

ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới, có nguồn gen cây thuốc rất phong phú. Việc nghiên cứu các cây thuốc nam dùng trong chữa bệnh được Nhà nước và Bộ Y tế khuyến khích bởi đây là một hướng đi đúng đắn hướng đến mục đích tăng cường cung cấp nguồn thuốc tốt cho cộng đồng xét trên các phương diện tính hiệu quả, tính an toàn và tính sẵn có. Hoàng Kinh là một vị thuốc nam sẵn có ở các vùng đồng bằng, miền núi, trung du của Việt Nam và được sử dụng phổ biến trong dân gian trong điều trị nhiều bệnh như bệnh lý về khớp, cảm cúm, sốt, ho, hen, bong gân, viêm đại tràng... Các nghiên cứu về thực nghiệm ở nước ngoài cho thấy Hoàng Kinh có tác dụng giảm đau, kháng viêm, kháng nấm, kháng khuẩn, trị ho, long đờm, hạ sốt. Ở Việt Nam, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học, tác dụng dược lý, cũng như tác dụng lâm sàng của cây Hoàng Kinh đặc biệt là tác dụng trong điều trị bệnh lý về khớp. Với mong muốn tận dụng được một loại dược liệu có tác dụng chữa nhiều bệnh, sẵn có của Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu về cây thuốc Hoàng Kinh với các mục tiêu sau:

- 1. Nghiên cứu độc tính cấp, bán trường diễn của cao Hoàng Kinh và tác dụng chống viêm, giảm đau của viên nang cứng Hoàng Kinh trên thực nghiệm.***
- 2. Đánh giá tác dụng của viên nang cứng Hoàng Kinh kết hợp Methotrexat trong điều trị bệnh nhân viêm khớp dạng thấp thể hoạt động nhẹ và vừa.***

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

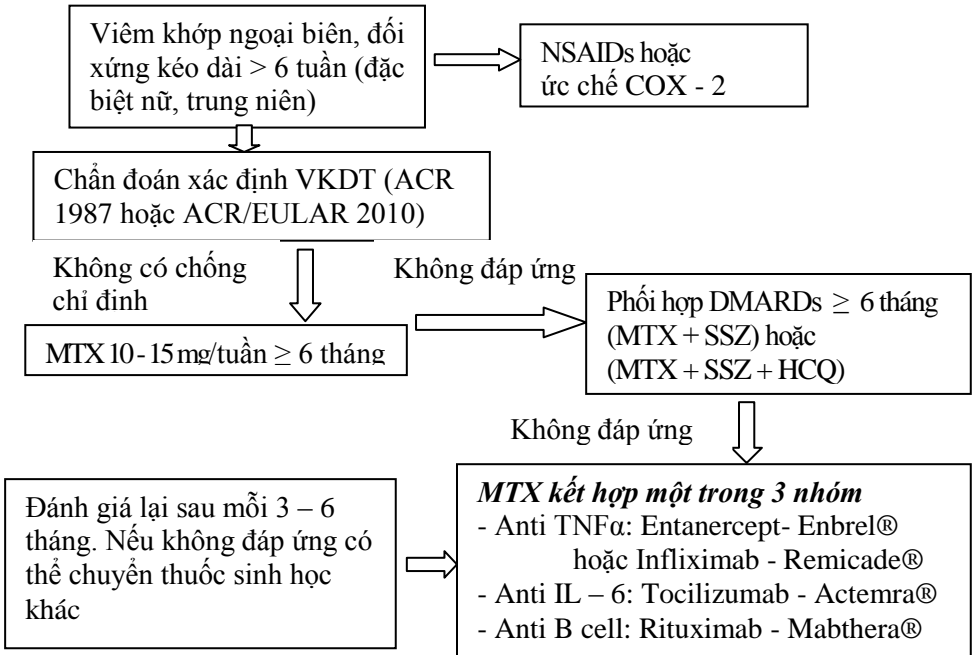
1.1. Quan niệm của Y học hiện đại về bệnh viêm khớp dạng thấp

1.1.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

Theo Y học hiện đại (YHHĐ), viêm khớp dạng thấp (VKDT) được coi là một bệnh tự miễn với sự tham gia của nhiều yếu tố như nhiễm khuẩn hoặc di truyền. Các nghiên cứu cho thấy các phản ứng miễn dịch xảy ra ở màng hoạt dịch đóng vai trò cơ bản trong bệnh VKDT, trong đó các tế bào lympho T đóng vai trò then chốt.

1.1.2. Điều trị viêm khớp dạng thấp

Tùy từng giai đoạn bệnh VKDT mà chọn phương pháp điều trị thích hợp như điều trị toàn thân, điều trị tại chỗ, điều trị phục hồi chức năng và điều trị ngoại khoa. Điều trị toàn thân VKDT cần phối hợp nhiều nhóm thuốc. Các nhóm thuốc bao gồm: thuốc giảm đau đơn thuần (thường dùng thuốc giảm đau bậc 1 hoặc bậc 2); thuốc kháng viêm không Steroid (NSAIDs); Glucocorticoid; nhóm thuốc thấp khớp tác dụng chậm (Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs - DMARDs) và nhóm thuốc tác nhân sinh học. Việc phối hợp các nhóm thuốc theo nguyên tắc sau:



Sơ đồ 1.2. Tóm tắt phác đồ điều trị Viêm khớp dạng thấp

1.2. Quan niệm của Y học cổ truyền về bệnh VKDT

1.2.1. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh

VKDT thuộc phạm vi chứng Tý của y học cổ truyền (YHCT). Nguyên nhân gây chứng Tý bao gồm ngoại nhân, nội thương và bất nội ngoại nhân.

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

1.2.2. Điều trị VKDT

Điều trị VKDT theo YHCT tùy thuộc vào thể lâm sàng mà có pháp điều trị và điều trị cụ thể. Tuy nhiên nguyên tắc chung là điều trị nguyên nhân kết hợp điều trị triệu chứng thông qua pháp điều trị hành khí hoạt

huyết, thông kinh hoạt lạc nhằm làm giảm sưng, đau khớp. Trong các y văn kinh điển, chứng Tý được chia thành 2 thể lớn là Phong hàn thấp tý và Phong thấp nhiệt tý. Gần đây, để phản ánh đầy đủ chứng trạng đa dạng của chứng Tý trên lâm sàng, một phân loại theo tài liệu Trung Y Nội khoa của Trung Quốc đã chia chứng Tý thành 10 thể. Theo đó, pháp điều trị của các thể lâm sàng cụ thể như sau: Thể Phong thấp tý với pháp điều trị khu phong, trừ thấp, thông lạc, chỉ thống. Thể Hàn thấp tý với pháp điều trị ôn kinh, tán hàn, trừ thấp, thông lạc. Thể hàn nhiệt thác tạp với pháp điều trị ôn kinh, tán hàn, thanh nhiệt, trừ thấp. Thể Thấp nhiệt tý với pháp điều trị thanh nhiệt, trừ thấp, tuyên tý, thông lạc. Thể nhiệt độc tý với pháp điều trị thanh nhiệt giải độc, lương huyết, thông lạc. Thể Huyết ú với pháp điều trị hoạt huyết, hóa ú, dưỡng cân, thông lạc. Thể Đàm trọc với pháp điều trị hóa đàm, hành khí, thông lạc, tuyên tý. Thể Đàm ú pháp điều trị hoạt huyết hành ú, hóa đàm, thông lạc. Thể Khí âm lưỡng hư với pháp điều trị ích khí dưỡng âm, hoạt huyết thông lạc. Thể Can thận lưỡng hư với pháp điều trị tư bổ can thận.

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

Các nghiên cứu điều trị VKDT bằng thuốc YHCT bao gồm nghiên cứu trên thực nghiệm và trên lâm sàng. Một số bài thuốc như Tam tý thang gia giảm, Quyên tý thang gia giảm hay các vị thuốc như Cầu tích, Thổ phục linh, Cốt toái bồ... đã được nghiên cứu trên thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng thuốc YHCT có tác dụng giảm đau, chống viêm trên thực nghiệm. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên thực nghiệm còn chưa nhiều. Bên cạnh đó, nghiên cứu về các bài thuốc, chế phẩm thuốc, vị thuốc YHCT trên lâm sàng cũng đã được triển khai. Trước đây, nghiên cứu tập trung vào sử dụng điều trị VKDT bằng các bài thuốc YHCT đơn thuần (Xúc tý thang, Độc hoạt tang ký sinh thang, Quyên tý

thang gia giảm, Ô đầu thang, Tam tý thang gia giảm...) và chế phẩm YHCT đơn thuần (Rượu ngọt thấp khớp, viên nang Phong tê thấp, viên nang Thấp khớp, viên Hy đan...). Gần đây, cùng với hiểu biết mới về cơ chế bệnh sinh bệnh VKDT, hướng nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị VKDT bằng thuốc YHCT kết hợp thuốc YHHĐ bắt đầu được quan tâm. Sự kết hợp chủ yếu là thuốc thấp khớp tác dụng chậm (Methotrexat - MTX) với một số bài thuốc YHCT như Thống tý hoạt lạc thang, Quế chi thực dược tri mẫu thang, Tứ diệu tiêu tý thang, Tam tý thang... Sự kết hợp này làm tăng hiệu quả điều trị, tăng tính khoa học và đảm bảo về y đức trong nghiên cứu. Cùng với việc nghiên cứu các bài thuốc, các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu tác dụng một vị dược liệu. Các nghiên cứu độc vị cho phép xác định được thành phần chính của thuốc có tác dụng điều trị. Nghiên cứu gần đây có thể kể đến như nghiên cứu về viên nang Regimune được chiết xuất từ rễ cây Chay. Tuy nhiên, các nghiên cứu độc vị, đặc biệt là độc vị về thuốc nam còn rất khiêm tốn.

1.4. Tổng quan về cây Hoàng Kinh

* **Tên khoa học:** Hoàng Kinh có tên khoa học là *Vitex Negundo* L.

* **Bộ phận dùng:** nhiều bộ phận của cây Hoàng Kinh được sử dụng làm thuốc: lá, quả, rễ, vỏ thân.

*** Các nghiên cứu về cây Hoàng Kinh**

+ Ở nước ngoài, có một số nghiên cứu về cây Hoàng Kinh. Tuy nhiên, các nghiên cứu này tập trung chủ yếu trên thực nghiệm. Kết quả các nghiên cứu đã xác định thành phần hóa học chính của cây Hoàng Kinh (lá chứa flavonoid, tinh dầu, carotene, glycoside...; hạt chứa flavonoid, triterpenoid, β -sitosterol...) và một số tác dụng dược lý như tác dụng giảm đau, chống viêm và bước đầu cho thấy Hoàng Kinh có tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan trên thực nghiệm.

+ Ở Việt Nam, Hoàng Kinh được sử dụng phổ biến trong dân gian với nhiều chỉ định bệnh khác nhau và được coi như một cây thuốc quý. Tuy nhiên, chưa có những minh chứng khoa học về cây thuốc này. Vì vậy, cây thuốc chưa được đưa vào chuyên luận Dược điển Việt Nam. Do đó, cần có những nghiên cứu trên thực nghiệm cũng như trên lâm sàng để cung cấp những minh chứng khoa học, qua đó để có thể tận dụng, phát triển cây thuốc quý này. Năm 2013, nhóm nghiên cứu trường Đại học Y Hà Nội đã kết hợp với trường Đại học Dược Hà Nội bước đầu nghiên cứu về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và bào chế viên nang cứng từ lá cây Hoàng Kinh. Kết quả nghiên cứu đã định tính được các nhóm chất chính trong lá Hoàng Kinh và xác định được hàm lượng Flavonoid trong lá Hoàng Kinh. Nghiên cứu này tiếp tục được đánh giá tính an toàn và tác dụng của lá cây Hoàng kinh trên thực nghiệm và trên lâm sàng.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu nghiên cứu

2.1.1. Nghiên cứu trên thực nghiệm: Cao đặc Hoàng Kinh được bào chế từ lá cây Hoàng Kinh tại Trường Đại học Dược Hà Nội. Cao đặc Hoàng kinh đạt tiêu chuẩn cơ sở.

2.1.2. Nghiên cứu trên lâm sàng

- Viên nang Hoàng Kinh được bào chế từ cao đặc Hoàng Kinh tại Trường Đại học Dược Hà Nội. Thành phần 1 viên nang: 316 mg Cao đặc Hoàng Kinh, tá dược vừa đủ 1 viên nang số 0. Viên nang có chứng nhận tiêu chuẩn cơ sở của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương - Bộ Y Tế. Thuốc đối chứng: Mobic 7,5mg của công ty Boehringer Ingelheim -

Greece. Thuốc điều trị nền của 2 nhóm: Methotrexat 2,5mg, 10mg/tuần, của công ty Remedica Ltd - Cyprus

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu trên thực nghiệm

Thỏ chủng Newzealand White, chuột nhắt trắng chủng Swiss, chuột cống trắng chủng Wistar trưởng thành do Trung tâm chăn nuôi động vật thí nghiệm Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

2.2.2. Đối tượng nghiên cứu trên lâm sàng

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

* **Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân:** Chọn bệnh nhân được đoán VKDT theo tiêu chuẩn của Hội thấp khớp học Mỹ (American college of Rheumatology - ACR) năm 1987, đang được điều trị Methotrexat 10mg/tuần, thời gian ít nhất là 3 tháng cho đến thời điểm tham gia nghiên cứu, thể hoạt động nhẹ và vừa theo mức độ hoạt động bệnh dựa trên 28 khớp (disease activity score based on 28 joints - DAS 28): $2,6 \leq DAS 28 < 3,2$ và $3,2 \leq DAS 28 \leq 5,1$, tuổi ≥ 18 , không phân biệt giới, nghề nghiệp, tình nguyện tham gia nghiên cứu.

* **Tiêu chuẩn loại trừ bệnh nhân:** Loại trừ bệnh nhân mắc bệnh suy gan, suy thận, bệnh về máu, lao, ung thư, viêm loét dạ dày tá tràng tiến triển, rối loạn tâm thần, rối loạn cảm giác, bệnh về mắt, bệnh phổi mạn tính, phụ nữ có thai và cho con bú, không tuân thủ yêu cầu của nghiên cứu.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nghiên cứu trên thực nghiệm

- Nghiên cứu độc tính cấp của cao Hoàng Kinh theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon: Chuột nhắt được chia thành 5 lô, mỗi lô 10 con,

được uống thuốc nghiên cứu 3 lần/24h theo liều tăng dần từ 124,05g/kg đến 620,25g/kg. Theo dõi tình trạng chung và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ và theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7.

- Nghiên cứu độc tính bán trường diễn theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới: Thỏ được chia làm 3 lô, mỗi lô 10 con. Lô chứng: uống nước cất 2ml/kg thể trọng/ngày. Lô trị 1: uống Cao Hoàng Kinh liều 3,2g dược liệu/kg thể trọng; Lô trị 2: uống Cao Hoàng Kinh liều 9,6g dược liệu/kg thể trọng. Thỏ được uống một lần/ngày liên tục trong 8 tuần. Đánh giá tại các thời điểm trước uống thuốc (T_0), sau 4 tuần (T_4), sau 8 tuần (T_8) về tình trạng chung, thể trọng, chức năng tạo máu và hình thái gan thận.

- Nghiên cứu tác dụng giảm đau trung ương của viên nang Hoàng Kinh bằng phương pháp mâm nóng và máy đo ngưỡng đau. Chuột nhắt trắng được chia thành 4 lô: Lô 1: uống nước cất liều 0,2ml/10g thể trọng/ngày; Lô 2: uống codein phosphat 20mg/kg thể trọng; Lô 3: uống Hoàng Kinh liều 9,6g/kg thể trọng/ngày; Lô 4: uống Hoàng Kinh liều 28,8g/kg thể trọng/ngày. *Phương pháp mâm nóng*: Đo thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột trước khi uống thuốc và sau khi uống thuốc lần cuối cùng 1 giờ. *Phương pháp gây đau bằng máy đo ngưỡng đau*: Tác dụng một lực tăng dần lên bàn chân phải của chuột. Quan sát để phát hiện và ghi lại khoảng cách trên thước đo ở máy đo ngưỡng đau khi đạt đến lực làm cho chuột phản ứng lại bằng cách rút chân ra khỏi kim gây đau của máy đo ngưỡng đau.

- Nghiên cứu tác dụng giảm đau ngoại biên bằng phương pháp gây quặn đau bằng acid acetic: Chuột nhắt trắng được chia thành 4 lô: Lô 1 uống nước cất liều 0,2ml/10g thể trọng/ngày; Lô 2 uống aspirin 150mg/; Lô 3 uống Hoàng Kinh liều 9,6g/kg thể trọng/ngày; Lô 4 uống Hoàng Kinh liều 28,8g/kg thể trọng/ngày. Chuột ở các lô 1, 3 và 4 được uống nước cất hoặc thuốc thử mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng trong 3 ngày

liên tục. Ngày thứ 3, sau khi uống thuốc 1 giờ, tiêm vào ổ bụng mỗi chuột 0,2ml dung dịch acid acetic 1%. Đếm số con quặn đau của từng chuột trong mỗi 5 phút cho đến hết phút thứ 30 sau khi tiêm acid acetic. So sánh số con quặn đau của chuột giữa các lô với nhau.

- Nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của viên nang Hoàng Kinh trên mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin và trên mô hình gây viêm màng bụng chuột công bằng carrageenin và formaldehyde. Chuột được uống thuốc với liều 5,6g và 16,8g/kg thể trọng/ngày hoặc nước trong 4 ngày liền trước khi gây viêm. Ngày thứ 4, sau khi uống thuốc 1 giờ, gây viêm bằng cách tiêm carrageenin 1% 0,05ml/chuột vào dưới da gan bàn chân sau bên phải của chuột. Đo thể tích chân chuột vào các thời điểm: trước khi gây viêm (V_0), sau khi gây viêm 2 giờ (V_2), 4 giờ (V_4), 6 giờ (V_6) và 24 giờ (V_{24}).

- Nghiên cứu tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm: Chuột nhắt trắng, được chia thành 4 lô: Lô 1 uống nước cất 0,2ml/10g chuột; Lô 2: uống methylprednisolon liều 10mg/kg thể trọng; Lô 3: uống cao Hoàng Kinh liều 9,6g dược liệu/kg thể trọng; Lô 4 uống cao Hoàng Kinh liều 28,8g dược liệu/kg thể trọng. Gây viêm mạn tính bằng cách cấy sợi amian trọng lượng 6 mg tiệt trùng đã được tẩm carrageenin 1% ở da gáy của mỗi chuột. Sau đó 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.

2.3.2. Nghiên cứu trên lâm sàng

2.3.2.1. *Thiết kế nghiên cứu:* Thử nghiệm lâm sàng mở, so sánh trước với sau điều trị, và so sánh với nhóm chứng.

2.3.2.2. *Quy trình nghiên cứu*

- Bệnh nhân chọn vào nghiên cứu được chia thành 2 nhóm theo phương pháp ghép cặp tương đồng về tuổi, giới, mức độ hoạt động của bệnh theo DAS 28.

- Phác đồ nền sử dụng cho cả 2 nhóm: Methotrexat 2,5mg x 4 viên /lần/ tuần x 4 tuần. Uống cố định vào một ngày trong tuần (ngày thứ 2 sau khi bệnh nhân vào viện). Nhóm chứng: 36 bệnh nhân, uống Mobic 7,5mg/ngày x 30 ngày. Nhóm nghiên cứu: 36 bệnh nhân, uống viên nang Hoàng Kinh 10 viên /ngày x 30 ngày.

2.3.2.3. Các chỉ tiêu nghiên cứu

- Các chỉ tiêu nghiên cứu trên lâm sàng: thời gian cứng khớp buổi sáng, số khớp đau, VAS (Visual Analog Scale), chỉ số Ritchie, số khớp sưng, mức độ cải thiện bệnh theo chức năng vận động (Health Assessment Questionnaire - HAQ), DAS 28, cải thiện bệnh theo ACR và các tác dụng không mong muốn trên lâm sàng. Các chỉ tiêu lâm sàng được lượng giá vào ngày đầu tiên (D_0), ngày thứ 15 (D_{15}) và ngày thứ 30 (D_{30}) của đợt điều trị.

Các chỉ tiêu cận lâm sàng như bilan viêm (tốc độ máu lắng, Protein C phản ứng (CRP - C - reaction protein), các xét nghiệm huyết học và sinh hóa như hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, các enzyme gan ALT, AST, ure, creatinin và yếu tố dạng thấp RF. Các chỉ tiêu trên cận lâm sàng được lượng giá vào D_0 và D_{30} của đợt điều trị.

2.3.2.4. Phương pháp đánh giá kết quả

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

- Đánh giá mức độ cải thiện hoạt động bệnh theo thể hàn nhiệt của YHCT.

- Đánh giá về tác dụng không mong muốn của thuốc

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

2.3.2.6. *Đạo đức nghiên cứu*: Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức Y sinh học Trường Đại học Y Hà Nội

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm

3.1.1. Độc tính cấp và bán trường diễn

* Độc tính cấp: Sau khi uống cao Hoàng Kinh ở tất cả các lô không có chuột nào chết trong vòng 72 giờ. Ở các lô chuột uống với liều Hoàng Kinh là 124,05g dược liệu /kg đến liều 372,15g dược liệu /kg chuột ăn uống, vận động bình thường, đi ngoài phân khô. Ở lô chuột uống với liều Hoàng Kinh là 496,20g dược liệu /kg đến 620,25g dược liệu /kg một số chuột trong lô có hiện tượng ỉa chảy trong vòng 24 giờ sau khi uống thuốc thử, những ngày sau trở về bình thường.

* Độc tính bán trường diễn: Trong thời gian thí nghiệm, thỏ ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô. Sau 8 tuần dùng thuốc liên tục với liều 3,2g dược liệu/kg thỏ và 9,6g dược liệu/kg thỏ không gây độc tính trên cơ quan tạo máu và không làm thay đổi chức năng gan thận thỏ trên xét nghiệm sinh hóa cũng như trên mô bệnh học.

3.1.2. Tác dụng giảm đau, chống viêm

3.1.2.1. Tác dụng giảm đau

* Tác dụng giảm đau trung ương: Hoàng Kinh liều dùng 9,6g/kg/ngày và 28,8g/kg/ngày uống trong 3 ngày liên tục không có tác dụng giảm đau khi nghiên cứu trên mô hình mâm nóng và máy đo ngưỡng đau trên chuột nhắt trắng.

* Tác dụng giảm đau ngoại biên: Tác dụng giảm đau của viên nang Hoàng Kinh bằng phương pháp gây đau bằng acid acetic

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của viên nang Hoàng Kinh lên số cơn quặn đau của chuột nhắt trắng

Lô	n	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
1	10	6,10 ± 3,45	24,40 ± 7,06	18,60 ± 3,86	15,60 ± 2,99	14,20 ± 3,82	11,40 ± 3,66
2	10	0,60 ± 0,97	8,60 ± 2,55	7,80 ± 0,92	7,40 ± 1,43	7,00 ± 2,40	6,30 ± 2,71
P ₂₋₁		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,01
3	10	3,00 ± 2,16	14,70 ± 5,01	13,70 ± 2,83	10,10 ± 2,18	9,00 ± 2,58	5,60 ± 2,95
p ₃₋₁		< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,001	< 0,01	< 0,01
p ₃₋₂		< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,05	> 0,05
4	10	3,40 ± 1,84	15,10 ± 2,38	12,10 ± 1,60	9,90 ± 1,91	8,70 ± 1,57	5,40 ± 1,65
p ₄₋₁		< 0,05	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,01	< 0,001
p ₄₋₂		< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,05	> 0,05
p ₄₋₃		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.17 cho thấy: Hoàng Kinh cả 2 liều 9,8g/kg/ngày và 28,8g/kg/ngày uống trong 3 ngày liên tục có tác dụng làm giảm rõ rệt số cơn quặn đau ở tất cả các thời điểm nghiên cứu so với lô chứng ($p < 0,05$, $p < 0,01$ và $p < 0,001$).

3.1.2.2. Tác dụng chống viêm

*** Tác dụng chống viêm cấp:**

- Tác dụng chống viêm cấp của viên nang Hoàng Kinh trên mô hình gây phù chân chuột cống trắng bằng carrageenin

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của viên nang Hoàng Kinh trên mô hình gây phù chân chuột

Lô	Sau 2 giờ		Sau 4 giờ		Sau 6 giờ		Sau 24 giờ	
	Độ phù ($\bar{X} \pm SE$)	% giảm phù so với chúng	Độ phù (%) ($\bar{X} \pm SE$)	% giảm phù so với chúng	Độ phù (%) ($\bar{X} \pm SE$)	% giảm phù so với chúng	Độ phù (%) ($\bar{X} \pm SE$)	% giảm phù so với chúng
1	42,10 ± 6,01		60,78 ± 8,47		68,98 ± 7,83		20,16 ± 4,70	
2	19,77 ± 4,83	53,05	33,81 ± 6,33	44,37	41,70 ± 5,71	39,54	15,39 ± 4,55	23,67
p_{2-1}	< 0,01		< 0,05		< 0,05		> 0,05	
3	37,70 ± 7,87	10,46	49,67 ± 6,52	18,27	40,59 ± 5,30	41,16	24,69 ± 4,14	15,20
p_{3-1}	> 0,05		> 0,05		< 0,05		> 0,05	
p_{3-2}	> 0,05		< 0,05		> 0,05		> 0,05	
4	43,79 ± 8,80	-4,0	59,53 ± 8,30	2,06	50,61 ± 6,78	26,63	27,43 ± 3,81	-36,08
p_{4-1}	> 0,05		> 0,05		> 0,05		> 0,05	
p_{4-2}	> 0,05		< 0,05		> 0,05		> 0,05	

Kết quả ở bảng 3.18 cho thấy Hoàng Kinh liều 5,6g/kg mức độ phù chân chuột giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng trắng ở thời điểm 6h, mức độ giảm là 41,16%.

- Ảnh hưởng của Hoàng Kinh lên số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của viên nang Hoàng Kinh lên số lượng bạch cầu dịch rỉ viêm

Lô	n	Số lượng bạch cầu (G/l) ($\bar{X} \pm SE$)	% bạch cầu giảm	p so với lô 1	p so với lô 2
1	10	16,46 ± 2,63			
2	10	18,80 ± 2,11	- 14,20	> 0,05	
3	10	14,07 ± 2,79	14,53	> 0,05	> 0,05
4	10	11,16 ± 2,25	32,23	< 0,05	> 0,05

Kết quả ở bảng 3.21 cho thấy Hoàng Kinh liều 16,8g/kg có tác dụng làm giảm rõ rệt số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm so với lô chứng ($p < 0,05$), mức độ giảm là 32,23%.

*** Tác dụng chống viêm mạn của viên nang Hoàng Kinh**

Bảng 3.22. Tác dụng của viên nang Hoàng Kinh lên trọng lượng u hạt

Lô	Trọng lượng u (mg)	Tỷ lệ giảm trọng lượng u hạt (%)	p so lô1	p so lô 2
1	75,25 ± 17,25			
2	35,43 ± 12,75	52,92	< 0,001	
3	45,00 ± 11,55	40,20	< 0,01	> 0,05
4	44,22 ± 7,29	41,24	< 0,001	> 0,05

Kết quả bảng 3.22 cho thấy: Hoàng Kinh liều 9,8g/kg và 28,8g/kg làm giảm 40,20% và 41,24% trọng lượng khô u hạt so với lô chứng, có tác dụng chống viêm mạn tính ($p < 0,01$).

3.2. Kết quả nghiên cứu trên lâm sàng

3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân nghiên cứu

- Các đặc điểm về tuổi, giới, thời gian mắc bệnh, nghề nghiệp, mức độ bệnh của 2 nhóm trước điều trị như thời gian cứng khớp buổi sáng, chỉ số khớp sưng, khớp đau, chỉ số Ritchie, VAS, ESR, HAQ của hai nhóm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Tỷ lệ bệnh nhân phân loại theo hàn nhiệt của YHCT của 2 nhóm khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.2.1. Kết quả điều trị theo YHHD

3.2.1.1. Tác dụng giảm đau

- Sau điều trị, thời gian cứng khớp trung bình và số khớp đau trung bình của 2 nhóm khác biệt có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị ($p < 0,05$). Tuy nhiên giữa 2 nhóm không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

- Sau điều trị mức độ cải thiện theo thang điểm VAS (VAS1, VAS2) ở nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Mức độ cải thiện VAS3 của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng không có sự khác biệt.

Bảng 3.32. Cải thiện chỉ số Ritchie trung bình

Ritchie	Nhóm NC (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm C (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	11,47 ± 2,21	12,81 ± 4,31	> 0,05
D ₃₀	7,58 ± 2,35	8,69 ± 3,00	> 0,05
Cải thiện (D ₃₀ - D ₀)	- 3,89 ± 2,72	- 4,11 ± 3,77	> 0,05
P (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Chỉ số Ritchie trung bình của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng đều giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị với $p < 0,05$.

3.2.1.2. Tác dụng chống viêm

Bảng 3.33. Cải thiện số khớp sưng trung bình

Khớp sưng	Nhóm NC (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm C (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	1,72 ± 1,28	1,69 ± 1,37	> 0,05
D ₃₀	0,56 ± 0,84	1,19 ± 1,12	< 0,05
Cải thiện (D ₃₀ - D ₀)	- 1,17 ± 1,36	- 0,5 ± 0,88	< 0,05
p (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Sau điều trị số khớp sưng trung bình của nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 3.34. Cải thiện tốc độ máu lắng trung bình

Máu lắng (mm/h)	Nhóm NC (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm C (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	37,38 ± 18,09	37,78 ± 25,03	> 0,05
D ₃₀	27,22 ± 16,99	36,36 ± 21,56	> 0,05
Cải thiện (D ₃₀ - D ₀)	- 10,16 ± 19,40	- 1,42 ± 17,38	
p (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	> 0,05	

Sau điều trị, tốc độ máu lắng trung bình của nhóm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị và so với nhóm chứng với $p < 0,05$.

Bảng 3.35. Cải thiện CRP trung bình của hai nhóm

CRP (mg/dl)	Nhóm NC (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm C (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	1,22 ± 1,54	1,79 ± 2,69	> 0,05
D ₃₀	0,77 ± 1,17	1,34 ± 2,82	> 0,05
Cải thiện (D ₃₀ - D ₀)	- 0,45 ± 1,26	- 0,46 ± 2,72	> 0,05
p (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	> 0,05	

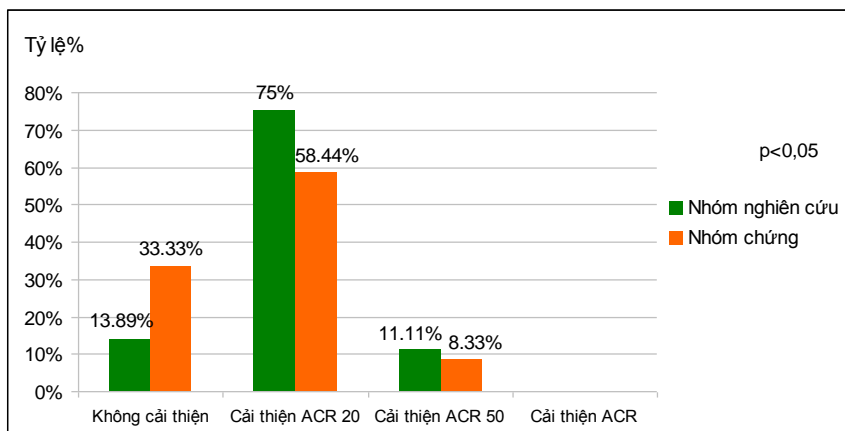
Sau điều trị, CRP trung bình của nhóm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. CRP ở nhóm chứng giảm không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.2.1.3. Tác dụng cải thiện hoạt động bệnh

**Bảng 3.37. Cải thiện chức năng vận động trung bình
đánh giá theo bộ câu hỏi HAQ**

HAQ trung bình	Nhóm NC (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm C (n=36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	2,49 ± 0,97	2,23 ± 1,25	> 0,05
D ₃₀	1,34 ± 0,61	1,36 ± 0,81	> 0,05
p (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Sau điều trị nhóm chứng và nhóm nghiên cứu đều cải thiện chức năng vận động trung bình theo HAQ so với trước điều trị. Sự cải thiện có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.



Biểu đồ 3.12: Tỷ lệ bệnh nhân cải thiện theo ACR

Tỷ lệ bệnh nhân cải thiện 20% theo ACR ở nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 3.38. Cải thiện chỉ số DAS 28 trung bình

DAS 28 trung bình	Nhóm NC (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	Nhóm C (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	P
D ₀	4,06 ± 0,61	4,07 ± 0,71	> 0,05
D ₃₀	3,32 ± 0,81	3,69 ± 0,93	> 0,05
P (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Mức độ cải thiện trung bình theo DAS 28 sau điều trị của 2 nhóm giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị với $p < 0,05$.

3.3. Mức độ cải thiện bệnh theo phân loại thể bệnh và hàn nhiệt của YHCT

Mức độ cải thiện $\geq 20\%$ các chỉ số Ritchie, chức năng vận động theo HAQ, cải thiện theo DAS 28 khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo tính chất hàn nhiệt của bệnh ($p > 0,05$).

3.4. Tác dụng không mong muốn

Nhóm nghiên cứu không có bệnh nhân nào có biểu hiện bất thường trong 30 ngày điều trị. Nhóm chứng có 4,81% (3/36 bệnh nhân) có biểu hiện đau thượng vị phải kết hợp dùng Omeprazol 20mg/ngày và 11,11% (4/36 bệnh nhân) có cảm giác đầy bụng sau khi uống Mobic.

3.4.1. Tác dụng không mong muốn trên cận lâm sàng

Bảng 3.45. Thay đổi các chỉ số huyết học trước và sau điều trị

Chỉ số	Nhóm NC (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)		P	Nhóm C (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)		P
	D ₀	D ₃₀		D ₀	D ₃₀	
Hồng cầu (T/l)	4,44 ± 0,47	4,39 ± 0,45	> 0,05	4,21 ± 0,37	4,13 ± 0,43	> 0,05
Hb (g/l)	13,11 ± 1,36	12,96 ± 1,14	> 0,05	12,3 ± 1,48	12,14 ± 1,45	> 0,05
Bạch cầu (G/l)	7,42 ± 2,94	7,18 ± 2,45	> 0,05	7,28 ± 2,44	6,89 ± 2,26	> 0,05
Tiểu cầu (G/l)	291,8 ± 81,48	279,03 ± 95,37	> 0,05	296,39 ± 98,24	297,39 ± 94,77	> 0,05

Các chỉ số hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị và so sánh giữa 2 nhóm ($p < 0,05$).

Các chỉ số sinh hóa như glucose máu, ure, creatinin, ALT, AST thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị và so sánh giữa 2 nhóm.

Chương 4

BÀN LUẬN

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

4.1.1. Độc tính cấp và bán trường diễn

- Độc tính cấp: Chuột nhắt đã được uống cao Hoàng Kinh ở nồng độ đậm đặc nhất, thể tích tối đa 0,25ml/10g chuột và số lần tối đa 3 lần trong 24 giờ. Như vậy, chuột đã được uống lượng thuốc tối đa có thể dung nạp được, tương đương 620,25g dược liệu/kg thể trọng chuột không có chuột nào chết nên không xác định được liều gây chết và liều chết năm mươi phần trăm (LD_{50}). Tính theo kinh nghiệm dân gian thì chuột nhắt đã uống gấp 64,61 lần liều trên người (tính hệ số ngoại suy trên chuột nhắt là 12). Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và hướng dẫn nghiên cứu thuốc mới, sử dụng Hoàng Kinh với liều dân gian là rất an toàn.

- Độc tính bán trường diễn: Theo kết quả nghiên cứu, dùng cao Hoàng Kinh liều tương đương lâm sàng và liều gấp 3 lần liều lâm sàng không làm ảnh hưởng đến chức năng gan thận và không làm thay đổi mô bệnh học gan thận thỏ. Như vậy, cao Hoàng Kinh không gây độc tính bán trường diễn trên thỏ. Theo các nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như tác dụng dược lý của Hoàng Kinh, cho thấy dịch chiết từ lá Hoàng Kinh có tác dụng bảo vệ tế bào gan, có tác dụng chống oxy hóa.

4.1.2. Tác dụng giảm đau, chống viêm

- Tác dụng giảm đau: Viên nang Hoàng Kinh không có tác dụng giảm đau theo cơ chế trung ương mà có tác dụng giảm đau theo cơ chế ngoại vi. Thí nghiệm gây đau bằng acid acetic là thí nghiệm đại diện trong việc đánh giá giảm đau có tính chất ngoại vi. Theo các nghiên cứu về thành phần hóa học của lá Hoàng Kinh cho thấy thành phần chính của Hoàng Kinh là các flavonoid, thành phần này có tác dụng chống oxy hóa cao. Nhờ tác dụng này sẽ làm giảm gốc tự do, làm giảm sự oxy hóa lớp phospholipid màng tế bào và giảm giải phóng một số chất trung gian hóa học dẫn đến viêm và đau. Một số dược liệu YHCT được nghiên cứu trên thực nghiệm cũng cho thấy có tác dụng giảm đau ngoại vi như Cốt khí củ, Cầu tích, viên Regimune chiết xuất từ rễ cây Chay.

- Tác dụng chống viêm: Hoàng Kinh liều 5,6g/kg thể trọng có tác dụng chống viêm cấp ở thời điểm 6h sau khi gây phù chân chuột cống trắng bằng carragenin. Hoàng Kinh ở cả 2 liều 9,6g và 28,8g/kg thể trọng đều có tác dụng chống viêm mạn tính trên mô hình gây viêm mạn u hạt ở chuột nhắt trắng, tác dụng này tương đương methylprednisolon liều 10mg/kg thể trọng. Theo nghiên cứu về thành phần hóa học của lá Hoàng Kinh cho thấy thành phần chính trong lá Hoàng Kinh là tinh dầu, flavonoid inositol, saponin và tannin... Các flavonoid tự nhiên được xem là có bản chất chống oxy hóa, chống lại các gốc tự do của oxy - căn nguyên của nhiều quá trình bệnh lý trong cơ thể, trong đó có quá trình viêm, oxy hóa LDL. Tác dụng điều trị chống viêm, giảm đau của flavonoid chiết xuất từ Hoàng Kinh có lẽ cũng liên quan chặt chẽ với đặc tính chống oxy hóa của nó.

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

4.2.1. Sự tương đồng của 2 nhóm nghiên cứu

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

4.2.2. Hiệu quả điều trị theo YHHĐ

4.2.2.1. Tác dụng giảm đau

Sau điều trị thời gian cứng khớp trung bình, số khớp đau trung bình, điểm trung bình VAS1, VAS2, VAS3 và chỉ số Ritchie của nhóm nghiên cứu và nhóm chứng đều giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị ($p < 0,05$).

Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy thành phần chính của lá Hoàng Kinh là Flavonoid - có tác dụng làm giảm gốc tự do, giảm sự oxy hóa lớp phospholipid màng tế bào và giảm giải phóng một số chất trung gian hóa học dẫn đến viêm và đau. Tác dụng giảm đau của viên nang Hoàng Kinh cũng đã được minh chứng trên thực nghiệm khi gây đau quận bằng acid acetic trên chuột nhắt trắng.

4.2.2.2. Tác dụng chống viêm

Sau điều trị số khớp sưng trung bình, tốc độ máu lắng trung bình và CRP trung bình của nhóm nghiên cứu giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị với $p < 0,05$. Tác dụng chống viêm trên lâm sàng cũng phù hợp với kết quả chống viêm cấp và mạn trên thực nghiệm. Theo nghiên cứu của Chattopadhyay P và cộng sự về lá cây Hoàng Kinh cho thấy tinh dầu chiết xuất từ lá Hoàng Kinh có tác dụng ức chế COX - 1 và COX - 2. Nghiên cứu về cao Hoàng Kinh trên lâm sàng cho thấy có tác dụng giảm chu vi khớp gối trên những bệnh nhân thoái hóa khớp gối kèm theo sưng khớp gối với $p < 0,05$.

4.2.2.3. Tác dụng cải thiện hoạt động bệnh

Sau điều trị cả 2 nhóm đều cải thiện chức năng vận động trung bình theo HAQ so với trước điều trị ($p < 0,05$). Mức độ cải thiện chức năng vận

động HAQ tỷ lệ thuận với mức độ giảm đau và giảm sưng trên lâm sàng. Với kết quả nghiên cứu về tác dụng giảm đau và chống viêm trên lâm sàng cũng như trên thực nghiệm thì mức độ cải thiện chỉ số HAQ là hoàn toàn phù hợp. Biểu đồ 3.12 cho thấy tỷ lệ cải thiện 20% và 50% theo ACR của nhóm nghiên cứu là 75% và 11,11%, cao hơn nhóm chứng ở mức cải thiện 20% ($p < 0,05$). Mốc cải thiện 20% là ngưỡng được ACR sử dụng để đánh giá bệnh nhân có đáp ứng với một thuốc hay một phương pháp điều trị hay không. Kết quả bảng 3.38 cho thấy mức độ cải thiện trung bình theo DAS 28 sau điều trị của 2 nhóm giảm có ý nghĩa thống kê so với trước điều trị với $p < 0,05$. Chỉ số DAS 28 trung bình trước điều trị của nhóm nghiên cứu là $4,06 \pm 0,61$, sau điều trị là $3,32 \pm 0,81$.

4.2.3. Hiệu quả điều trị theo phân loại hàn nhiệt của YHCT

Hoàng Kinh là dược liệu mới và chưa được ghi nhận trong Dược điển Việt Nam IV. Để tìm hiểu tính hàn nhiệt của Hoàng Kinh, chúng tôi chia làm 2 thể hàn và nhiệt theo YHCT và tìm mối tương quan với hiệu quả điều trị theo YHHĐ. Kết quả nghiên cứu cho thấy mức độ cải thiện bệnh $\geq 20\%$ theo các chỉ số Ritchie, DAS 28 và HAQ ở hai thể hàn và thể nhiệt của nhóm nghiên cứu thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cũng phù hợp với tài liệu có ghi chép về tính “Bình” của Hoàng Kinh. Có lẽ cần nghiên cứu trên số lượng bệnh nhân nhiều hơn và với các mặt bệnh khác nhau mới có thể khẳng định thêm về tính hàn nhiệt theo YHCT của vị thuốc này.

4.2.4. Tác dụng không mong muốn của Hoàng Kinh

Qua nghiên cứu 30 ngày trên 36 VKDT bằng viên nang Hoàng Kinh, chúng tôi chưa ghi nhận được trường hợp nào có tác dụng không

mong muốn trên lâm sàng. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm: Không xác định được độc tính cấp và không thấy độc tính bán trường diễn của Hoàng Kinh trên động vật thực nghiệm. Tuy nhiên, ở nhóm đối chứng xuất hiện 4,81% số bệnh nhân có biểu hiện đau thượng vị và 11,11% số bệnh nhân có cảm giác đầy bụng do tác dụng không mong muốn của thuốc giảm đau chống viêm.

KẾT LUẬN

1. Chưa xác định được độc tính cấp (LD_{50}) và độc tính bán trường diễn của cao Hoàng Kinh trên động vật thực nghiệm. Viên nang Hoàng Kinh có tác dụng giảm đau theo cơ chế giảm đau ngoại vi và có tác dụng chống viêm cấp, mạn trên mô hình động vật thực nghiệm.

- Trên chuột nhắt trắng với liều 620,25g /kg thể trọng gấp 64,61 lần liều tối đa dùng cho người nhưng không xác định được LD_{50}

- Hoàng Kinh với liều tương đương lâm sàng (3,2g /kg thể trọng) và liều gấp 3 lần liều lâm sàng (9,6g/kg thể trọng) uống trong 8 tuần chưa thấy biến đổi các chỉ số cân nặng, huyết học, hóa sinh và không biến đổi hình thái đại thể và vi thể gan thận thờ so với lô chứng ($p > 0,05$).

- Hoàng Kinh liều 9,6g và 28,8g/kg thể trọng chuột/ngày uống trong 3 ngày liên tục có tác dụng giảm đau rõ rệt trên mô hình gây quặn đau bằng acid acetic so với lô chứng ($p < 0,05$).

- Viên nang Hoàng Kinh có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin ở thời điểm 6 giờ và mô hình gây tràn dịch màng bụng chuột cống trắng bằng carrageenin + formaldehyde ($p < 0,05$).

- Viên nang Hoàng Kinh có tác dụng chống viêm mạn tính: Thuốc làm giảm trọng lượng khối u hạt trên chuột nhắt từ 40,20% đến

41,24% so với lô chứng ($p < 0,01$ đến $p < 0,001$). Tác dụng này tương đương methylprednisolon liều 10mg/kg.

2. Viên nang Hoàng Kinh kết hợp Methotrexat có tác dụng tốt trong điều trị bệnh VKDT giai đoạn hoạt động vừa và nhẹ trên lâm sàng.

- Thời gian cứng khớp trung bình, số khớp đau trung bình, chỉ số VAS1, VAS2, VAS3 và Ritchie sau điều trị cải thiện có ý nghĩa so với trước điều trị ($p < 0,05$). Mức độ cải thiện đau trung bình và hoạt động bệnh theo đánh giá của bệnh nhân (VAS1, VAS2) ở nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng ($p < 0,05$).

- Số khớp sưng trung bình, ESR và CRP giảm có ý nghĩa so với trước điều trị ($p < 0,05$). Mức độ cải thiện cao hơn so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

- Chức năng vận động theo HAQ, DAS 28, ACR 20 cải thiện có ý nghĩa so với trước điều trị ($p < 0,05$).

- Tác dụng cải thiện bệnh theo các chỉ số Ritchie, DAS28, HAQ ở các thể hàn và nhiệt theo YHCT không có sự khác biệt ($p > 0,05$).

- Chưa thấy tác dụng không mong muốn của viên nang Hoàng Kinh trên lâm sàng và cận lâm sàng trong 30 ngày điều trị bệnh nhân VKDT.

KHUYẾN NGHỊ

Bước đầu nghiên cứu trên lâm sàng cho thấy Viên nang Hoàng Kinh sử dụng tiện lợi, an toàn và có hiệu điều trị tốt trên bệnh nhân VKDT. Vì vậy, nên được triển khai nghiên cứu với số lượng bệnh nhân lớn hơn và với thời gian dài hơn.

Cần nghiên cứu phương pháp tách chiết hoạt chất chính có tác dụng trong lá Hoàng Kinh và phương pháp bào chế viên nang với các hoạt chất tách chiết để tinh giảm số lượng viên nang trong điều trị.

INTRODUCTION

Vietnam, which is located in tropical climate, has plenty of medicinal plants genetic resources. The study of medicinal plants used in healing has been encouraged by the Government and the Ministry of Health since this is a proper direction which aims to enhance the supply of good medicine for community in terms of efficacy, safety and availability. Hoang Kinh is a Vietnamese herb available in the plains, mountains, midland of Vietnam and is widely used in treating many diseases such as joint disease, flu, fever, cough, asthma, sprains, colitis ... The studies carried abroad showed that Hoang Kinh has analgesic, anti-inflammatory, antifungal, antibacterial, reducing cough, expectorant, antipyretic effects. In Vietnam, so far no studies have been conducted on the chemical constituents, pharmacological effects, as well as the clinical effects of Hoang Kinh especially in the treatment of rheumatology diseases. With the desire to take advantage of a medicinal plant available in Vietnam that can treat many diseases, we conducted this research on Hoang Kinh with the following objectives:

- 1. Study on the acute and sub – chronic toxicity of Hoang Kinh extract and anti-inflammatory, analgesic effects of hard Hoang Kinh capsules on experiment.***
- 2. Evaluate the effect of hard Hoang Kinh capsules in combination with Methotrexate in the treatment of mild and moderate type of active Rheumatoid arthritis.***

Chapter 1 OVERVIEW OF DOCUMENTS

1.1. Notion of Modern Medicine about rheumatoid arthritis

1.1.1. The cause and pathogenesis

According to modern medicine, rheumatoid arthritis (RA) is considered as an autoimmune disease with the involvement of many factors such as infections or genetic. The studies showed the immune response occurs in the synovium plays a fundamental role in RA disease in which T cells play a significant role.

1.1.2. Treatment of rheumatoid arthritis

Depending on the stage of the RA disease to select appropriate treatment such as systemic treatment, topical treatment, rehabilitation treatment and surgical treatment. Systemic treatment of RA should coordinate multiple drug classes. The class of drugs include: simple analgesics (pain medications typically grade 1 or grade 2); Non - steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs); glucocorticoids; rheumatoid arthritis drug group delay effects (Disease Modifying Anti rheumatic drugs – DMARDs) and drug group biological agents. The combination of these classes of drugs based on the following principles:

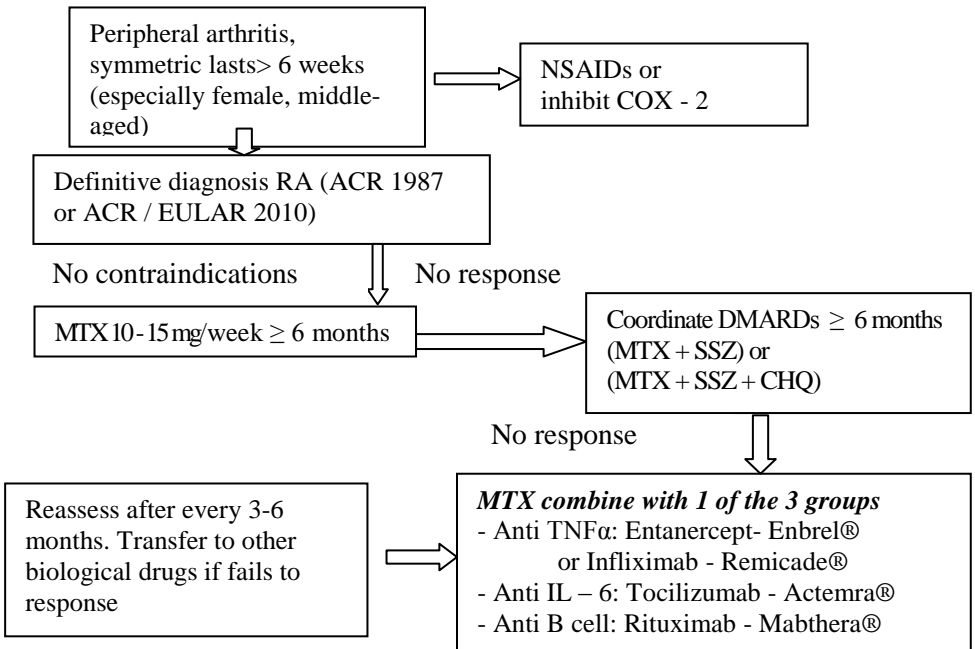


Table 1.2. Brief of Rheumatoid arthritis treatment procedure

1.2. The conception of traditional medicine about RA

1.2.1. The cause and pathogenesis

RA is categorized as “Bi zheng” in traditional medicine. Causes of “Bi zheng” include the six external climatic factors, seven emotional factors and other pathogenic factors.

The pathogenesis mechanism is due to congenital deficiency, deficiency of liver and kidneys, or frequently invaded by wind, cold, damp, heat leading to stagnancy condition of blood, qi and meridians, which cause painful, swelling joints partially or totally.

1.2.2. Treatment of RA

Treating RA according to traditional medicine must depend on clinical patterns to choose treatment principles and specific treatment. However, the general principle is treating the cause combining with symptomatic treatment by circulating blood and qi to reduce swollen, painful joints. In the classic medical literatures, “Bi zheng” is classified into two major patterns, which are wind cold damp impediment pattern and wind damp heat impediment pattern. Recently, in order to fully reflect the diversity of “Bi zheng” in clinical practice, a criteria based on Chinese Internal medicine divides “Bi zheng” into 10 patterns. Accordingly, the treatment principles for each pattern are: Wind damp impediment pattern with principle of dispelling wind, eliminate dampness, circulate meridians, analgesic. Wind cold impediment pattern with principle of warm meridian, scatter cold, eliminate dampness, circulate meridians. The cold combined with heat impediment pattern has the principle of warm meridian, scatter cold, reduce heat, eliminate dampness. The principle of damp heat impediment pattern is reducing heat, eliminating dampness, analgesic, circulating meridians. The toxic heat impediment pattern has the principle of reducing heat, detoxicating, cooling blood and circulating meridians. The blood stagnation has the principle of circulating blood, dispelling stasis, nourishing tendon, circulating meridians. The principle of phlegm pattern is transforming phlegm, circulating qi, circulating meridians, analgesic. The phlegm stasis has the principle of circulating blood, dispelling stasis, transforming phlegm and circulating meridians. The principle of qi and

yin vacuity pattern is nourishing qi and yin, circulating blood, circulating meridians. The liver and kidney vacuity pattern has the principle of supplement the liver and kidney.

1.3. An overview of some RA treatments by traditional medicine

Researches on treating RA by traditional medicine include experimental and clinical studies. Some ancient remedies such as “Tam ty thang” (with additions and subtractions), “Quyen ty thang” (with additions and subtractions) or some medicinal plants such as *Rhizoma Cibotii*, *Smilacis Glabrae*, *Rhizoma Drynariae fortunei*... have been studied experimentally. Research results indicate that traditional herbs have analgesic, anti - inflammatory on experiment. However, there hasn't been a large number of experimental researches so far. Besides, studies of medicine remedies, medicinal preparations, traditional herbs, have also been conducted clinically. In the past, some researches focused only on treating RA by single remedies (“Xuc ty thang”, “Doc hoat tang ky sinh thang”, “Quyen ty thang”, “O dau thang”, “Tam ty thang”...) and single traditional medicine products (“Ruou ngot thap khop”, “Phong te thap” capsules, “Thap khop” capsules, “Hy dan” capsules ...). Recently, by the updated understanding of RA pathogenesis, new trend of researching the treatment RA by medicinal plant combined with modern medicine has been concerned. The common combination are between DMARDs (MTX) and some remedies such as “Thong ty hoat lac thang”, “Que chi thuooc duoc tri mau thang”, “Tu dieu tieu ty thang”, “Tam ty thang”... This combination increases effectiveness of treatment, increases scientific aspects and ensures medical ethics in the research. Along with the study of remedies, scientists also are interested in researching effects of a single medicinal plant. This type of study allows scientists to identify the

main effective components of the plant in treatment. For example, the research on Regimune capsule which is extracted from the roots of *Artocarpus tonkinensis* plant. However, researches for a specific plant, especially about Vietnamese medicinal plants still are limited.

1.4. Overview of Hoang Kinh plant

* **Scientific name:** Hoang Kinh's scientific name is *Vitex Negundo* L.

* **Used parts:** Many parts of the plant can be used as medicine: Leaves, fruits, roots, bark.

*** Studies on Hoang Kinh**

+ In foreign countries, there are some researches on Hoang Kinh. However, these are mainly experimental studies. These studies have identified the chemical composition of Hoang Kinh plant (leaves contain flavonoids, essential oils, carotene, glycosides...; seed contains flavonoids, triterpenoid, β -sitosterol...) and some pharmacological effects such as analgesic, anti-inflammatory effects and Hoang Kinh initially showed antioxidant effects, protecting liver cells experimentally.

+ In Vietnam, Hoang Kinh is widely used in the community to treat many different diseases and is considered as a valuable medicinal plant. However, there is no scientific evidence of this medicinal plant. So Hoang Kinh has not been recorded in Vietnam Pharmacopoeia monograph. Therefore, it is necessary to have experimental and clinical trials to provide scientific evidence, in order to utilize and develop this valuable medicinal plant. In 2013, the research team from Hanoi Medical University collaborated with Hanoi Pharmaceutical University initially studied botanical characteristics, chemical composition and preparation of hard capsules from Hoang Kinh leaves. The results of this qualitative research has identified the main ingredient and the concentration of flavonoid in Hoang Kinh leaves. This study continues to be evaluated the safety and effects of Hoang Kinh leaves on experimental and clinical.

Chapter 2

RESEARCH SUBJECTS – RESEARCH METHODOLOGY

2.1. Research materials

2.1.1. Experimental research: Hoang Kinh extract is made from Hoang Kinh leaves at Ha Noi University of Pharmacy.

2.1.2. Clinical Research

- Hoang Kinh capsules is made from Hoang Kinh extract at Ha Noi University of Pharmacy. Ingredients 1 capsule: 316 mg Hoang Kinh extract, excipients q.s 1 capsule 0. Capsules are certified basic standards of the Central Drug Testing Institute - Department of Health. Reference drug: Mobic 7,5mg of Boehringer Ingelheim company - Greece. Background drug of 2 group: Methotrexat 2,5mg of Remedica Ltd - Cyprus

2.2. Research subjects

2.2.1. Subjects in the experimental study

Swiss white mice, white grown Wistar rats, New Zealand white rabbits provided by the Laboratory Animal Center - National Institute of Hygiene and Epidemiology.

2.2.2. Subjects in the clinical study

The sample size was calculated using the clinical research formula of the World Health Organisation. The study conducted on 72 RA patients divided into 2 groups: Treatment group (36 patients), control group (36 patients).

* **Criteria to select patients** : Patients diagnosed with RA based on the standard of American college of Rheumatology - ACR 1987, being treated with Methotrexate 10mg/week for at least 3 months before the research, with mild and moderate type of active Rheumatoid arthritis (disease activity score based on 28 joints - DAS 28): $2,6 \leq \text{DAS } 28 < 3,2$ and $3,2 \leq \text{DAS } 28 \leq 5,1$, aged ≥ 18 , regardless of sex, job, volunteered to participate in the research.

* **Criteria to exclude patients:** Excluding patients with liver failure, kidney failure, blood diseases, tuberculosis, cancer, progressing peptic ulcer, mental disorders, sensory disturbances, eye diseases, chronic lung diseases, pregnant and breastfeeding women, not comply with the requirements of the study.

2.3. Research methodology

2.3.1. Experimental research

- Study on the acute toxicity of Hoang Kinh extract by the method of Litchfield - Wilcoxon: The mice are divided into five groups, each group has 10 mice, which are given the studying medicine 3 times/24h with dose increases from 124,05g/kg to 620,25g/kg. Monitor the general status and number of dead mice in each group in 72 hours and monitor the general status of the mice until the end of the 7th day.

- Study the sub - chronic toxicity under the guidance of World Health Organization: Rabbits are divided into three groups, each group has 10 rabbits. Control group: Drink distilled water 2ml/kg of body weight/day. Treatment group 1: Drink Hoang Kinh extract dose of 3,2g medicine/kg of body weight; Treatment group 2: Drink Hoang Kinh extract dose of 9,6g/kg of body weight. Rabbits drink once a day continuously for 8 weeks. Assessment at the time before giving medicine (T0), after 4 weeks (T4), after 8 weeks (T8) on general condition, body weight, blood – forming function and morphology of liver and kidney.

- Research on central analgesic effect of Hoang Kinh capsules with hot plate test and gauge pain threshold. Mice are divided into 4 groups: Group 1: Drink distilled water dose of 0.2ml/10g of body weight/day; Group 2: Drink codeine phosphate 20mg/kg of body weight; Group 3: Drink Hoang Kinh dose of 9.6g/kg of body weight/day; Group 4: Drink Hoang Kinh dose of 28.8g/kg of body weight/day. *Hot plate method:* Measure the response time to temperature of rats 1 hour before and 1 hour after taking the last pill. *Causing pain by pain threshold meter:* Applying an ascending force to the right foot of the mouse. Observe to detect and record the distance on the ruler in the gauge

threshold of pain when it reaches the force that making mouse react by withdrawing from the needle of threshold pain meter.

- Research on peripheral analgesic effect by causing cramping pain method with acetic acid: White mice are divided into 4 groups : Group 1 drink distilled water dose of 0.2ml/10g of body weight/day; Group 2 drink aspirin 150mg/kg of body weight/day; Group 3 drink Hoang Kinh doses of 9.6g/kg of body weight/day; Group 4 drink Hoang Kinh dose of of body 28.8g/kg weight/day. Mice in the Group 1, 3 and 4 are drinking distilled water or the reagents once a day in the morning for 3 consecutive days. On the 3rd day, 1 hour after taking the drug, mice's abdominal cavities are injected with 0.2 ml of acetic acid 1%. Count the number of cramping pain episodes in each rat every 5 minutes for 30 minutes after injection of acetic acid. Compare the number of episodes of cramping pain between groups.

- Study on the anti-inflammatory effects of Hoang Kinh capsules on paw edema model rat and peritonitis model rats caused by carrageenin and formaldehyde. Mice were given pills with dose of 5,6g and 16,8g/kg of body weight/day or water for 4 days before inducing inflammation. On the 4th day, after taking pills for 1 hour, induce inflammation by injecting carrageenin 1% 0,05ml/mouse subcutaneously in the right hind soles of the mouse. Measure the volume of rat paw before inducing inflammation (V0), 2 hours after inducing inflammation (V2), 4 hours (V4), 6 hours (V6) and 24 hours (V24).

- Research on chronic anti-inflammatory effects on experimental granulomas model: White mice, divided into 4 groups: Group 1: Drink distilled water 0.2ml/10g of body weight; Group 2: Drink methylprednisolone 10mg/kg of body weight; Group 3: Drink Hoang Kinh extract dose of 9,6g/kg of body weight; Group 4: Drink Hoang Kinh extract dose of 28,8g/kg of body weight. Inducing chronic inflammation by implanting sterile asbestos fibers weighed 6mg which were soaked in 1% carrageenin, to the skin of each mouse nape. The rats then drink distilled water or the reagents continuously for 10 days. On

the 11th day, kill mice, remove the granuloma and weigh. Randomly select 3 granulomas in each group for testing microscopic pathology. The remaining granulomas are dried at temperature of 56°C for 18 hours. Weigh granulomas after being dried.

2.3.2. Clinical research

2.3.2.1. *Research design:* Clinical trial (interventional trial), comparing after and before treatment, study group and control group.

2.3.2.2. *Research process*

- Selected patients for the study are divided into 2 groups according to the method of homogenous pairing of age, gender, degree of disease activity according to DAS 28.

- Background therapy used for both 2 groups: Methotrexate 2.5mg x 4 tablets/times/week x 4 weeks. Drinking on fixed day of the week (day 2 after patients are hospitalized). Control group: 36 patients, taking Mobic 7.5mg/day x 30 days. Treatment group: 36 patients, taking 10 Hoang Kinh capsules/day x 30 days.

2.3.2.3. *Research targets*

- *Clinical research targets:* Duration of morning stiffness, number of painful joints, VAS (Visual Analog Scale), Ritchie index, number of swollen joints, disease's improvement level according to motor function (Health Assessment Questionnaire - HAQ), DAS 28, disease improvement according to ACR and adverse side effects on clinical research. The clinical criterias were evaluated on the first day (D0), day 15 (D15) and day 30 (D30) of the treatment.

Subclinical figures such as inflammation factors (erythrocyte sedimentation rate - ESR, C protein reaction – CRP), the haematological and biochemical tests such as erythrocytes, leukocytes, platelets, liver enzymes (ALT, AST), urea, creatinine and rheumatoid factor (RF). These tests are evaluated at D0 and D30 of the treatment.

2.3.2.4. *Methods of evaluation results*

- Assess the effectiveness of treatment: Assessing improvement 20%, 50%, 70% according to ACR criteria. Assessing improved disease activity according to European standards (EULAR - 2010): Compare DAS 28 before and after treatment (performance of < 0.6 : The disease does not improve; $1.2 > \text{offset} \geq 0.6$: The disease improves at an average rate; performance ≥ 1.2 : Disease improves).
- Assess the level of disease activity improvement on the patterns of RA in traditional medicine.
- Assess the adverse side effects of the medicine.

2.3.2.5. *Data processing*: The collected data is processed in accordance with Biomedical statistical algorithms, using SPSS 18.0 software. The differences are statistically significant at $p < 0.05$.

2.3.2.6. *Research morality* : Research has been approved by the Council of Biomedical Ethics of Hanoi Medical University.

Chapter 3

RESEARCH RESULTS

3.1. Experimental research results

3.1.1. *Acute toxicity and sub – chronic toxicity*

* Acute toxicity: After oral administration of Hoang Kinh extract, all groups had no mouse died within 72 hours. The group which rats drink Hoang Kinh dose of 124.05g medicinal/kg to 372.15g/kg of body weight of mice, experienced normal eating and movement, dry stool. In group of mice drinking Hoang Kinh dose of 496.20g/kg to 620.25g/kg, some mice experienced diarrhea within 24 hours after reagents administraton, but returned to normal stool after the first day.

* Sub - chronic toxicity: During the experiment, rabbits in 3 groups operate normally, agile, bright eyes, silky hair, fine dining, dry stool.

The results in Table 3.17 show: Hoang Kinh with both 2 doses of 9.8g/kg/day and 28.8g/kg/day orally for 3 consecutive days are significantly effective in reducing number of cramping pain attacks at all times of study, compared to control group ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$).

3.1.2.2. Anti-inflammatory effect

* Acute anti-inflammatory effect:

- Acute anti-inflammatory effects of Hoang Kinh capsules on white rat model with edema paw caused by carrageenin

Table 3.18. Effects of Hoang Kinh capsules on edema paw rat model

Group	After 2 hours		After 4 hours		After 6 hours		After 24 hours	
	Edema level ($\bar{X} \pm SE$)	% reduced edema level/ control group	Edema level (%) ($\bar{X} \pm SE$)	% reduced edema level/ control group	Edema level (%) ($\bar{X} \pm SE$)	% reduced edema level/ control group	Edema level (%) ($\bar{X} \pm SE$)	% reduced edema level/ control group
1	42,10±6,01		60,78±8,47		68,98±7,83		20,16±4,70	
2	19,77 ± 4,83	53,05	33,81 ± 6,33	44,37	41,70±5,71	39,54	15,39±4,55	23,67
p_{2-1}	<0,01		<0,05		<0,05		>0,05	
3	37,70±7,87	10,46	49,67±6,52	18,27	40,59±5,30	41,16	24,69±4,14	15,20
p_{3-1}	>0,05		>0,05		<0,05		>0,05	
p_{3-2}	>0,05		<0,05		>0,05		>0,05	
4	43,79±8,80	-4,0	59,53±8,30	2,06	50,61±6,78	26,63	27,43±3,81	- 36,08
p_{4-1}	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	
p_{4-2}	>0,05		<0,05		>0,05		>0,05	

The results in Table 3.18. show: With Hoang Kinh dose of 5.6g/kg of rat, paw edema levels have significantly decreased compared

to control group of white rats at the time of 6h, reduction level is 41.16%.

- *Influence of Hoang Kinh on the amount of leukocytes in inflammatory exudate*

Table 3.21. Influence of Hoang Kinh capsule on the amount of leukocytes in inflammatory exudate

Group	n	Number of leukocytes (G/l) ($\bar{X} \pm SE$)	% Reduced leukocytes	<i>p /group 1</i>	<i>p /group 2</i>
1	10	16,46 ± 2,63			
2	10	18,80 ± 2,11	- 14,20	> 0,05	
3	10	14,07 ± 2,79	14,53	> 0,05	> 0,05
4	10	11,16 ± 2,25	32,23	< 0,05	> 0,05

The results in table 3.21. show: Hoang Kinh dose of 16.8g/kg has the effect of significantly reducing the amount of leukocytes in inflammatory exudate compared to control group ($p < 0.05$), the reduction is 32.23%.

*** Chronic anti-inflammatory effects of Hoang Kinh capsules**

Table 3.22. Effects of Hoang Kinh capsules on granulomas weight

Group	Granulomas weight (mg)	Percentage of granulomas weight loss (%)	<i>p /group 1</i>	<i>p /group 2</i>
1	75,25 ± 17,25			
2	35,43 ± 12,75	52,92	< 0,001	
3	45,00 ± 11,55	40,20	< 0,01	> 0,05
4	44,22 ± 7,29	41,24	< 0,001	> 0,05

The results in table 3.22 show: Hoang Kinh doses of 9.8g/kg and 28. g/kg reduce 40.20% and 41.24% granulomas weight compared to control group, is effective against chronic inflammation ($p < 0.01$).

3.2. Clinical research results

3.2.1. Characteristics of studied patients

- The characteristics of age, gender, disease duration, occupation, level of disease of patients in 2 groups before treatment (such as time of morning stiffness, joint swelling index, joint pain, Ritchie index, VAS, ESR, HAQ) of two groups have no statistically significant differences ($p > 0.05$).

- Percentages of patients classified into patterns according to traditional medicine of two groups were not significantly different with $p > 0.05$.

3.2.1. Treatment results according to Western Medicine

3.2.1.1. Analgesic effect

- After treatment, the difference between mean durations of joints stiffness of two groups was statistically significant, compared to before treatment ($p < 0.05$). However, between 2 groups there was no statistically significant different ($p > 0.05$).

- After treatment the degree of improvement according to VAS (VAS1, VAS2) of treatment group was higher than control group, the difference was statistically significant at $p < 0.05$. The degree of improvement VAS3 of treatment group and control groups did not differ.

Table 3.32. Improvement of Ritchie mean index

Ritchie	Study group (n = 36) $(\bar{X} \pm SD)$	Control group (n = 36) $(\bar{X} \pm SD)$	p
D ₀	11,47 ± 2,21	12,81 ± 4,31	> 0,05
D ₃₀	7,58 ± 2,35	8,69 ± 3,00	> 0,05
Improve (D ₃₀ - D ₀)	- 3,89 ± 2,72	- 4,11 ± 3,77	> 0,05
p (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

Ritchie mean index of both the study and control group reduced statistically significant compared to before treatment with $p < 0.05$.

3.2.1.2. Anti-inflammatory effect

Table 3.33. Mean number of swollen joints improvement

Swollen joint	Study group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	Control group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	1,72 ± 1,28	1,69 ± 1,37	> 0,05
D ₃₀	0,56 ± 0,84	1,19 ± 1,12	< 0,05
Improve (D ₃₀ - D ₀)	- 1,17 ± 1,36	- 0,5 ± 0,88	< 0,05
P (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

After treatment, the mean number of swollen joints of study group was lower than control group, the difference was statistically significant at $p < 0.05$.

Table 3.34. Mean erythrocyte sedimentation rate improvement

Erythrocyte sedimentation(mm/h)	Study group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	Control group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	37,38 ± 18,09	37,78 ± 25,03	> 0,05
D ₃₀	27,22 ± 16,99	36,36 ± 21,56	> 0,05
Improve (D ₃₀ - D ₀)	- 10,16 ± 19,40	- 1,42 ± 17,38	
P (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	> 0,05	

After treatment, the mean erythrocyte sedimentation rate of study group decreased statistically significant compared with before treatment and compared with the control group at $p < 0.05$.

Table 3.35. Mean CRP levels improvement of 2 groups

CRP (mg/dl)	Study group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	Control group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	1,22 ± 1,54	1,79 ± 2,69	> 0,05
D ₃₀	0,77 ± 1,17	1,34 ± 2,82	> 0,05
Improve (D ₃₀ - D ₀)	- 0,45 ± 1,26	- 0,46 ± 2,72	> 0,05
p (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	> 0,05	

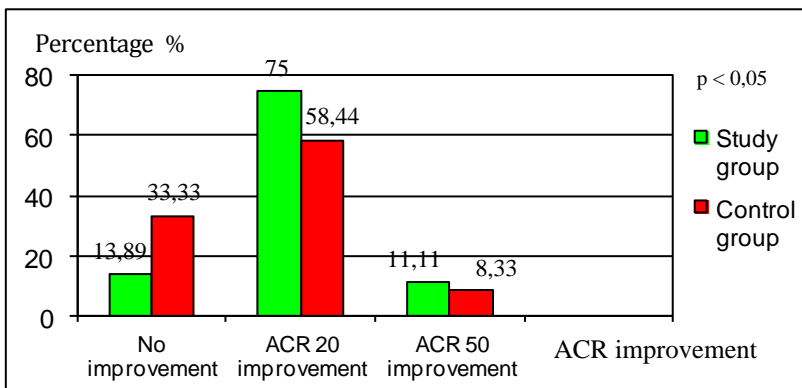
After treatment, the mean CRP level of study group reduced with statistical significance $p < 0.05$. The mean CRP level decreased in the control group has no statistical significance with $p > 0.05$.

3.2.1.3. Disease's activity improvement function

Table 3.37. Mean motor function score improvement assessed according to the HAQ questionnaire

Average HAQ	Study group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	Control group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	2,49 ± 0,97	2,23 ± 1,25	> 0,05
D ₃₀	1,34 ± 0,61	1,36 ± 0,81	> 0,05
p (D ₀ - D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

After treatment, mean motor function score of both control group and treatment improved according to HAQ compared to before treatment. The improvement was statistically significant at $p < 0.05$.



Graph 3.12: Percentage of patients improve with ACR

Percentage of patients improved by 20% according to ACR was higher in study group, the difference was statistically significant at $p < 0.05$.

Table 3.40. Mean DAS 28 index improvement

Average DAS 28	Study group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	Control group (n = 36) ($\bar{X} \pm SD$)	p
D ₀	4,06 ± 0,61	4,07 ± 0,71	> 0,05
D ₃₀	3,32 ± 0,81	3,69 ± 0,93	> 0,05
p (D ₀ -D ₃₀)	< 0,05	< 0,05	

The mean level of improvement according to DAS 28 after treatment of 2 groups had a statistically significant reduction compared to prior treatment with $p < 0.05$.

3.3. The degree of disease improvement classified by disease pattern and heat - cold characteristics in traditional medicine

The $\geq 20\%$ improvement levels of Ritchie index, HAQ motor function score, improved according to DAS 28, the difference was not statistically significant according to the heat – cold pattern in traditional medicine classification of disease ($p > 0.05$).

3.4. Adverse side effects

The study group did not have any patient with abnormal expression in 30 days of treatment. Control group had 4.81% (3/36 patients) experienced epigastric pain and had to use Omeprazol 20mg/day and 11.11% (4/36 patients) with mild abdominal discomfort after taking Mobic.

3.4.1. Subclinical adverse side effects

Table 3.47. Changes of hematological figures before and after treatment

Index	Study group (n=36)		P	Control group (n=36)		P
	$(\bar{X} \pm SD)$			$(\bar{X} \pm SD)$		
	D ₀	D ₃₀		D ₀	D ₃₀	
Erythrocyte (T/l)	4,44 ± 0,47	4,39 ± 0,45	> 0,05	4,21 ± 0,37	4,13 ± 0,43	> 0,05
Hb (g/l)	13,11 ± 1,36	12,96 ± 1,14	> 0,05	12,3 ± 1,48	12,14 ± 1,45	> 0,05
Leukocytes (G/l)	7,42 ± 2,94	7,18 ± 2,45	> 0,05	7,28 ± 2,44	6,89 ± 2,26	> 0,05
Platelet(G/l)	291,8 ± 81,48	279,03 ± 95,37	> 0,05	296,39 ± 98,24	297,39 ± 94,77	> 0,05

The levels of erythrocyte, leukocytes, platelet of study group and control group did not vary, there was no statistical significance compared to before treatment and between 2 groups ($p < 0.05$).

The biochemical indicators levels after treatment (glucose, urea, creatinine, ALT, AST) has no statistically significant change compared to before treatment and between two groups.

Chapter 4

DISCUSSION

4.1. Discuss the results of experimental studies

4.1.1. Acute toxicity and semi-chronic toxicity

- Acute toxicity: The mice were given Hoang Kinh extract in the most concentrated, the maximum volume of 0.25ml/10g mouse and a maximum of 3 times in 24 hours. Thus, the mice have been taking the maximum amount of drug can be tolerated, equivalent 620,25g medicine/kg mouse weight without any dead rats, therefore could not determine the lethal dose and lethal dose of fifty percent (LD50). Calculated according to folklore, the mice were drinking

more than 64.61 times the human dose (calculated extrapolation factor of 12 mice). Under the guidance of the World Health Organization and new drug research guide, using a folklore dose of Hoang Kinh is very safe.

- Sub-chronic toxicity: According to research results, using Hoang Kinh extract with dose equivalent to clinical dose and dose 3 times higher than the clinical dose does not affect liver and kidney function and do not alter the rabbit liver and kidney histopathology. Thus Hoang Kinh extract dose not poison in rabbits. According to the study of the chemical composition and pharmacological effects of Hoang Kinh, extracts from Hoang Kinh leaves have a protective effect on liver cells and anti-oxidant effect.

4.1.2. Analgesic, anti-inflammatory effects

- Analgesic effect: Hoang Kinh capsules have no analgesic effect that follows central mechanism but peripheral mechanism. Causing pain experiment with acetic acid is representative in evaluating analgesic peripheral mechanism. According to the study of the chemical composition of the Hoang Kinh leaves showed that major component of Hoang Kinh are flavonoids, these components have high antioxidant effects. Due to this effect, reduction of free radicals, oxidative cell membrane phospholipid layer and the release of several chemical mediators of inflammation lead to pain result. Some traditional herbal medicine studied in experimental research also showed the peripheral analgesic effect such as Radix Polygoni cuspidate, Zizoma Cibotii, Regimune capsule was extracted from root of Artocarpus tonkinensis A.Cheval.

- Anti-inflammatory effect: Hoang Kinh dose of 5.6g/kg body weight have anti-inflammatory effects 6 hours after causing edema by carragenin in white rat. Hoang Kinh doses of 9.6g and 28.8g/kg body weight have anti-inflammatory effects in models of mice with chronic granulomas inflammation, this effect is equivalent to methylprednisolone dose of 10mg/kg body weight. According to the study of the chemical composition of the Hoang Kinh leaves showed major component of Hoang Kinh leaves are essential oil, flavonoids, inositol, saponins and tannins... The natural flavonoids are considered to have the antioxidant, against radicals free of

oxygen - the root causes of many pathological processes in the body, including the process of inflammation, oxidized LDL. Therapeutic effect anti-inflammatory, analgesic of flavonoids extracted from Hoang Kinh may also closely linked to the characteristics of its antioxidant properties.

4.2. Discuss the results of clinical studies

4.2.1. Homogeneity between 2 groups

Two groups of patients have homogenous rate of age, gender, disease duration and severity of disease before treatment. This is an important criterion in controlled studies to ensure the objectivity of the research results.

4.2.2. Effective treatment according to modern medicine

4.2.2.1. Analgesic effect

After treatment the mean joint stiffness time, mean number of painful joints, mean score VAS1, VAS2, VAS3 and Ritchie's index of study group and control group have reduced statistically significant compared to before treatment ($p < 0.05$).

These studies show that the chemical composition of the main components Hoang Kinh leaves is Flavonoid - effective in reducing free radicals, oxidative cell membrane phospholipid layer and the release of several chemical mediators guide to inflammation and pain. Analgesic effect of the Hoang Kinh capsules has been demonstrated in experiments as causing cramping pain by acetic acid in mice.

4.2.2.2. Anti - inflammatory effect

After treatment the mean number of swollen joints, erythrocyte sedimentation rate and CRP levels of study group have a statistically significant reduction compared with prior treatment with $p < 0.05$. Anti-inflammatory effects in clinical practice is consistent with anti-inflammatory results in experimental acute and chronic. According to research by Chattopadhyay P and partner on Hoang Kinh leaves shows oil extracted from Hoang Kinh leaves has the effect of inhibiting COX - 1 and COX - 2. Clinical studies on Hoang Kinh showed it is effective in reducing knee circumference in patients with knee osteoarthritis and swollen knees with $p < 0.05$.

4.2.2.3 Reduction on disease activity

After treatment two groups had improved motor function according to HAQ than before treatment ($p < 0.05$). The degree of improvement of motor function HAQ proportional to the degree of pain and reduce swelling in clinical practice. With the results of research on analgesic and anti-inflammatory as well as in clinical experiments, the degree of improvement in HAQ index is a perfect fit. Table 3.39. shows the improvement rate of 20% and 50% according to the ACR of the treatment group is 75% and 11.11%, higher than in the control group improved by 20% ($p < 0.05$). Mold improving the ACR 20% is the threshold used to assess patient response to a drug or a treatment or not. Results of Table 3:40 shows the average level of improvement according to DAS 28 after the second treatment group had a statistically significant reduction compared with prior treatment with $p < 0.05$. DAS 28 average index before treatment was 4.06 ± 0.61 , after 0.81 ± 3.32 treatment.

4.2.3. Effective by heat-cold classification pattern in traditional medicine

Hoang Kinh is a new medicinal plant and has not been recorded in Vietnam Pharmacopoeia IV. To explore the heat-cold characteristics of Hoang Kinh, we divided into heat and cold pattern in traditional medicine and find correlations with modern medicine effective treatment. The study results showed that patients improved levels $\geq 20\%$ according to the Ritchie index, DAS 28 and HAQ in two patterns cold and heat of study group has no statistical significance. This result is consistent with material recorded on the "Commentaries" of Hoang Kinh. Perhaps research is needed on the number of patients with more and different diseases in order to assert more about traditional classification on heat – cold characteristics of this medicine .

4.2.4. Adverse side effects of Hoang Kinh

Over the 30 days study on 36 RA patients with Hoang Kinh capsules, we have not recorded any cases of adverse side effects in clinical practice. This result is consistent with research findings on experimental research: Acute toxicity and sub-chronic toxicity of Hoang Kinh were unidentified on experimental animals. However, in the control group 4.81% of patients with

epigastric pain expression and 11.11% of patients have a feeling of fullness due to undesirable effects of anti-inflammatory painkillers observed.

CONCLUSION

1. Acute toxicity (LD50) and sub-chronic toxicity of Hoang Kinh extract on experimental animals were unidentified. Hoang Kinh capsules have analgesic effect follow peripheral mechanism and anti-inflammatory effects on experimental animals.

- On white mice with dose of 620.25g/kg body weight, 64.61 times the maximum dose for human use but not determined LD50.

- Hoang Kinh with equivalent clinical dose (3.2g/kg body weight) and dose 3 times higher than clinical dose (9.6g/kg body weight) in 8 weeks have not changed the body mass weight, haematological and biochemical laboratory tests, and macroscopic and microscopic liver and kidney of rabbit compared to control group ($p > 0.05$).

- Hoang Kinh dose of 9,6g/kg body weight/day and 28,8g/kg body weight/day orally for 3 consecutive days shown analgesic effects evidently when studied by causing cramping pain method with acetic acid ($p < 0.05$).

- Hoang Kinh capsules have acute anti-inflammatory effects on model of edema caused by carrageenin on rat paw at the time of 6 hours and models caused ascites in white rats by carrageenin + formaldehyde ($p < 0.05$ compared to control group).

- Hoang Kinh capsules is effective against chronic inflammation: Drugs reduce particle granulomas weight in mice from 40.20% to 41.24% compared to control group ($p < 0.01$ to $p < 0.001$). This effect is equivalent to methylprednisolone 10 mg/kg.

2. Hoang Kinh capsules in combination with Methotrexate is effective in treating RA in moderate and mild clinically active phase.

- Mean joint stiffness time, mean number of painful joints, the index of VAS1, VAS2, VAS3 and Ritchie after treatment significantly improved compared to before treatment ($p < 0.05$). The degree of improvement in pain

and disease activity as assessed by the patient (VAS1, VAS2) was higher in the study group ($p < 0.05$).

- The mean number of swollen joints, ESR and CRP decreased significantly compared to before treatment ($p < 0.05$). Higher level of improvement compared to the control group ($p < 0.05$).

- Functions moving in HAQ, DAS 28, ACR 20 improved compared to before treatment ($p < 0.05$).

- Disease improvement effects according to Ritchie index, DAS 28, HAQ in the heat and cold pattern according to traditional medicine has no difference ($p > 0.05$).

- Adverse side effect of Hoang Kinh capsules was unidentified in clinical and subclinical researches in 30 days of treating RA patients.

RECOMMENDATIONS

Initial clinical studies show that Hoang Kinh capsules are convenient, safe and effective in treating RA patients. Therefore, research should be pursued with greater numbers of patients and with a longer period of time.

Methods of extracting the main active ingredient in the Hoang Kinh leaves and dispensing capsule method for extracting active ingredients to reduce the number of fine capsules in treatment are needed.