti-arthritic Chinese herbal formula. *Phytomedicine.*, 15(6-7), 416-26
 108. Wang QS , Gao T, Cui YL, Gao LN, et al (2014). Comparative studies of paeoniflorin and albiflorin from *Paeonia lactiflora* on anti-inflammatory activities. *Pharmaceutical Biology*, 52(9), 1189-1195.

109. He DY , Dai SM. (2011). Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Paeonia Lactiflora Pall., a Traditional Chinese Herbal Medicine. *Frontiers in pharmacology*, 2(10), doi: 10.3389/fphar.2011.00010
110. Chen , J. Y, Wu, H. X, Chen, Y. et al (2012). Paeoniflorin inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2. *Planta Med.*, 78(7), 665-71.
111. Lee, Bomi, Shin, et al. (2008). Antiallergic effect of the root of Paeonia lactiflora and its constituents paeoniflorin and paeonol. *Archives of pharmacal research*, 31, 445-50.
112. Weng X, Lin P, Liu F et al (2014). Achyranthes bidentata polysaccharides active the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote chondrocyte proliferation. *Int J Mol Med.*, 34(4), 1045-50
113. Liu J, Pan J, Wang Y et al (2013). Component analysis of Chinese medicine and advances in fuming-washing therapy for knee osteoarthritis via unsupervised data mining methods. *J Tradit Chin Med.*, 33(5), 686-91
114. M. Jegadeesan , T. Vetrichelvan (2002). Effect of alcoholic extract of achyranthes bidentata blume on acute and sub acute inflammation. *Indian Journal of Pharmacology*, 34, 115-118.
115. Xiaokun Jiang (2014). Extraction and analgesic effects of polysaccharides from Achyranthes bidentata Blume. *Applied Mechanics and Materials*, 675-677, 1600-1603.
116. Jia, Na, Li, Yuwen et al. (2012). Comparison of the anti-inflammatory and analgesic effects of Gentiana macrophylla Pall. and Gentiana straminea Maxim.; And identification of their active constituents. *Journal of ethnopharmacology.*, 144, 10.1016/j.jep.2012.10.004.
117. Shikha P, Latha P and Suja S.R et al (2010). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of Justicia gendarussa Burm. f. leaves. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1 (4), 456-461.

118. Jeong JW, Lee HH, Han MH et al (2014). Ethanol extract of *Poria cocos* reduces the production of inflammatory mediators by suppressing the NF-kappaB signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *BMC Complement Altern Med.*, 14, 101
119. Xu LP, Wang H, Yuan Z (2008). Triterpenoid saponins with anti-inflammatory activity from *Codonopsis lanceolata*. *Planta Med.*, 74(111), 1412-5
120. Jian Li, Yongli Hua, Peng Ji, et al (2016). Effects of volatile oils of *Angelica sinensis* on an acute inflammation rat model. *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1881-1890.
121. Chen YF , Tsai HY, Wu TS. (1995). Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*, 61(1), 2-8
122. Xu Y, Dai G, Liu Q et al (2014). Effect of ermiao fang with xixin (herba asari mandshurici) on bone marrow stem cell directional homing to a focal zone in an osteoarthritis rat model. *J Tradit Chin Med*, 34(4), 477-87
123. Kang M, Jung I, Hur J et al (2010). The analgesic and anti-inflammatory effect of WIN-34B, a new herbal formula for osteoarthritis composed of *Lonicera japonica* Thunb and *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE in vivo. *J Ethnopharmacol.*, 131(12), 485-96
124. Hoàng Thị Thắng (2017). *Đánh giá tác dụng của viên hoàn TD0015 kết hợp điện châm trong điều trị hội chứng CVCT do thoái hóa cột sống cổ*, Luận văn bác sỹ chuyên khoa 2, Trường Đại học Y Hà Nội
125. Bendele AM (2001). Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, 1(4), 363–76.
126. Moody HR, Heard BJ, Frank CB et al (2012). Investigating the potential value of individual parameters of histological grading systems in a sheep model of cartilage damage: the modified Mankin method. *J Anat*, 221(1), 47–54.
127. Pritzker KP. (1994). Animal models for osteoarthritis: Processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis*, 153(6), 406-20.

128. Christopher B., Margaret M. (2008). Animal Models of Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reviews*, 4(3), 1-7
129. Van de Loo AA, Arntz OJ, Otterness IG et al (1994). Proteoglycan loss and subsequent replenishment in articular cartilage after a mild arthritic insult by IL-1 in mice: impaired proteoglycan turnover in the recovery phase. *Agents Actions*, 41(3-4), 200-8.
130. Van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM et al (2000). Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor- β injections. *Osteoarthritis Cartilage*, 8(1), 25-33.
131. Janusz MJ, Little CB, King LE, et al (2004). Detection of aggrecanase and MMP-generated catabolic neopeptides in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 12(9), 720-8.
132. Sara Adaes, Marcelo Mendonca, Telmo N Santos et al (2014). Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 16, R10
133. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. (1998). Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*, 6, 177-186.
134. Joana F.G., Sara Adaes, Raquel M.S. et al (2012). Dose-dependent expression of neuronal injury markers during experimental osteoarthritis induced by moniodoacetate in the rat. *Molecular Pain*, 8, 50
135. Won Kyung Kim, Hwa Jin Chung, Yuna Pyee et al (2016). Effects of intra-articular SHINBARO treatment on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. *Chin Med*, 11, 17
136. Bove SE, Calcaterra SL, Brooker R et al (2003). Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 11, 821-830.

137. Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall Slet al (2005). Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*, 114,339–346.
138. Kobayashi K, Imaizumi R, Sumichika Het al (2003). Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *J Vet Med Sci*, 65,1195–1199.
139. Joon-Ki Kim, Sang-Won Park, Jung-Woo Kang et al (2012). Effects of GSCB-5, a Herbal Formulation, on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol 2012, doi: 10.1155/2012/730907
140. Erin Teeple, Gregory D., Khaled A. et al (2013). Animal models of Osteoarthritis: Challenges of Model Selection and Analysis. *The AAPS Journal*, 15(2), 438-46
141. Kraus VB, Burnett B, Coindreau J et al. (2011). Application of biomarkers in the Animal Models of Osteoarthritis development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*,19(5),515–42.
142. Seifer DR, Furman BD, Guilak Fet al (2008). Novel synovial fluid recovery method allows for quantification of a marker of arthritis in mice. *Osteoarthritis Cartilage*, 16(12),1532–8.
143. Neugebauer V, Han JS, Adwanikar Het al (2007). Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain*, 3(8), DOI: 10.1186/1744-8069-3-8
144. Boettger MK, Leuchtweis J, Schaible HG et al (2011). Video radiographic analysis of the range of motion in unilateral experimental knee joint arthritis in rats. *Arthritis Res Ther*, 13(3), R79
145. Bộ Y Tế (2015). Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. Ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 do Cục trưởng Cục Khoa học công nghệ và Đào tạo ký.
146. Đỗ Trung Đàm (2014). *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*. Nhà xuất bản Y học, 17,40,101.

147. World Health Organization (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, 28-29.
148. Ezeja MI, Omeh YS, Ezeigbo II, and Ekechukwu A (2011). Evaluation of the Analgesic Activity of the Methanolic Stem Bark Extract of *Dialium Guineense* (Wild). *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 1(1), 55-62
149. Đỗ Trung Đàm (2017). *Thuốc giảm đau chống viêm và các phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý*, Nhà xuất bản Y học, 335-526.
150. Franz Jakob Hock (2016). Chapter H: Analgesic, Anti-Inflammatory, and Anti-Pyretic Activity. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, 4th edition, Springer, 983-1116
151. Kyung Soo Kim, Hae In Rhee, Eun Kyung (2008). Anti-inflammatory effects of Radix gentianae Macrophyllae (Qinjiao), Rhizoma Coptidis (Huanglian) and Citri Unshiu Pericarpium (Wenzhou migan) in animal models. *Chinese Medicine*, 3, 10
152. Mitul Patel (2012). In vivo animal models in preclinical evaluation of anti inflammatory activity – a review, *International journal of pharmaceutical research and allied sciences*, 1, 1 - 5
153. Li RW, Myers SP, Leach DN (2003). Across – cultural study: anti inflammatory acitivity Australian and Chinese plants. *Journal Ethnopharmacol*, 85, 85-32.
154. Calado GP., Lopes AJ., Costa J. et al (2015). “Chenopodium ambrosioside L. reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis”. *Plos One*, 10(11):e0141886. doi: 10.1371/journal.pone.0141886
155. Neugebauer V, Han JS, Adwanikar Het al (2007). Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain*, 3, 8. doi: 10.1186/1744-8069-3-8
156. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK et al (2002). Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(10), 785e91.

157. F.J. Al-Saffar, S. Ganabadi, H. Yaakub et al (2009). Collagenase and Sodium Iodoacetate – Induced experimental Osteoarthritis Model in Sprague Dawley Rats. *Asian Journal of Scientific Research*, 2(4), 167-179
158. Đỗ Trung Đàm (2006). *Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm, Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 377-392
159. Z. Gardner, M. McGuffin (2013). *American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook, Second Edition*, Taylor & Francis, p5, 65, 67, 222, 353, 404, 519, 614, 645, 939
160. Nguyễn Đạt Anh, Nguyễn Thị Hương (2013). *Các xét nghiệm thường quy áp dụng trong thực hành lâm sàng*. Nhà xuất bản Y học, 46,97,435.
161. Yang, Hyun Ko, Woo Kim, et al (2004). Paeoniflorin: An antihyperlipidemic agent from *Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia*, 75, 45-9.
162. Yang L, Hou AJ, Yan ML, et al (2018). Investigation of *Radix Achyranthis Bidentatae* Phytochemistry and Pharmacology. *World J Tradit Chin Med*, 5, 50-60
163. Osama M.A., Ayman M.M., Adel A.M. (2011). Antidiabetic effects of hesperidin and naringin in type 2 diabetic rats. *Diabetologia Croatica*, 41(2), 53 – 67.
164. Satoko A., Shinichi K., Kazuharu S. (2010). Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in Streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 87 – 92.
165. Dong Wook Lim , Yun Tai Kim (2014). Anti-Osteoporotic Effects of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels Extract on Ovariectomized Rats and Its Oral Toxicity in Rats. *Nutrients*, 6(10), 4362-4372.
166. Lee Jong, Kim Young-Hyun, Kim Dan-Bi et al (2015). Acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies of *Codonopsis lanceolata* extract in Sprague–Dawley rats. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP.*, 71(3), 491-497

167. Sakao K, Takahashi KA, Arai Y, et al (2009). Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8, and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis. *J Bone Miner Metab.*, 27, 412-423
168. Yassin, Nemat, Elshenawy et al (2015). Effect of a topical copper indomethacin gel on inflammatory parameters in a rat model of osteoarthritis. *Drug design, development and therapy*, 9, 1491-8.
169. Gul, M Yasim, Alptekin et al. (2010). The levels of cytokines in rats following the use of prophylactic agents in vascular graft infection. *Bratislavské lekárske listy*, 111, 316-20.
170. O'Connell JX1, Nielsen GP, Rosenberg AE. (1999). Subchondral acute inflammation in severe arthritis: a sterile osteomyelitis? *Am J Surg Pathol.*, 23(2),192-7.
171. Karsdal Morten, Bay-Jensen, A.C. et al (2014). The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis: Opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments?. *Annals of the rheumatic diseases*, 73(2), 336-348.
172. R.R. Bannuru, M.C. Osani y, E.E. Vaysbrot et al (2019). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27, 1578e1589
173. NICE (2019). Management of Osteoarthritis. NICE pathway updated 2019, 6-8.
174. Xu L, Hayashi D, Roemer FW, et al. (2012). Magnetic resonance imaging of subchondral bone marrow lesions in association with osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum.*, 42, 105-118
175. Felson DT, Chaisson CE, Hill CL, et al. (2001). The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. *Ann Intern Med.*, 134, 541-549
176. Kuttapitiya A, Assi L, Laing K, et al. (2017) Microarray analysis of bone marrow lesions in osteoarthritis demonstrates upregulation of genes implicated

in osteochondral turnover, neurogenesis and inflammation. *Ann Rheum Dis.*,76,1764–1773.

177. Kapoor, Mohit & Martel-Pelletier, et al (2011). Role of roinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 7, 33-42.

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Đại cương về thoái hóa khớp gối.....	3
1.1.1. Khái niệm về thoái hóa khớp.....	3
1.1.2. Giải phẫu khớp gối và tổn thương thoái hóa tại khớp gối.....	3
1.1.3. Các yếu tố nguy cơ của thoái hóa khớp gối	4
1.1.4. Cơ chế bệnh sinh	8
1.1.5. Phương pháp điều trị THK	15
1.2. Mô hình thoái hóa khớp thực nghiệm.....	32
1.2.1. Mô hình sử dụng phẫu thuật gây thoái hóa khớp.....	32
1.2.2. Mô hình sử dụng hóa chất tiêm vào khớp gối.....	33
1.2.3. Lựa chọn động vật thí nghiệm.....	35
1.2.4. Một số chỉ số đánh giá.....	36
1.3. Tổng quan về viên hoàn cứng TD0015	29
1.3.1. Nguồn gốc	29
1.3.2. Cấu trúc bài thuốc.....	29
1.3.3. Tác dụng	30
1.3.4. Phân tích bài thuốc	30
1.3.5. Một số nghiên cứu về tác dụng điều trị thoái hóa khớp của một số dược liệu thành phần trong viên hoàn cứng TD0015	30
CHƯƠNG 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
2.1. Nguyên liệu nghiên cứu.....	39
2.2. Đối tượng nghiên cứu	41
2.3. Hóa chất, thuốc, máy móc và thiết bị phục vụ nghiên cứu.....	41
2.3.1. Hóa chất và thuốc	41
2.3.2. Máy móc, thiết bị phục vụ nghiên cứu.....	42
2.4. Phương pháp nghiên cứu	43

2.4.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của viên hoàn cứng TD0015 trên động vật thực nghiệm	44
2.4.2. Đánh giá tác dụng giảm đau của viên hoàn cứng TD0015	46
2.4.3. Đánh giá tác dụng chống viêm	48
2.4.4. Đánh giá tác dụng điều trị THK gối của viên hoàn cứng TD0015	50
2.5. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	56
2.6. Xử lý số liệu.....	56
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	57
3.1. Xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của viên hoàn cứng TD0015 trên động vật thực nghiệm.	57
3.1.1. Độc tính cấp của TD0015 theo đường uống trên chuột nhắt trắng	57
3.1.2. Độc tính bán trường diễn của viên hoàn cứng TD0015 theo đường uống trên chuột cống trắng.....	58
3.2. Đánh giá tác dụng giảm đau của viên hoàn cứng TD0015.....	70
3.2.1. Đánh giá tác dụng giảm đau bằng máy Hot plate	70
3.2.2. Đánh giá tác dụng giảm đau bằng máy đo ngưỡng đau Dynamic Plantar Aesthesiometer.....	71
3.2.3. Đánh giá tác dụng giảm đau của TD0015 bằng phương pháp gây quặn đau bằng acid acetic.....	72
3.3. Đánh giá tác dụng chống viêm của viên hoàn cứng TD0015.....	73
3.3.1. Đánh giá tác dụng chống viêm cấp	73
3.3.2. Đánh giá tác dụng chống viêm mạn	75
3.4. Đánh giá tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của viên hoàn cứng TD0015	79
3.4.1. Tác dụng lên đường kính khớp gối chuột cống.....	79
3.4.2. Đánh giá tác dụng giảm đau, cải thiện hoạt động khớp gối	80
3.4.3. Tác dụng của viên hoàn cứng TD0015 lên chỉ số cytokin	87
3.4.4. Tác dụng của viên hoàn cứng TD0015 lên mô bệnh học khớp gối.....	88
CHƯƠNG 4 BÀN LUẬN	99
4.1. Độc tính của viên hoàn cứng TD0015 trên động vật thực nghiệm.....	99

4.1.1. Độc tính cấp.....	100
4.1.2. Độc tính bán trường diễn.....	102
4.2. Tác dụng giảm đau của viên hoàn cứng TD0015	110
4.2.1. Tác dụng giảm đau trên mô hình Hot plate	114
4.2.2. Tác dụng giảm đau trên máy rê kim.....	117
4.2.3. Tác dụng giảm đau trên mô hình gây quặn đau bằng acid acetic.....	112
4.3. Tác dụng chống viêm của viên hoàn cứng TD0015	114
4.3.1. Tác dụng chống viêm cấp.....	114
4.3.2. Tác dụng chống viêm mạn	117
4.4. Đánh giá tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của TD0015 trên chuột cống.....	119
4.4.1. Về mô hình gây thoái hóa khớp gối trên chuột cống bằng MIA.....	119
4.4.2. Tác dụng của viên hoàn cứng TD0015 trên chuột gây thoái hóa khớp gối bằng MIA.....	129
4.5. Những hạn chế của đề tài luận án.....	135
KẾT LUẬN	137
KIẾN NGHỊ	139
CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
CÁC PHỤ LỤC	

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Tồn thương cấu trúc khớp gối	4
Hình 1.2. Yếu tố nguy cơ trong THK gối	5
Hình 1.3. Giả thuyết về liên quan giữa thoái hóa khớp và thiếu vitamin D	7
Hình 1.4. Giả thuyết về sự khởi phát và bền vững của THK	9
Hình 1.5. Tồn thương sụn trong thoái hóa khớp	10
Hình 1.6. Sự biến đổi xương dưới sụn trong thoái hóa khớp	12
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	44
Hình 3.1. Hình thái vi thể gan chuột lô chứng sau 90 ngày (HE x 400).....	67
Hình 3.2. Hình thái vi thể gan chuột sau 90 ngày uống viên hoàn cứng TD0015 liều 1,2g/kg/ngày (HE x 400).....	68
Hình 3.3. Hình thái vi thể gan chuột sau 90 ngày uống viên hoàn cứng TD0015 liều 3,6g/kg/ngày (HE x 400).....	68
Hình 3.4. Hình thái vi thể thận chuột lô chứng sau 90 ngày (HE x 400).....	69
Hình 3.5. Hình thái vi thể thận chuột sau 90 ngày uống viên hoàn cứng TD0015 liều 1,2g/kg/ngày.....	69
Hình 3.6. Hình thái vi thể gan chuột sau 90 ngày uống viên hoàn cứng TD0015 liều 3,6g/kg/ngày (HE x 400).....	70
Hình 3.7. Lô chứng sinh học (Chuột số 1).....	77
Hình 3.8. Lô chứng sinh học (Chuột số 2).....	77
Hình 3.9. Lô uống methylprednisolon (Chuột số 5)	77
Hình 3.10. Lô uống methylprednisolon (Chuột số 6)	77
Hình 3.11. Lô uống viên hoàn cứng TD0015 liều 2,4g/kg (Chuột số 10).....	78
Hình 3.12. Lô uống viên hoàn cứng TD0015 liều 2,4g/kg (Chuột số 11).....	78
Hình 3.13. Lô uống viên hoàn cứng TD0015 liều 7,2g/kg (Chuột số 8).....	78
Hình 3.14. Lô uống viên hoàn cứng TD0015 liều 7,2g/kg (Chuột số 9).....	78
Hình 3.15. Mô bệnh học khớp gối chuột lô chứng sau 2 tuần (Chuột số 1).....	90

Hình 3.16. Mô bệnh học khớp gối chuột lô chứng sau 2 tuần (Chuột số 2).....	90
Hình 3.17. Mô bệnh học khớp gối chuột lô mô hình sau 2 tuần (Chuột số 17).....	91
Hình 3.18. Mô bệnh học khớp gối chuột lô mô hình sau 2 tuần (Chuột số 22).....	91
Hình 3.19. Hình ảnh khớp gối lô mô hình sau 6 tuần tiêm MIA	93
Hình 3.20. Hình ảnh khớp gối lô chứng sau 6 tuần (Chuột số 1)	94
Hình 3.21. Hình ảnh khớp gối lô mô hình sau 6 tuần (Chuột số 13).....	94
Hình 3.22. Hình ảnh khớp gối lô mô hình sau 6 tuần (Chuột số 11).....	95
Hình 3.23. Hình ảnh khớp gối lô uống diclofenac sau 6 tuần (Chuột số 24).....	95
Hình 3.24. Hình ảnh khớp gối lô uống diclofenac sau 6 tuần (Chuột số 29).....	96
Hình 3.25. Hình ảnh khớp gối lô uống viên hoàn cứng TD0015 liều 1,2g/kg sau 6 tuần (Chuột số 47).....	96
Hình 3.26. Hình ảnh khớp gối lô uống viên hoàn cứng TD0015 liều 1,2g/kg sau 6 tuần (Chuột số 48).....	97
Hình 3.27. Hình ảnh khớp gối lô uống viên hoàn cứng TD0015 liều 3,6g/kg sau 6 tuần (Chuột số 40).....	97
Hình 3.28. Hình ảnh khớp gối lô uống viên hoàn cứng TD0015 liều 3,6g/kg sau 6 tuần (Chuột số 35).....	98
Hình 4.1. Vai trò của cytokin trong thoái hóa khớp.....	127
Hình 4.2. Các giai đoạn thoái hóa khớp trên vi thể.....	128
Hình 4.3. Mối liên quan giữa cytokin và tổn thương sụn khớp	133

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Biến đổi phân tử trong tế bào sụn khớp liên quan đến quá trình lão hóa .	13
Bảng 1.2. Gen tiêu biểu trong liệu pháp gen điều trị THK	26
Bảng 1.3. Một số dược liệu/phối hợp dược liệu có tác dụng điều trị thoái hóa khớp	28
Bảng 1.4. Một số nghiên cứu về tác dụng chống viêm, giảm đau, chống thoái hóa khớp của các dược liệu trong TD0015.....	31
Bảng 1.5. Một số phương pháp gây THK phù hợp loài động vật	34
Bảng 1.6. Ưu và nhược điểm của một số động vật trong mô hình THK	35
Bảng 2.1. Thành phần của viên hoàn cứng TD0015.....	39
Bảng 2.2. Đối tượng nghiên cứu	41
Bảng 2.3. Bảng điểm tổn thương khớp trên giải phẫu bệnh	55
Bảng 3.1. Mối tương quan giữa liều dùng viên hoàn cứng TD0015 và tỷ lệ chuột chết	57
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên thể trọng chuột	58
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên số lượng hồng cầu và hàm lượng huyết sắc tố ở chuột cống trắng	59
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu ở chuột cống trắng	60
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu ở chuột cống trắng	61
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên công thức bạch cầu ở chuột cống trắng.....	62
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên nồng độ albumin và bilirubin toàn phần trong máu chuột cống trắng.....	63

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên nồng độ cholesterol toàn phần trong máu chuột cống trắng.....	64
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên hoạt độ AST, ALT trong máu chuột cống trắng.....	65
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên nồng độ creatinin trong máu chuột cống trắng.....	66
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột nhắt trắng.....	70
Bảng 3.12. Tác dụng giảm đau của viên hoàn cứng TD0015 trên chuột nhắt trắng bằng máy đo ngưỡng đau.....	71
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 lên số cơn quặn đau của chuột nhắt trắng.....	72
Bảng 3.14. Tác dụng chống viêm cấp của TD0015 trên mô hình gây phù chân chuột....	73
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của viên hoàn cứng TD0015 đến thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu, protein trong dịch rỉ viêm của chuột.....	74
Bảng 3.16. Tác dụng của viên hoàn cứng TD0015 lên trọng lượng u hạt.....	75
Bảng 3.17. Kết quả giải phẫu bệnh u hạt trong viêm mạn.....	76
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của thuốc thử lên thời gian phản ứng với đau.....	81
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của thuốc thử lên lực gây đau.....	82
Bảng 3.20. Độ cao đạt được khi chuột nhảy khỏi mâm nóng.....	85
Bảng 3.21. Số lần nhảy đà của chuột.....	86
Bảng 3.22. Tổn thương mô bệnh học khớp gối sau 2 tuần tiêm MIA.....	89
Bảng 3.23. Tổn thương mô bệnh học khớp gối sau 6 tuần.....	92
Bảng 4.1. Giá trị LD50 của một số dược liệu, hoạt chất, nhóm hoạt chất.....	101
Bảng 4.2. Một số nghiên cứu về độc tính liều lặp lại.....	110

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Độ tăng đường kính khớp gối theo thời gian.....	79
Biểu đồ 3.2. Lực gây đau tại khớp gối theo thời gian.....	80
Biểu đồ 3.3. Thời gian chuột nhảy thành công khỏi mâm nóng	84
Biểu đồ 3.4. Nồng độ cytokin ở các lô nghiên cứu.....	87

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được thực hiện trong thời gian ba năm với sự nỗ lực của bản thân tôi và sự động viên, giúp đỡ từ gia đình, thầy cô và bè bạn. Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất, tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn chân thành tới:

PGS.TS. Nguyễn Trần Thị Giáng Hương, Nguyên Trưởng phòng Quản lý Đào tạo Đại học, Nguyên Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội, người đã dìu dắt tôi đi suốt chặng đường dài từ khi chập chững làm quen với nghiên cứu khoa học, người đã ở bên tôi trong vai trò người thầy, đồng thời là người mẹ thứ hai, cho tôi những lời khuyên, lời dạy bổ ích, những bài học đáng quý trong cuộc đời. Sự nhiệt tình, quan tâm, động viên của cô sẽ là động lực, là hành trang giúp tôi bước tiếp trên con đường hiện tại và tương lai.

PGS.TS Nguyễn Trọng Thông, Nguyên Trưởng Bộ môn Dược lý, Nguyên Phụ trách Trung tâm Dược lý lâm sàng, Đại học Y Hà Nội, và **PGS.TS Vũ Thị Ngọc Thanh**, Nguyên Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội, là những người thầy đã tận tình dạy dỗ, chỉ bảo, tạo mọi điều kiện và hết sức quan tâm đến công việc, cuộc sống của tôi ngay từ những ngày đầu về bộ môn.

PGS.TS Phạm Thị Vân Anh, Trưởng Bộ môn Dược lý, Giám đốc Trung tâm Dược lý lâm sàng, Đại học Y Hà Nội, và **TS Trần Thanh Tùng**, Phó Trưởng Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội, vừa là thầy cô, vừa như người chị, người anh đã rất tận tình giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án.

Xin cảm ơn các thầy cô giáo, các anh chị kỹ thuật viên, các anh chị em cán bộ giảng dạy, y công và các anh chị em học viên Sau Đại học của **Bộ môn Dược lý, Đại học Y Hà Nội**, đã luôn hỗ trợ, tin tưởng, ủng hộ, và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện nghiên cứu, viết luận án và trong cuộc sống, công tác hàng ngày.

Xin cảm ơn **ThS Trần Quỳnh Trang**, đồng nghiệp và cũng là người em gái đã luôn cổ vũ, động viên, tạo niềm tin và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu, hoàn thiện luận án.

Xin cảm ơn các thầy cô giáo, các anh chị em cán bộ giảng dạy và kỹ thuật viên của **Bộ môn Giải phẫu bệnh, Đại học Y Hà Nội; Bộ môn Sinh lý bệnh – Miễn dịch, Đại học Y Hà Nội; Trung tâm nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư**, đã tạo điều kiện thuận lợi và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Xin gửi lời cảm ơn trân trọng tới **Ban Giám hiệu, Phòng Quản lý Đào tạo Sau Đại học, Đại học Y Hà Nội**, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Con xin cảm ơn và bày tỏ lòng kính yêu vô bờ tới ba mẹ, ơn sinh thành, ơn nuôi dưỡng, sự vị tha, sự che chở, đã nâng đỡ con trong cuộc đời này. Trong thời gian thực hiện luận án, đã có nhiều biến cố xảy ra nhưng động lực từ tình yêu của ba mẹ đã giúp con vượt qua mọi khó khăn, để có được ngày hôm nay.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình và bạn bè đã luôn động viên, cổ vũ, khuyến khích, và tiếp thêm nghị lực để tôi vững bước trên con đường học vấn của mình.

Hà Nội, ngày 18 tháng 5 năm 2020

Tác giả

Nguyễn Thị Thanh Hà

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Thị Thanh Hà, nghiên cứu sinh khóa 35, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Dược lý và Độc chất, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Trần Thị Giáng Hương
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu

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

Hà Nội, ngày 18 tháng 5 năm 2020

Người viết cam đoan

Nguyễn Thị Thanh Hà