

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



ĐÀO THẾ ANH

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ THOÁI HÓA KHỚP GỐI  
CỦA CAO ĐẶC KNC TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



ĐÀO THẾ ANH

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ THOẢI HÓA KHỚP GỐI  
CỦA CAO ĐẶC KNC TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành Y học cổ truyền

Mã số: 872 0115

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. NGUYỄN DUY TUÂN
2. PGS. TS. ĐẬU XUÂN CẢNH

HÀ NỘI – 2020

## LỜI CẢM ƠN

*Hoàn thành luận văn này, với tất cả lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Đảng ủy, Ban Giám đốc, Phòng đào tạo Sau Đại học, các Bộ môn, Khoa phòng Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, là nơi trực tiếp đào tạo và tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn.*

*Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Duy Tuân và PGS.TS. Đậu Xuân Cảnh, người thầy hướng dẫn trực tiếp luôn theo sát, thường xuyên giúp đỡ, cho tôi nhiều ý kiến quý báu, sát thực trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn này.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc, Bộ môn Dược lý – Học viện Quân Y quan tâm, tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong việc nghiên cứu, thu thập, hoàn thiện số liệu để hoàn thành đề tài.*

*Tôi xin được gửi lời cảm ơn đến các thầy, các cô trong Hội đồng thông qua đề cương luận văn đã cho tôi nhiều ý kiến quý báu trong quá trình hoàn thiện luận văn này.*

*Tôi vô cùng biết ơn gia đình, bạn bè, anh chị em đồng đã động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.*

*Mặc dù đã cố gắng rất nhiều, nhưng luận văn không tránh khỏi những thiếu sót; tác giả rất mong nhận được sự thông cảm, chỉ dẫn, giúp đỡ và đóng góp ý kiến của các nhà khoa học, của quý thầy cô, các cán bộ quản lý và các bạn đồng nghiệp.*

*Xin chân thành cảm ơn!*

*Học viên*

*Đào Thế Anh*

## LỜI CAM ĐOAN

Luận văn này do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của Thầy TS.Nguyễn Duy Tuân và PGS.TS.Đậu Xuân Cảnh. 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. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

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

*Hà Nội, ngày.....tháng.....năm.....*

Người viết cam đoan

Đào Thế Anh

## CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Viết tắt</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Tiếng Việt</b>
AE		Đương quy
BCG	Bacillus Calmette–Guérin	Vắc xin phòng bệnh lao
CAMP	Cyclic adenosine monophosphate	AMP vòng – chất truyền tin thứ hai
BMP	Bone morphogenic proteins	Protein tạo hình thái xương
COX	Cylo-oxygenase	Enzyme đảm nhiệm chuyển arachidonic acid thành prostaglandin H2
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
FGF	Epidermal growth factor	Yếu tố tăng trưởng biểu bì
GAG	Glycosaminoglycan	
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1	Phân tử bám dính nội bào tế bào nội mô
IL	Interleukin	Cytokin miễn dịch
iNOS	Nitric oxide synthase	Oxit nitric cảm ứng
IGF-1	Insulin-like Growth Factor -1	Yếu tố tăng trưởng giống insulin
LPS	Lipopolysaccharide	Lipoglycan/nội độc tố
NSAID	Non-steroidal anti-inflamatoy drug	Thuốc chống viêm giảm đau non-steroids
MDA	Maleic dialdehyde	
MIA	Monosodiumiodoacetate	
MMP	Matrix Metalloproteinases	Các enzyme bị kích hoạt khi tiếp xúc với tia tử ngoại hoặc các vùng bị viêm
mRNA	Messenger axit ribonucleic	ARN thông tin
NO	Nitric acid	
PF	Patellofemoral	Khớp giữa xương bánh chè-xương đùi
PG	Prostaglandin	Acid béo không bão hòa ở các mô, có vai trò như một chất trung gian hóa học của quá trình viêm và đau

PMN	Polymorphonuclear	Tế bào đa hình
SE		Hoàng cầm râu
TF	Tibiofemoral	Khớp giữa xương chày-xương đùi
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoại tử u
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta	Yếu tố thay đổi tăng trưởng $\beta$
XPĐ		Xuất phát điểm

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT</b>	<b>VẤN</b>
<b>ĐỀ.....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Tổng quan về các mô hình thoái hóa khớp .....	3
1.1.1. Vai trò của mô hình in vitro và in vivo trong đánh giá các tổn thương của khớp .....	3
1.1.2. Mô hình động vật trong đánh giá các tổn thương khớp .....	4
1.1.3. Các mô hình thoái hóa khớp kinh điển.....	4
1.2. Tổng quan về thoái hóa khớp gối.....	14
1.2.1. Khái niệm.....	14
1.2.2. Phân loại .....	14
1.2.3. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của thoái hóa khớp gối .....	15
1.3. Tổng quan về bài thuốc KNC.....	16
1.3.1. Thành phần .....	16
1.3.2. Phân tích bài thuốc.....	17
1.3.3. Các nghiên cứu về KNC.....	20
<b>Chương 2 CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	<b>22</b>
2.1. Chất liệu nghiên cứu.....	22
2.2. Thuốc tham chiếu .....	23
2.3. Thời gian và địa điểm tiến hành nghiên cứu .....	23
2.4. Đối tượng nghiên cứu.....	23

2.5. Phương pháp nghiên cứu .....	24
2.5.1. Thiết kế nghiên cứu .....	24
2.5.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu .....	24
2.5.3. Công cụ và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu .....	24
2.5.4. Quy trình nghiên cứu .....	25
2.5.5. Phương pháp tiến hành .....	26
2.5.6. Phương pháp đánh giá kết quả.....	27
2.6. Phương pháp xử lý số liệu.....	28
<b>Chương 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>29</b>
3.1. Kết quả về tác dụng của cao đặc KNC lên sự thay đổi hình dáng của khớp gối, ngưỡng đau và phản ứng đau trên thực nghiệm.....	29
3.2. Kết quả về tác dụng của cao đặc KNC trên một số chất trung gian hóa học gây viêm và mô bệnh học khớp gối trên thực nghiệm .....	32
3.2.1. Sự thay đổi nồng độ cytokine tiền viêm ở các lô nghiên cứu .....	32
3.2.2. Tổn thương mô bệnh học khớp gối .....	36
<b>Chương 4 BÀN LUẬN .....</b>	<b>40</b>
4.1. Đánh giá tác dụng của cao đặc KNC lên sự thay đổi hình dáng của khớp gối, ngưỡng đau và phản ứng đau .....	40
4.2. Tác dụng của cao đặc KNC trên một số chất trung gian hóa học gây viêm và mô bệnh học khớp gối trên thực nghiệm .....	42
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>53</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>55</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	





## **DANH MỤC BẢNG**

Bảng 2.1. Thành phần cao đặc KNC.....	22
Bảng 3.1. Sự thay đổi khả năng chịu đựng trọng lượng của chân sau chuột sau 2 tuần và 4 tuần .....	29
Bảng 3.3. Sự thay đổi nồng độ PGE2 trong huyết thanh chuột.....	32
Bảng 3.4. Sự thay đổi nồng độ TNF- $\alpha$ trong huyết thanh chuột.....	33
Bảng 3.5. Sự thay đổi nồng độ IL-1 $\beta$ trong huyết thanh chuột .....	34
Bảng 3.6. Sự thay đổi nồng độ IL-6 trong huyết thanh chuột .....	35
Bảng 3.7. Điểm đánh giá tổn thương mô bệnh học sụn xương khớp .....	37
Bảng 3.8. Điểm đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa.....	38

## **DANH MỤC SƠ ĐỒ**

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu .....	25
-----------------------------------	----

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Thay đổi mô bệnh học của sụn khớp trong mô hình gây thoái hóa khớp gối bằng iodoacetate 1mg .....	5
Hình 1.2. Thay đổi mô bệnh học của sụn khớp trong mô hình gây thoái hóa khớp gối bằng iodoacetate 0,2mg .....	6
Hình 1.3. Tổn thương khớp sau cắt sụn khớp và dây chằng.....	7
Hình 1.4. Hình ảnh mô bệnh học của tổn thương khớp trong mô hình nhuộm Toluidine blue .....	7
Hình 1.5. Phẫu thuật cắt ngắn dây chằng.....	9
Hình 1.6. Hình ảnh tổn thương trên Xquang và cắt lớp vi tính .....	9
Hình 1.7. Hình ảnh xương bánh chè sau gây mô hình.....	10
Hình 1.8. Đặc điểm mô học xương bánh chè sau phẫu thuật (nhuộm HE) ....	11
Hình 1.9. Đặc điểm mô học xương bánh chè sau phẫu thuật và chịu trọng tải tại khớp (nhuộm Safranin O) .....	13
Hình 2.1. Minh họa vị trí tiêm khớp gối .....	26
Hình 3.1. Hình ảnh mô bệnh học khớp gối ở các lô chuột nghiên cứu .....	36

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Thoái hóa khớp gối là bệnh lý tổn thương của toàn bộ các thành phần của một khớp như sụn, xương dưới sụn, dây chằng, màng hoạt dịch, cơ cạnh khớp, trong đó tổn thương sụn là chủ yếu [16]. Đây là một bệnh khớp rất thường gặp ở người cao tuổi và ở mọi quốc gia trên thế giới. Tổ chức y tế thế giới ước tính khoảng 25% người già trên 65 tuổi bị đau khớp và tàn phế do mắc bệnh thoái hóa khớp gối [66]. Năm 2005, ở Mỹ có 27 triệu người tương đương với hơn 10% dân số của Mỹ mắc bệnh thoái hóa khớp và đến năm 2009, thoái hóa khớp đứng hàng thứ 4 khiến cho người bệnh phải nhập viện điều trị. Thoái hóa khớp là nguyên nhân đứng đầu trong việc phải phẫu thuật thay khớp: 905.000 trường hợp thay khớp háng và gối đã được thực hiện trong năm 2009 với chi phí rất cao 24,3 tỷ đô la Mỹ [57]. Thoái hóa khớp gối là nguyên nhân gây tàn tật cho người có tuổi đứng thứ hai sau bệnh tim mạch [34]. Với tuổi thọ trung bình ngày càng cao và sự gia tăng béo phì trong dân số nói chung, tỷ lệ mắc thoái hóa khớp gối ngày càng tăng ảnh hưởng đáng kể đến chất lượng sống và nền kinh tế xã hội.

Chẩn đoán thoái hóa khớp gối khá đơn giản, thường chỉ dựa vào các triệu chứng lâm sàng và chụp Xquang khớp gối thường quy là có thể chẩn đoán xác định và chẩn đoán giai đoạn bệnh. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy có sự không tương xứng giữa các triệu chứng lâm sàng và tổn thương phát hiện được trên Xquang. Hơn nữa, tổn thương trên Xquang thường phát hiện được ở giai đoạn khá muộn [45].

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển và tiến bộ không ngừng của khoa học kỹ thuật nói chung và khoa học kỹ thuật trong chuyên ngành chẩn đoán hình ảnh, các phương pháp chẩn đoán hình ảnh, đặc biệt là siêu âm và cộng hưởng từ cũng đã góp phần vào chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh thoái hóa khớp gối [58]. Cho đến nay, việc điều trị bệnh rất tốn kém

cho cá nhân người bệnh và cả xã hội trong khi hiệu quả điều trị nhiều khi chưa đạt được mong muốn. Các biện pháp nội khoa và ngoại khoa điều trị thoái hóa khớp gối chủ yếu nhằm điều trị triệu chứng bệnh và chưa đạt được tới đích cải thiện được chất lượng sụn khớp, thậm chí chưa thể làm ngừng quá trình thoái hóa.

Xu hướng tìm kiếm các thuốc mới, đặc biệt là các nguồn gốc thảo dược trong điều trị vì vậy đang nhận được sự quan tâm lớn do tính an toàn và cơ chế tác dụng đa dạng, đa mục tiêu. Một trong số đó phải kể đến những bài thuốc nghiệm phương được sử dụng nhiều năm tại các Bệnh viện y học cổ truyền.

“KNC” là bài thuốc kinh nghiệm của Phó giáo sư, tiến sỹ Đậu Xuân Cảnh dựa trên nền tảng cơ sở là bài “Độc hoạt tang kí sinh” gia giảm có tác dụng tốt trong điều trị các chứng đau cơ xương khớp trên lâm sàng [18], được sử dụng tại Bệnh viện Tuệ Tĩnh có kết quả tốt. Thuốc đã được thử độc tính cấp và bán trường diễn chứng minh an toàn trên động vật thực nghiệm và có tác dụng trên mô hình chống viêm giảm đau in vivo. Do đó, với mong muốn tìm hiểu tác dụng chống chống thoái hóa khớp gối của thuốc dưới dạng cao đặc, làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp sau, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài **“Nghiên cứu tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của cao đặc KNC trên động vật thực nghiệm”** với 2 mục tiêu sau:

*1. Đánh giá tác dụng của cao đặc KNC lên sự thay đổi hình dáng của khớp gối, ngưỡng đau và phản ứng đau trên thực nghiệm.*

*2. Đánh giá tác động của cao đặc KNC trên một số chất trung gian hóa học gây viêm và mô bệnh học khớp gối trên thực nghiệm.*

## **Chương 1**

### **TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

#### **1.1. Tổng quan về các mô hình thoái hóa khớp**

##### **1.1.1. Vai trò của mô hình in vitro và in vivo trong đánh giá các tổn thương của khớp**

###### **1.1.1.1. Mô hình in vitro**

- Mô hình giải thích được nhiều vấn đề quan trọng liên quan đến sự biệt hóa và chức năng sụn khớp.

- Được sử dụng để xác định sự tương tác giữa tế bào với chất nền [81].

###### **1.1.1.2. Mô hình in vivo**

- Khám phá ra sự tăng trưởng và biệt hóa của tế bào trong vi môi trường sụn-khớp [46].

- Đánh giá được tính an toàn cục bộ và hệ thống.

- Đánh giá được sự ổn định chức năng của tế bào, sự biểu hiện marker và đặc tính cơ học của sụn khớp mới.

- Đánh giá được ảnh hưởng lâu dài của sự tái thiết lập mô trong và quanh vùng tổn thương/vùng được điều trị [47].

###### **1.1.1.3. Tính ứng dụng**

Hầu hết các tiến bộ y học của thế kỷ trước bắt đầu với nghiên cứu ở động vật [51]. Thực tế cho thấy, có khá nhiều điểm tương đồng trong cấu trúc sụn khớp giữa động vật (cừu, lợn) và người [59]. Động vật đồng thời cũng cho chỉ số an toàn tốt. Điều này có tác động qua lại bởi khi tiến hành nghiên cứu trước trên động vật sẽ hỗ trợ cho nghiên cứu trên người và đồng thời, nghiên cứu trên người cũng phải được hỗ trợ bằng các nghiên cứu trên động vật [19].

## **1.1.2. Mô hình động vật trong đánh giá các tổn thương khớp**

### **1.1.2.1. Mô hình động vật sẵn có**

- Loài gặm nhấm (chuột)
- Động vật nhai lại (cừu, dê)
- Thỏ
- Lợn
- Ngựa
- Linh trưởng [72].

### **1.1.2.2. Các tiêu chí trong chọn lựa mô hình động vật**

- Đặc tính cấu tạo
- Tốc độ sinh sản cao
- Tuổi thọ trung bình ngắn
- Di truyền tương đương với con người [19]

## **1.1.3. Các mô hình thoái hóa khớp kinh điển**

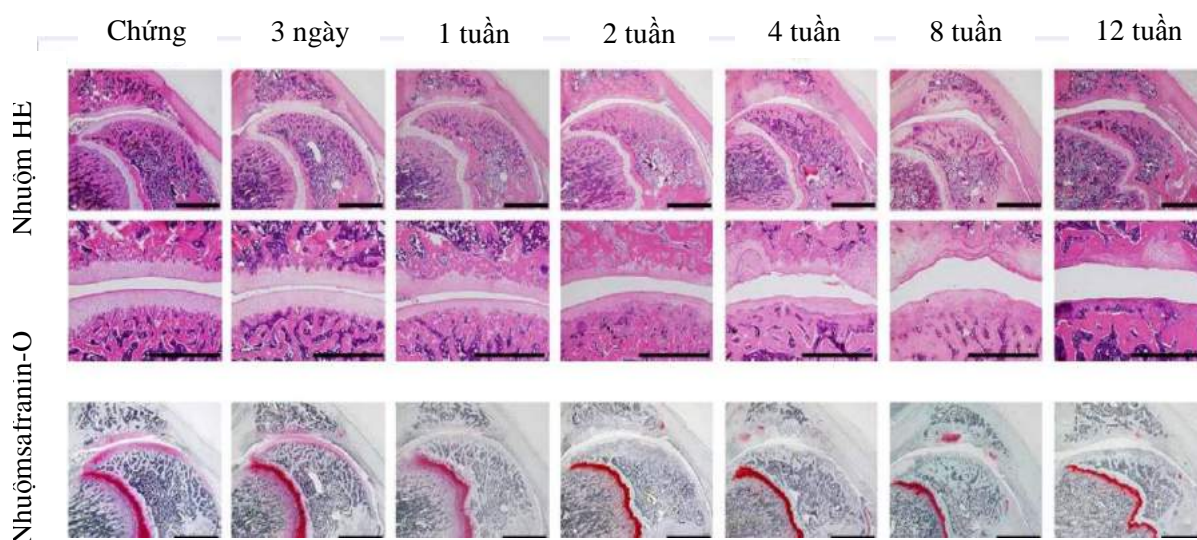
### **1.1.3.1. Mô hình tiêm monosodium iodoacetate vào khớp xương bánh chè**

Viêm xương khớp được gây ra thông qua một mũi tiêm iodoacetate ở khớp gối. Động vật (chuột) được chia thành hai nhóm thí nghiệm dựa trên liều iodoacetate đơn chất: 0,2 mg và 1 mg. Những thay đổi về mô bệnh học ở sụn khớp và gân xương bánh chè được kiểm tra sau 3 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 4 tuần, 8 tuần và 12 tuần sau khi tiêm iodoacetate [67].

Trong nhóm 1 mg, các kết quả giải phẫu mô bệnh học đại diện của tình trạng thoái hóa khớp đã được quan sát thấy trong phần sụn khớp của gân xương bánh chè theo thời gian. Tình trạng viêm màng hoạt dịch trong cả hai nhóm cao nhất ở thời điểm 3 ngày sau tiêm và giảm dần theo thời gian.

Ở chuột, mô hình monosodium iodoacetate (MIA) được thiết lập tốt, và viêm khớp phản ứng giống như viêm khớp thoái hóa ở người về mặt mô học và các hành vi liên quan đến đau [32],[50]. MIA là một chất ức chế chuyển

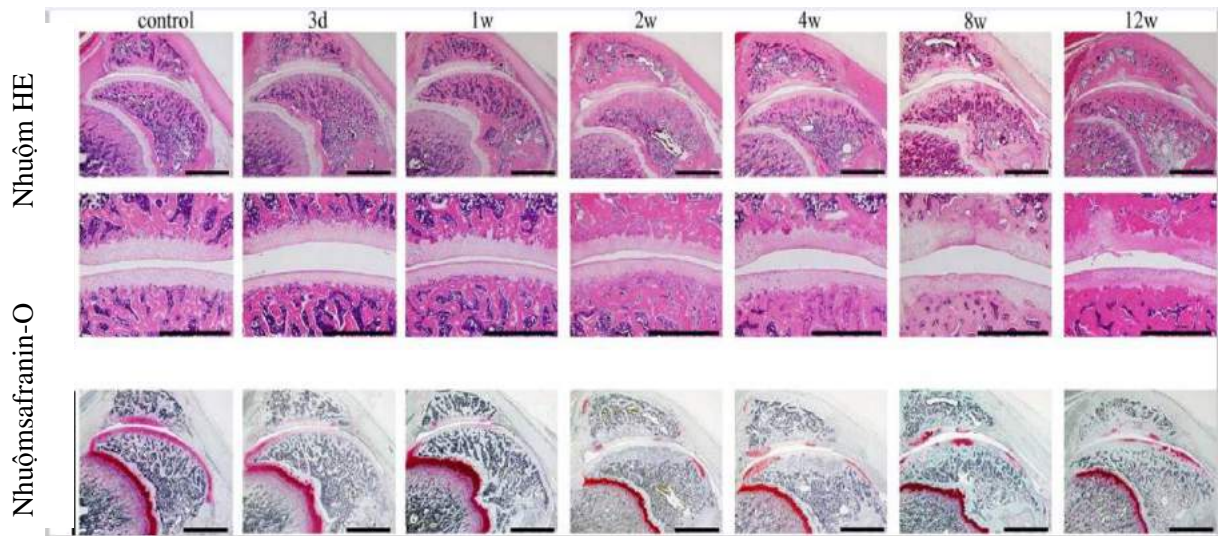
hóa phá vỡ con đường glycolysis hiếu khí của tế bào, do đó, gây chết tế bào bằng cách ức chế hoạt động của glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase trong chondrocytes [52]. MIA tiêm nội khớp dẫn đến giảm số lượng tế bào sụn và dẫn đến các thay đổi về mô học và hình thái khớp, tương tự như những thay đổi trong viêm khớp ở người [32]. Ngoài những thay đổi mô bệnh học ở sụn khớp, tiêm MIA nội khớp gây ra những thay đổi mô bệnh học ở màng hoạt dịch. Đây có thể được coi là mô hình lý tưởng đánh giá thoái hóa và viêm khớp gối [71].



**Hình 1.1. Thay đổi mô bệnh học của sụn khớp trong mô hình gây thoái hóa khớp gối bằng iodoacetate 1mg [67]**

Chứng      3 ngày      1 tuần      2 tuần      4 tuần      8 tuần      12 tuần

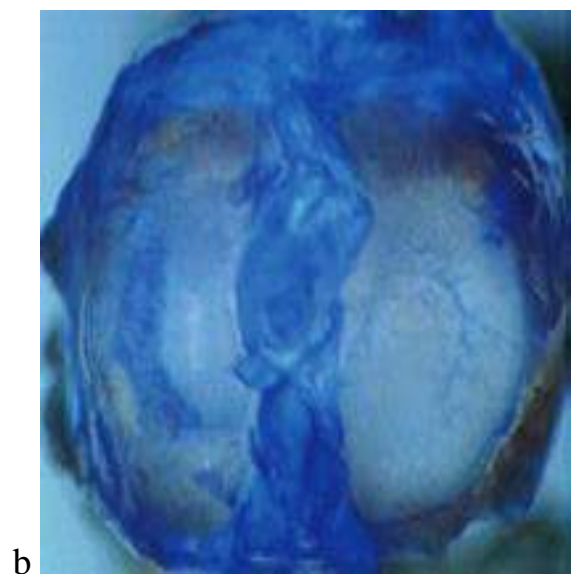
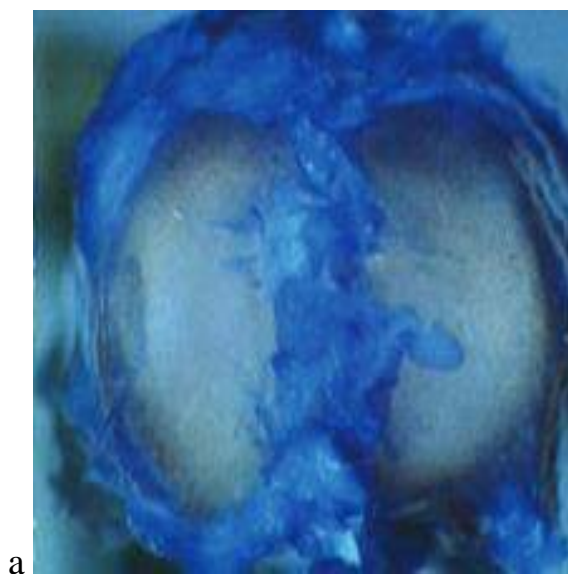




**Hình 1.2. Thay đổi mô bệnh học của sụn khớp trong mô hình gây thoái hóa khớp gối bằng iodoacetate 0,2mg [67]**

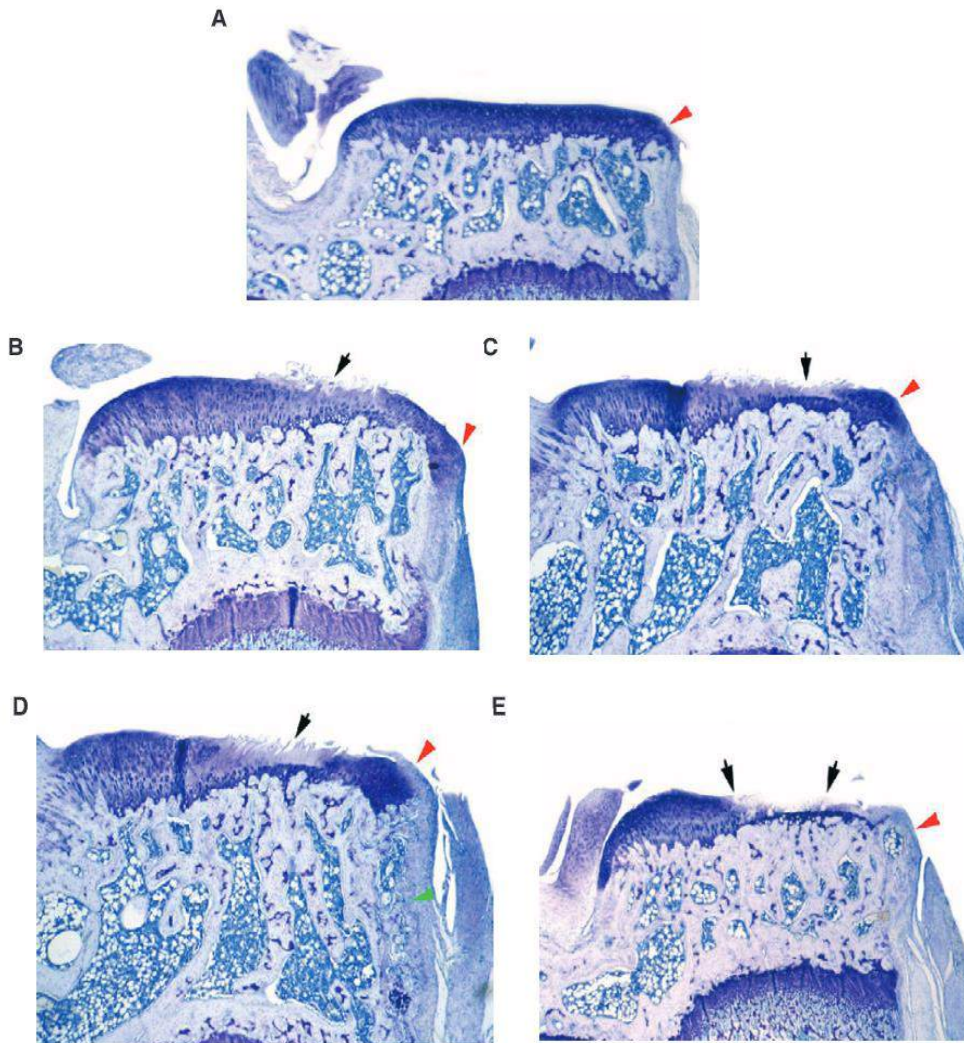
### **1.1.3.2. Mô hình phẫu thuật cắt bỏ sụn khớp**

Chuột được gây mê bằng isoflurane, cạo sạch lông vùng khớp gối để chuẩn bị cho phẫu thuật. Tiến hành cắt bỏ dây chằng và sụn khớp. Sau 1, 2, 3 hoặc 6 tuần, giết chuột, đồng thời cắt rời phần đầu gối và xương chày, nhuộm bằng dung dịch 0,125% Evan's Blue trong nước muối sinh lý. Khớp gối sau đó được cố định trong dung dịch formalin 10% trong 48 giờ trước khi lấy tiêu bản đọc kết quả [25],[63].



### Hình 1.3. Tổn thương khớp sau cắt sụn khớp và dây chằng [25]

a. Nhóm không phẫu thuật; b. Nhóm phẫu thuật cắt sụn khớp sau 3 tuần



### Hình 1.4. Hình ảnh mô bệnh học của tổn thương khớp trong mô hình nhuộm Toluidine blue [25]

a. 6 tuần sau khi cắt dây chằng nhưng không cắt sụn khớp, chỉ xuất hiện mất protein tối thiểu

b. 1 tuần sau khi cắt dây chằng, cắt sụn khớp, có sự tái tạo sụn mới (mũi tên đen) và sự tăng sinh sớm sụn ở vùng cận biên (mũi tên đỏ)

c. 2 tuần sau khi cắt dây chằng, cắt sụn khớp, có hiện tượng chảy máu kéo dài trên 2/3 bề mặt của sụn khớp và 1/3 ngoài có chảy máu nghiêm trọng (mũi tên đen); xuất hiện tình trạng loãng xương (mũi tên đỏ)

d. 3 tuần sau khi cắt dây chằng, cắt sụn khớp, có sự thoái hóa sụn rõ rệt ở 1/3 ngoài (mũi tên đỏ)

e. 6 tuần sau khi cắt dây chằng, sụn khớp, thoái hóa sụn nghiêm trọng được quan sát thấy ở phần ngoài của xương chày (mũi tên đen) và loãng xương rõ rệt (mũi tên đỏ) kết hợp dày màng đáy.

### **1.1.3.3. Phẫu thuật rút ngắn dây chằng xương bánh chè**

#### **Phẫu thuật rút ngắn dây chằng xương bánh chè**

- Chuột được gây mê bằng cách tiêm pentobarbital trong phúc mạc và thực hiện phẫu thuật đầu gối (phẫu thuật cắt ngắn dây chằng hoặc không).

- Dự phòng bằng kháng sinh với penicillin (150 IU/kg) được dùng trước và **sau** 3 ngày phẫu thuật.

- Cạo sạch lông vùng da phẫu thuật và sát trùng.

- Rạch một đường 1 cm từ xương bánh chè đến ống xương chày; sau đó dây chằng xương bánh chè được tách ra.

- Một sợi dây Kirschner có chiều dài 7 mm và đường kính 2 mm được sử dụng với chỉ khâu nylon cỡ 1-0 được đặt trên rãnh (khoảng giữa 1 mm ở hai đầu) và được chèn dưới gân bánh chè từ trung gian đến vùng bên, khâu chéo ở đầu tận cùng của gân xương bánh chè.

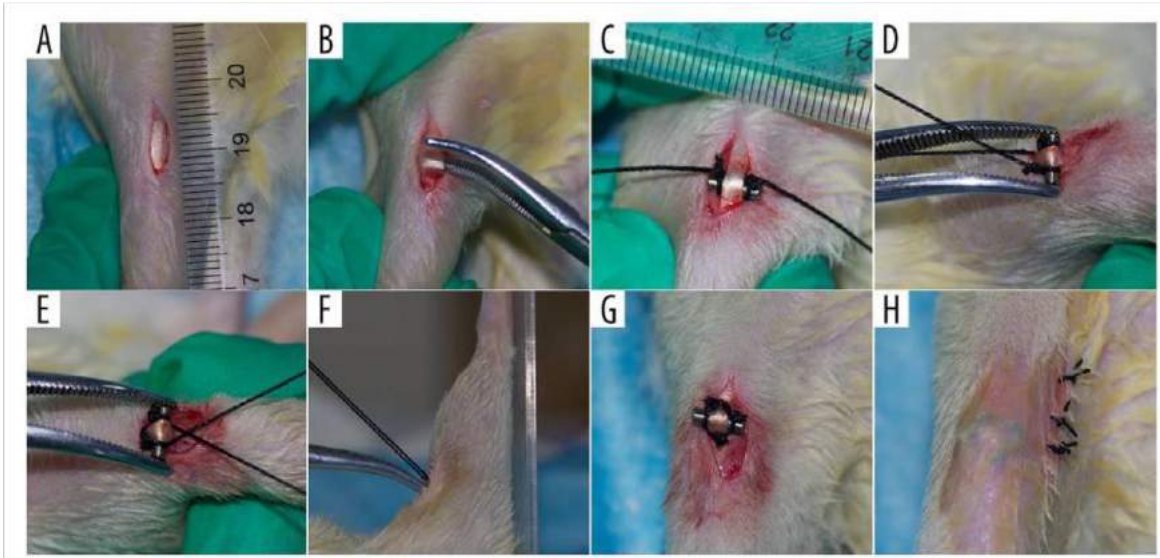
- Chỉ khâu sau đó được đưa vào dưới cả hai rãnh và dây chằng xương bánh chè được thắt chặt với đầu gối ở vị trí mở rộng tối đa.

- Cuối cùng, đóng da bằng chỉ khâu nylon 3-0 [28],[70].

#### **Phẫu thuật không rút ngắn dây chằng xương bánh chè**

Trong nhóm chuột này, dây chằng xương bánh chè vẫn còn nguyên và chỉ có một vết rạch da được thực hiện [42].

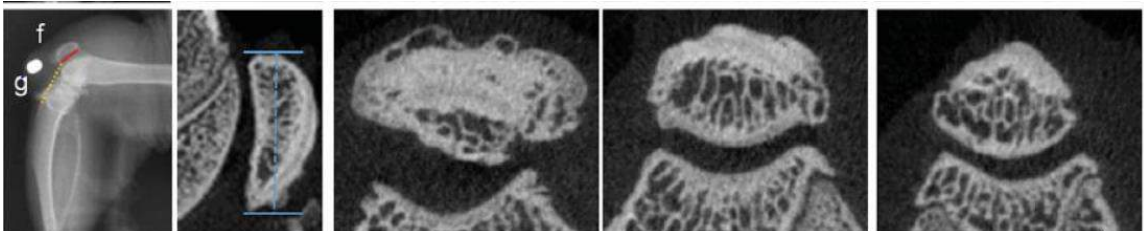




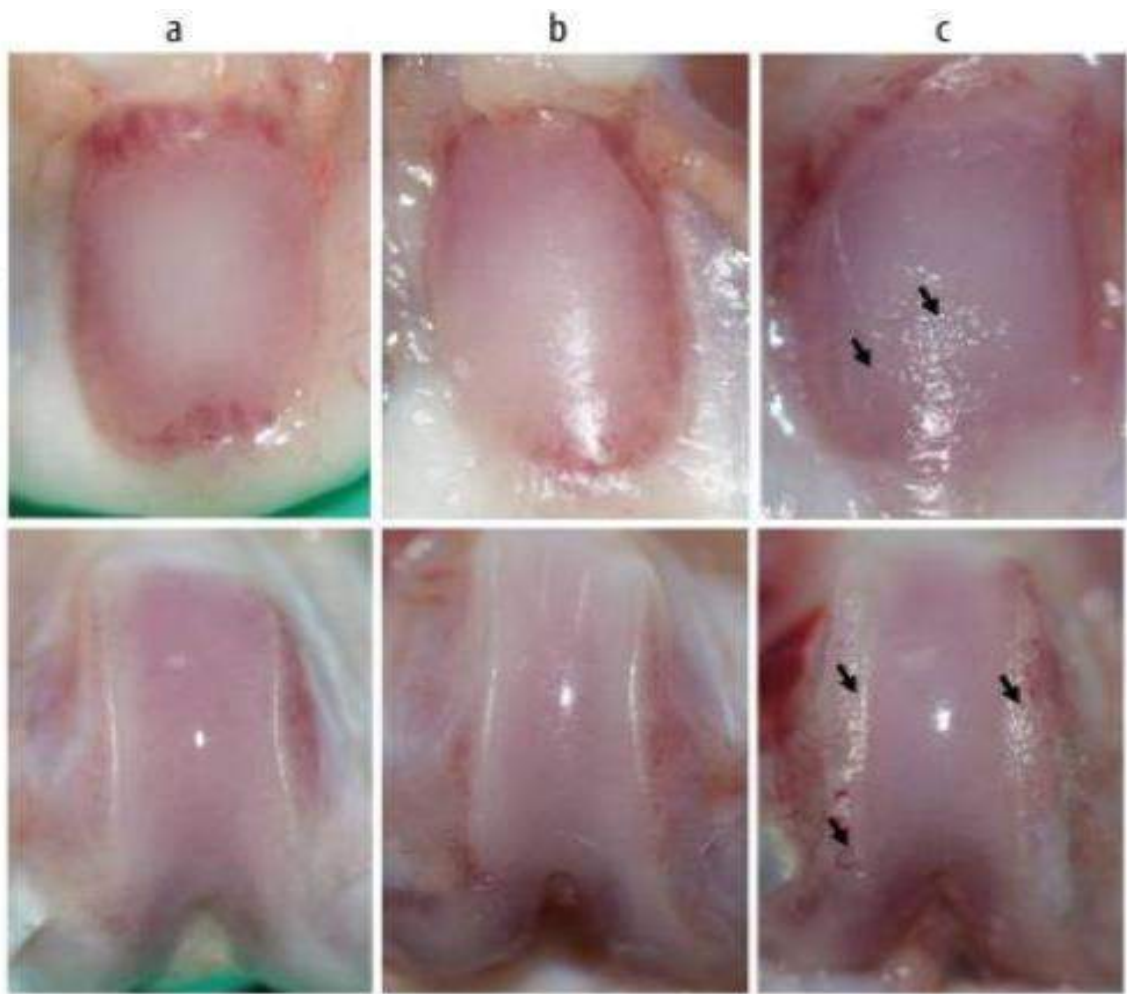
**Hình 1.5. Phẫu thuật cắt ngắn dây chằng [27]**

- a. Đường rạch dài 1 cm
- b. Tách gân xương bánh chè
- c. Dây Kirschner, dài 7 mm và đường kính 2 mm, có rãnh với chỉ khâu nylon 1-0 ở cả hai đầu ở khoảng cách 1 mm, được chèn dưới gân bánh chè từ giữa đến bên.
- d. Các đường khâu chéo nhau ở đầu tận cùng của gân bánh chè
- e đến g. Chỉ khâu được thông qua cả hai rãnh và dây chằng ở dây chằng xương bánh chè được thắt chặt với đầu gói ở vị trí mở rộng tối đa.
- h. Đóng da bằng chỉ khâu nylon 3-0.

Sau 10 tuần, tiến hành chụp Xquang và cắt lớp vi tính đánh giá tổn thương [38].



**Hình 1.6. Hình ảnh tổn thương trên Xquang và cắt lớp vi tính [27]**

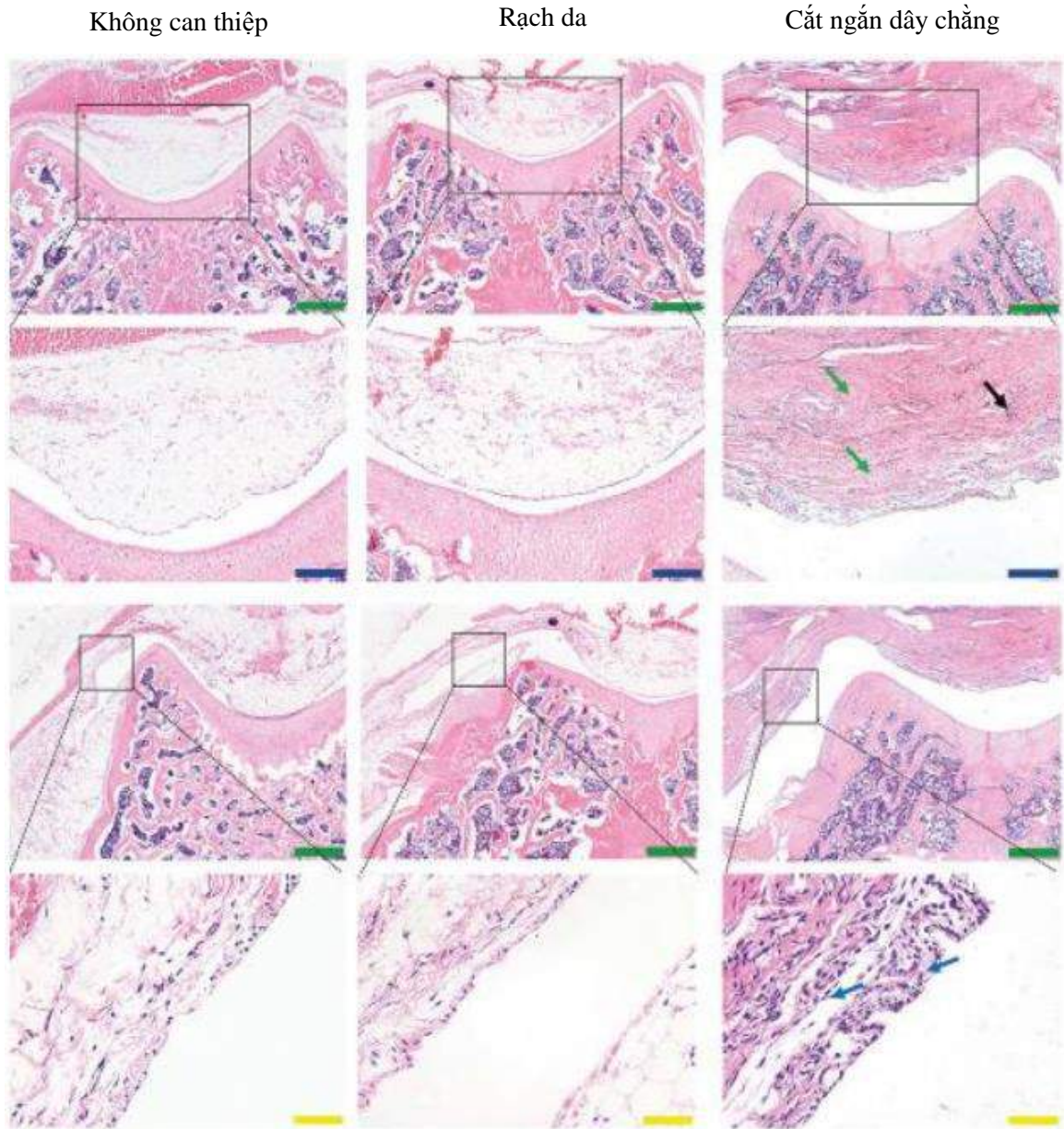


**Hình 1.7. Hình ảnh xương bánh chè sau gây mô hình [27]**

*a. Nhóm không can thiệp*

*b. Nhóm được phẫu thuật nhưng không cắt đứt dây chằng xương bánh chè*

*c. Nhóm phẫu thuật cắt đứt dây chằng xương bánh chè.*



**Hình 1.8. Đặc điểm mô học xương bánh chè sau phẫu thuật (nhuộm HE)**

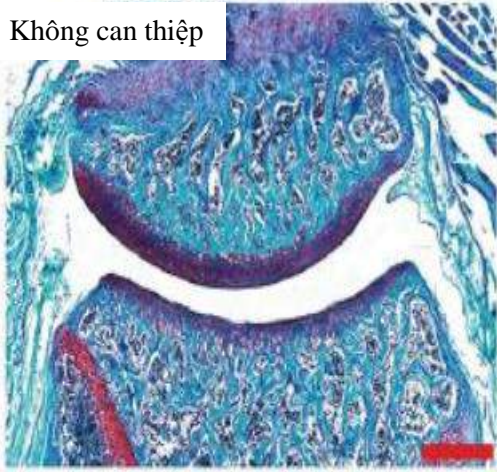
[27]

*Mũi tên xanh: thay đổi cấu trúc, xuất hiện tế bào viêm*

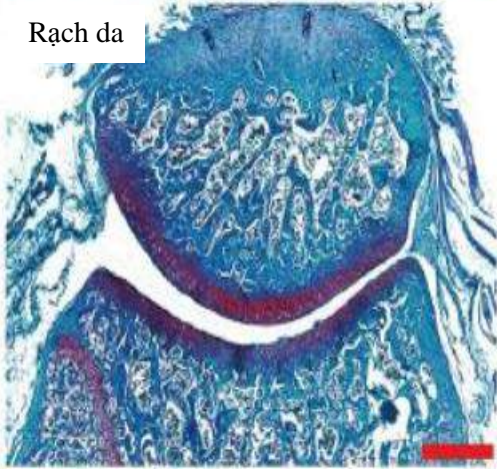
*Mũi tên đen: Thoái hóa sụn kèm xơ hóa*



Không can thiệp



Rạch da



Cắt đứt dây chằng





**Hình 1.9. Đặc điểm mô học xương bánh chè sau phẫu thuật và chịu trọng tải tại khớp (nhuộm Safranin O) [27]**

*a. Khu vực bên cạnh vùng chịu tải trọng*

*b. Khu vực trung tâm vùng chịu tải trọng*



*c. Khu vực không chịu tải trọng*

*Mũi tên đen = bắt thuốc màu Safranin O giảm*

*Mũi tên đỏ = vết nứt ngang, thể hiện sự bất thường trên bề mặt sụn*

*Mũi tên đen = sưng và phì đại sụn khớp, tăng sinh mô sợi*

*Mũi tên vàng = xuất hiện các chondrocyte*

## **1.2. Tổng quan về thoái hóa khớp gối**

### **1.2.1. Khái niệm**

Trước kia, thoái hoá 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 [65].

### **1.2.2. Phân loại**

#### **1.2.2.1. Thoái hoá khớp nguyên phát**

- Sự lão hoá: là nguyên nhân chính của thoái hóa khớp ở những người trên 50 tuổi. Cùng với sự thay đổi tuổi tác, sự thích ứng của sụn khớp với các tác nhân tác động lên khớp ngày càng giảm, dẫn đến sự huỷ hoại sụn khớp.

- Yếu tố di truyền: những yếu tố như hàm lượng collagen và khả năng tổng hợp proteoglycan của sụn được mang tính di truyền.

#### **1.2.2.2. Thoái hoá khớp thứ phát**

- Sau chấn thương: Gãy xương gây lệch trục, can lệch, các vi chấn thương liên tiếp do nghề nghiệp. Các tổn thương này dẫn đến rối loạn phân bố lực và tổn thương sụn khớp sớm.

- Sau các bệnh lý xương sụn: Hoại tử xương, hoại tử sụn do viêm, viêm khớp dạng thấp, bệnh gút, ...

- Sau các bệnh lý khác: bệnh nội tiết (đái tháo đường, to viển cực, cường giáp trạng, cường cận giáp trạng...), rối loạn đông máu (bệnh Hemophilie) [16].

### **1.2.3. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của thoái hóa khớp gối**

Cho đến nay nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của thoái hóa khớp vẫn còn có những vấn đề đang được tranh luận. Tuy nhiên, có nhiều ý kiến cho rằng, vấn đề tuổi tác và tình trạng chịu áp lực quá tải kéo dài là những yếu tố liên quan chặt chẽ đến tình trạng thoái hoá khớp. Nhiều cơ chế dẫn tới sự phá hủy sụn khớp trong bệnh thoái hóa khớp còn chưa được giải thích rõ. Tổn thương chủ yếu của thoái hóa khớp là phá hủy sụn khớp, tái cấu trúc xương dưới sụn và viêm màng hoạt dịch.

Mặc dù nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của các quá trình này còn chưa được biết rõ nhưng các phân tử gây viêm được xuất tiết ra như các cytokine tiền viêm đã thể hiện rõ vai trò trong cơ chế bệnh sinh thoái hóa khớp. Trong đó, Interleukin 1 (IL-1) và yếu tố hoại tử u (TNF  $\alpha$ ) có vai trò quan trọng trong quá trình thoái biến cấu trúc sụn và đã trở thành mục tiêu của nhiều liệu pháp điều trị. Interleukin - 1 gây ra quá trình dị hoá trong thoái hóa khớp và là yếu tố chính gây phá huỷ sụn khớp do nó ức chế sự tổng hợp các thành phần của chất căn bản như collagen, proteoglycan của tế bào sụn và thúc đẩy quá trình thoái hoá proteoglycan của chất cơ bản sụn, trong khi đó TNF $\alpha$  gây quá trình viêm [21],[26]. Thực tế các cytokine này làm giảm tổng hợp chất ức chế MMPs và tăng đáng kể sự tổng hợp MMPs. Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Ngọc Châu (2012) cho thấy nồng độ IL-1 và TNF  $\alpha$  ở bệnh nhân thoái hóa khớp gối tăng cao hơn người bình thường [10].

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu hiện nay đã chỉ ra rằng các gốc tự do tham gia quá trình dị hóa sụn. NO có vai trò thúc đẩy interleukin - 1 $\beta$  gây thoái hóa khớp chủ yếu bằng cách ức chế tổng hợp các chất căn bản, sợi collagen và

tăng hoạt tính của MMPs. Hơn nữa NO còn làm tăng tổng hợp các yếu tố gây viêm (PGE2) gây chết tế bào sụn theo chương trình [11].

Như vậy, tổn thương khớp trong thoái hóa khớp là tập hợp của nhiều tổn thương trong đó tổn thương chính ở sụn khớp với sự tham gia của nhiều yếu tố như quá tải khớp, vi chấn thương, ...và các chất trung gian hóa học gây viêm như IL-1, TNF  $\alpha$ , IL-17, IL-18, ... [44]. Các cytokin như IL-10 và IL-1 ra có vai trò ức chế sản xuất cũng như hoạt tính của các cytokin tiền viêm trong khi các cytokin khác như IL-4, IL-6 điều hòa quá trình này [31]. Các yếu tố tăng trưởng IGF-1, TGF- $\beta$ , FGF và BMPs tham gia vào quá trình tổng hợp chất căn bản của sụn [1],[24].

### 1.3. Tổng quan về bài thuốc KNC

#### 1.3.1. Thành phần

Tên vị thuốc	Tên khoa học [8]
Độc hoạt	<i>Radix Angelicae pubescentis</i>
Phòng phong	<i>Radix Saposhnikoviae divaricatae</i>
Tần giao	<i>Radix Gentianae macrophyllae</i>
Tang kí sinh	<i>Herba Loranthis gracilifolii</i>
Ngưu tất	<i>Radix Achyranthis bidentatae</i>
Bạch thược	<i>Radix Paeoniae lactiflorae</i>
Thục địa	<i>Radix Rehmanniae glutinodea praeparata</i>
Khương hoạt	<i>Rhizoma et Radix Notopterygii</i>
Tế tân	<i>Radix et Rhizoma Asari</i>
Đảng sâm	<i>Radix Codonopsis</i>
Đương quy	<i>Radix Angeliace sinensis</i>
Xuyên khung	<i>Rhizoma Ligustici wallichii</i>
Đỗ trọng	<i>Cortex Eucommiae</i>
Cam thảo	<i>Radix Glycyrrhizae</i>

Các vị thuốc được sử dụng trong nghiên cứu được bào chế theo đúng tiêu chuẩn Dược điển V và tiêu chuẩn cơ sở.

### **1.3.2. Phân tích bài thuốc**

#### **1.3.2.1. Theo dược lý học hiện đại**

Độc hoạt có tác dụng giảm đau, an thần và kháng viêm rõ rệt. Thuốc có thành phần chống loét dạ dày. Đối với hội tràng thở, thuốc có tác dụng co thắt [17].

Tần giao có tác dụng kháng viêm rõ rệt, do thành phần Gentianine A tác động lên hệ thần kinh làm hưng phấn chức năng tuyến yên - vỏ thượng thận. Thuốc còn có tác dụng an thần, giảm đau, giải nhiệt, kháng histamin, chống choáng do dị ứng [3].

Ngưu tất có tác dụng thúc đẩy quá trình tổng hợp protein.

Glucosit Bạch thược ức chế trung khu thần kinh nên có tác dụng an thần, giảm đau, ức chế cơ trơn của tử cung và dạ dày, ruột, ức chế tiết vị toan phòng được loét ở chuột cống thực nghiệm, chống viêm và hạ nhiệt, có tác dụng bảo vệ gan, làm hạ men Transaminaza [15].

Thực địa có tác dụng kháng viêm. Đối với chuột cống, thực nghiệm gây sưng tấy bằng Formalin vùng chân đùi, thuốc làm giảm sưng rõ; không ảnh hưởng đến đường huyết bình thường của thở, cường tim, hạ áp, cầm máu, bảo vệ gan, lợi tiểu, chống chất phóng xạ, chống nấm. Thuốc có tác dụng ức chế miễn dịch kiểu corticoid nhưng không làm ức chế hoặc teo vỏ thượng thận [8].

Thực nghiệm trên súc vật cũng chứng minh Đảng sâm có tác dụng trên cả hai mặt hưng phấn và ức chế của vỏ não đồng thời làm tăng khả năng miễn dịch của cơ thể [20].

Đương quy có tác dụng làm dẫn huyết quản ngoại vi, làm dịu cơ thắt cơ trơn của huyết quản ngoại vi, tăng lưu lượng máu; vì thế mà Đương quy có tác dụng giảm đau [17].

Đỗ trọng có tác dụng chống viêm, tăng cường chức năng vỏ tuyến thượng thận, tác dụng hưng phấn hệ thống tuyến yên, vỏ tuyến thượng thận, an thần giảm đau (trần kinh, trần thông), tăng tính miễn dịch của cơ thể [8].

Cam thảo có tác dụng gần giống corticoid, kháng khuẩn [17].

Như vậy, bài thuốc KNC là sự tổng hợp của 14 vị thuốc đều có tác dụng chống viêm, giảm đau đã được chứng minh trên thực nghiệm.

### **1.3.2.2. Theo phối ngũ lập phương y học cổ truyền**

Độc hoạt, Tang ký sinh khu phong trừ thấp, dưỡng huyết hòa vinh, hoạt lạc thông tý làm chủ dược; Ngưu tất, Đỗ trọng, Thục địa bổ ích can thận, cường gân tráng cốt; Xuyên khung, Đương quy, bổ huyết, hoạt huyết; Đảng sâm, Cam thảo ích khí kiện tỳ, đều có tác dụng trợ lực trừ phong thấp; Tần giao, Phòng phong phát tán phong hàn thấp. Các vị thuốc hợp lại thành một bài thuốc có tác dụng vừa trị tiêu bản, vừa phù chính khu tà [14].

### **1.3.2.3. Theo tính vị quy kinh**

Độc hoạt vị cay, đắng, ôn, quy kinh Can, Thận, Bàng quang có tác dụng trừ phong thấp chỉ thống, giải biểu. Chủ trị chứng phong thấp tý thống, thiếu âm đầu thống, phong hàn biểu chứng chiêm thấp [2].

Phòng phong vị cay ngọt, tính ấm, quy kinh Bàng Quang, Can, có tác dụng tán hàn giải biểu, trừ phong thấp, giải kinh phong [17].

Tần giao vị đắng cay, hơi hàn, qui kinh Vị Can Đờm, có tác dụng trừ phong thấp thư gân hoạt lạc, thanh hư nhiệt, trị các chứng phong thấp tý thống, cốt chung triều nhiệt [3].

Tang ký sinh vị đắng tính bình quy kinh Can Thận, có tác dụng chữa đau xương khớp, đau dây thần kinh ngoại biên, đau lưng ở người già [4].

Ngưu tất đắng, chua, bình, quy kinh Can Thận, có tác dụng hoạt huyết khu ú, bổ can thận dưỡng gân cốt, lợi niệu thông lâm, làm sứ dược dẫn huyết và hỏa xuống phần dưới cơ thể, chủ trị các chứng lưng gối nhức mỏi [13].

Bạch thược vị đắng, chua, hơi hàn, quy kinh Can Tỳ, có tác dụng dưỡng huyết, liễm âm, hòa can chỉ thống, chủ trị các chứng can huyết hư, cơ thể hư nhược, nhiều mồ hôi, các chứng âm huyết hư, can dương thịnh, can phong động, các chứng đau do bệnh của can [15].

Thục địa ngọt hơi ôn, qui kinh Can thận, có tác dụng dưỡng huyết tư âm, bổ tinh ích tủy, chủ trị các can thận âm hư, tinh huyết hư.

Tế tân vị cay tính ấm, quy kinh Tâm, Phế, Thận, có tác dụng phát hãn, tán hàn, trấn thống, khu đàm, chỉ khái [15].

Đảng sâm vị ngọt bình, qui kinh Tỳ Phế, có tác dụng bổ trung ích khí, sinh tân, dưỡng huyết, chủ trị chứng trung khí bất túc, phế khí hư nhược, huyết hư hoặc khí huyết lưỡng hư [20].

Đương quy vị ngọt cay ôn, qui kinh Can Tâm Tỳ, có tác dụng bổ huyết, hoạt huyết, chỉ huyết. Chủ trị chứng tâm can huyết hư, kinh nguyệt không đều, đau kinh, tắt kinh, các bệnh thai tiền sản hậu, tổn thương do té ngã, đau tê chân tay (tý thống ma mộc), nhọt lở loét (ung thư sang thương), chứng huyết hư trường táo kiêm trị khái suyễn [17].

Xuyên khung vị cay tính ôn, quy kinh Can Đờm, Tâm bào, có tác dụng hoạt huyết hành khí, khu phong chỉ thống. Chủ trị các chứng chân tay tê dại, chứng phong thấp tý [17].

Đỗ trọng ngọt, ôn, quy kinh Can thận, có tác dụng bổ can thận, cường gân cốt, chủ trị chứng thận hư, đau lưng, liệt dương (dương nuy), thai động, thai lậu, trụ thai [17].

Cam thảo vị ngọt, tính bình, quy kinh Tỳ Vị Phế Tâm, có tác dụng bổ trung ích khí, nhuận phế chỉ khát, hoãn cấp chỉ thông, thanh nhiệt giải độc, chủ trị các chứng tỳ vị hư nhược [18].

### **1.3.3. Các nghiên cứu về KNC**

Tuân thủ theo thông tư hướng dẫn việc thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I trên người khỏe mạnh của các thuốc mới yêu cầu cần có những khẳng định về tính an toàn với những chứng cứ rõ ràng trên thực nghiệm (độc tính cấp, bán cấp, bán trường diễn, trường diễn, gây mô hình bệnh...) [5],[7],[9], bài thuốc KNC dưới dạng cao đặc đã được tiến hành thử độc tính cấp, bán trường diễn và gây mô hình chống viêm giảm đau thực nghiệm tại Bộ môn Dược lý – Học viện Quân y có kết quả tốt, an toàn. Đây đồng thời cũng là cơ sở làm tiền đề để chúng tôi tiến hành xây dựng mô hình thử nghiệm tác dụng chống thoái hóa khớp gối của thuốc.

#### ***1.3.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp của bài thuốc KNC trên động vật thực nghiệm***

Chưa tìm thấy LD<sub>50</sub> của cao đặc KNC theo đường uống trên chuột nhắt trắng với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong vòng 24 giờ là 42,0 gam cao đặc/kg thể trọng (phụ lục 1).

#### ***1.3.3.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của bài thuốc KNC trên động vật thực nghiệm***

Trên các lô chuột dùng cao đặc KNC liều 1,7g cao đặc/kg/ngày và liều 8,5g cao đặc/kg/ngày trong 90 ngày liên tục không phát hiện các bất thường trên chuột thực nghiệm (chuột khỏe mạnh, tăng trọng đều, không làm thay đổi các chỉ số huyết học, sinh hóa, không gây tổn thương đến mô bệnh học gan, lách, thận (phụ lục 1).

### ***1.3.3.3. Nghiên cứu tác dụng chống viêm giảm đau của bài thuốc KNC trên động vật thực nghiệm***

Cao đặc KNC ở cả 2 mức liều dùng (1,7g/kg/ngày và 3,4g/kg/ngày) có tác dụng chống viêm tốt trên các mô hình thực nghiệm:

- Mô hình viêm khớp gây bởi tá chất Freund trên chuột cống trắng.
- Mô hình gây phù chân chuột cống trắng bằng carrageenin.
- Mô hình giảm đau bởi phiến nóng
- Mô hình đau quặn gây bằng acid acetic (phụ lục 2)



## Chương 2

### CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Chất liệu nghiên cứu

Chất liệu nghiên cứu là bài thuốc KNC gồm 14 vị thuốc được sắc dưới dạng cao đặc KNC thành phần gồm:

**Bảng 2.1. Thành phần cao đặc KNC**

Tên vị thuốc	Tên khoa học [5],[6]	Hàm lượng (gam)
Độc hoạt	<i>Radix Angelicae pubescentis</i>	12g
Phòng phong	<i>Radix Saposhnikoviae divaricatae</i>	10g
Tần giao	<i>Radix Gentianae macrophyllae</i>	10g
Tang kí sinh	<i>Herba Loranthe gracilifolii</i>	10g
Ngưu tất	<i>Radix Achyranthis bidentatae</i>	08g
Bạch thược	<i>Radix Paeoniae lactiflorae</i>	05g
Thục địa	<i>Radix Rehmanniae glutinodea praeparata</i>	15g
Khương hoạt	<i>Rhizoma et Radix Notopterygii</i>	05g
Tế tân	<i>Radix et Rhizoma Asari</i>	05g
Đảng sâm	<i>Radix Codonopsis</i>	05g
Đương quy	<i>Radix Angeliace sinensis</i>	05g
Xuyên khung	<i>Rhizoma Ligustici wallichii</i>	05g
Đỗ trọng	<i>Cortex Eucommiae</i>	05g
Cam thảo	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	02g

Tất cả các vị thuốc đều được bào chế theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V [8] và tiêu chuẩn cơ sở.

Cao nước chiết xuất từ bài thuốc KNC có tỷ lệ 1:1 (1g dược liệu/1ml cao), được đựng trong chai nhựa nút kín. Quá trình chiết xuất được thực hiện bằng máy tự động tại khoa Dược - Bệnh viện Tuệ Tĩnh.

Từ cao nước KNC có tỉ lệ 1:1 tiến hành nghiên cứu chiết xuất và bào chế cao đặc KNC; xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và kiểm định tiêu chuẩn cho cao đặc KNC tại Học viện Quân Y. Cao đặc KNC đạt tiêu chuẩn cơ sở được sử dụng là chế phẩm nghiên cứu.

Tùy theo mức liều sử dụng cho chuột uống, cao đặc KNC được pha loãng trong nước cất thành các dung dịch có nồng độ khác nhau, dùng để nghiên cứu tác dụng chống thoái hóa khớp gối trên thực nghiệm.

Liều dùng được tính theo gam cao đặc/kg/ngày. Từ 8g dược liệu khô của bài thuốc KNC để tạo ra 1g cao đặc KNC.

Liều dự kiến sử dụng trên người là 6,7g cao đặc/người/ngày (53,6g dược liệu khô/người/ngày). Tính trung bình một người 50kg thì liều dùng dự kiến trên người sẽ là 0,134g cao đặc/kg/ngày (1,072g dược liệu khô/kg/ngày).

Quy đổi ra liều tương đương trên chuột cống với hệ số quy đổi là 07 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột cống là 0,94g cao đặc/kg/ngày (7,52g dược liệu khô/kg/ngày).

## **2.2. Thuốc tham chiếu**

- Indomethacin 25mg

## **2.3. Thời gian và địa điểm tiến hành nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Dược lý - Học viện Quân y trong thời gian từ tháng 11/2019 đến hết tháng 3/2020.

## **2.4. Đối tượng nghiên cứu**

Chuột cống trắng trưởng thành, dòng Wistar, 50 con, không phân biệt giống, 9 tuần tuổi, cân nặng  $200 \pm 10$ g.

Động vật thí nghiệm do Ban chăn nuôi - Học viện Quân y cung cấp, nuôi dưỡng trong phòng nuôi động vật thí nghiệm ít nhất một tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Động vật ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động

vật nghiên cứu, nước sạch đun sôi để nguội uống tự do. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thí nghiệm.

## **2.5. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.5.1. Thiết kế nghiên cứu**

Tiến hành nghiên cứu trên chuột cống trắng gây thoái hóa khớp gối bằng Monosodiumiodoacetate (MIA) theo phương pháp nghiên cứu của Ikufumi Takahashi và cộng sự (2018) [67].

### **2.5.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu**

Năm mươi chuột cống trắng trưởng thành sau khi nuôi 7 ngày tại phòng nuôi động vật thí nghiệm của Học viện quân y đã loại trừ những chuột không đạt tiêu chuẩn, được thực hiện mô hình thử nghiệm. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con.

### **2.5.3. Công cụ và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu**

#### **2.5.3.1. Thuốc và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu**

- Monosodium iodoacetate (MIA) (cat. #I2512; Sigma, St. Louis, MO, USA); nước muối sinh lý (Braun, Việt Nam).

- Các kit ELISA xét nghiệm chất trung gian gây viêm PGE<sub>2</sub> và các cytokines tiền viêm TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , và IL-6 trong huyết thanh.

- Một số hóa chất khác.

#### **2.5.3.2. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu**

- Cân phân tích Sartorius độ chính xác 0,0001g- Đức.

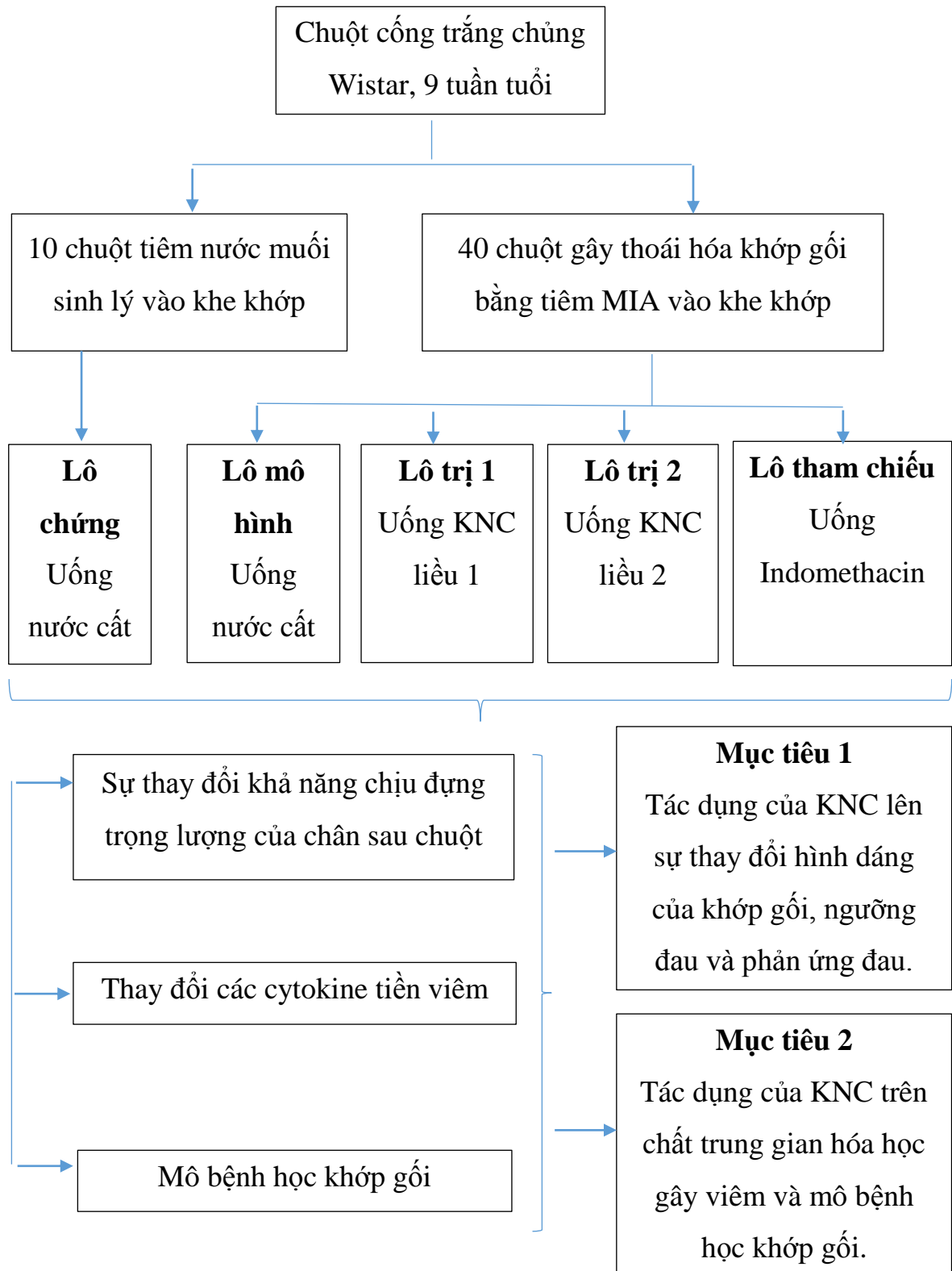
- Hệ thống xét nghiệm **ELISA**.

- Kim cong đầu tù dùng cho chuột uống thuốc, sản xuất tại Nhật Bản.

- Ống micropipette chuyên dụng để lấy máu hốc mắt.

- Bộ dụng cụ mổ động vật cỡ nhỏ và các dụng cụ thí nghiệm khác.

#### 2.5.4. Quy trình nghiên cứu



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

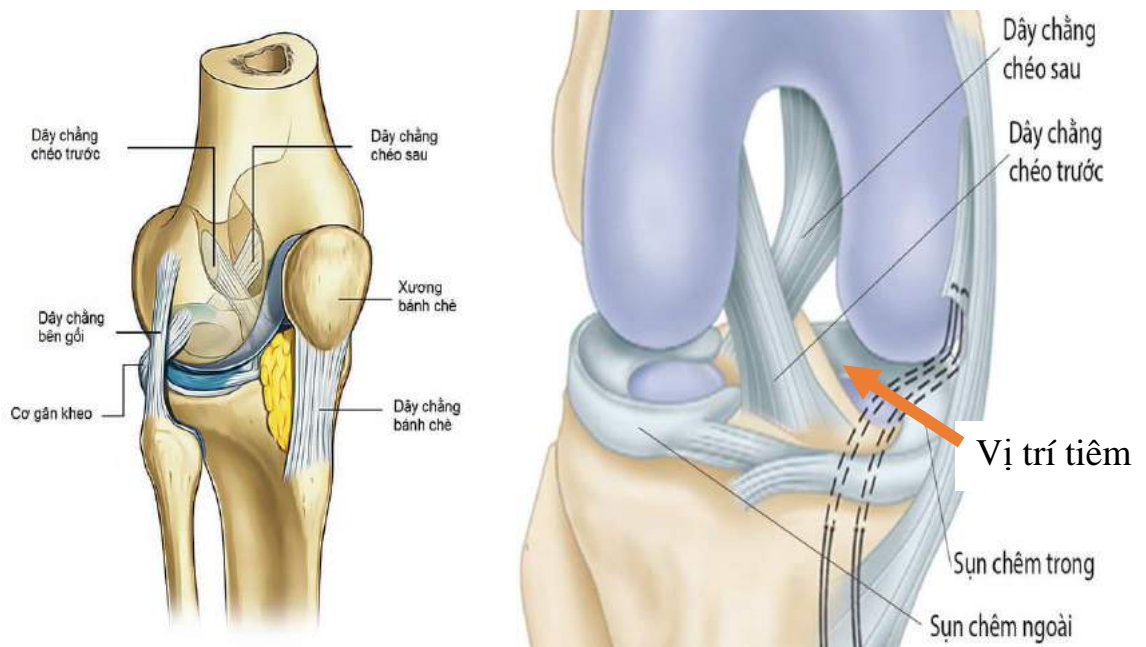
## 2.5.5. Phương pháp tiến hành

### 2.5.5.1. Gây mô hình thoái hóa khớp gối

Chuột cống trắng chủng Wistar, 9 tuần tuổi, cân nặng  $200 \pm 10\text{g}$ , được sử dụng cho nghiên cứu.

Quá trình gây thoái hóa khớp gối trên chuột cống như sau:

- Monosodium iodoacetate (MIA) 1,0mg được hòa tan trong 30 $\mu\text{L}$  nước muối vô trùng.
- Gây mê chuột bằng isoflurane (gây mê đường hô hấp).
- Đầu gối ở chân sau bên phải của chuột được làm sạch lông và sát trùng.
- Rạch da ở trung tâm khớp gối để bộc lộ dây chằng xương bánh chè.
- Chuột được đặt nằm ngửa, cẳng chân đặt tạo góc  $90^0$  ở khớp gối.
- Sờ nắn phía dưới xương bánh chè để xác định dây chằng xương bánh chè. Dùng kim 29gauge, 0,5inch để tiêm MIA (1,0mg/30 $\mu\text{L}$ ) vào khớp gối tại vị trí ở mặt trong dây chằng xương bánh chè (kim không tiến quá xa vào các dây chằng chéo).



**Hình 2.1. Minh họa vị trí tiêm khớp gối**

### **2.5.5.2. Phương pháp tiến hành thử nghiệm trên chuột cống**

Một tuần sau khi tiêm MIA gây thoái hóa khớp gối, các chuột bắt đầu được cho uống thuốc thử và nước cất với các mức liều khác nhau cho đến hết 8 tuần.

- Lô chứng: không gây thoái hóa khớp gối, uống nước cất.
- Lô mô hình: gây thoái hóa khớp gối, uống nước cất.
- Lô trị 1: gây thoái hóa khớp gối, uống KNC liều 0,94g cao đặc/kg/ngày.
- Lô trị 2: gây thoái hóa khớp gối, uống KNC liều 1,88g cao đặc/kg/ngày.
- Lô tham chiếu: gây thoái hóa khớp gối, uống indomethacin liều 2 mg/kg/ngày.

### **2.5.6. Phương pháp đánh giá kết quả**

#### **2.5.6.1. Đánh giá tác dụng của cao đặc KNC lên sự thay đổi hình dáng của khớp gối, ngưỡng đau và phản ứng đau**

#### **Đánh giá sự thay đổi khả năng chịu đựng trọng lượng của chân sau chuột**

Đánh giá sự thay đổi khả năng chịu đựng trọng lượng của chân sau bằng thiết bị đo chuyên dụng (Incapacitance tester), theo phương pháp được mô tả bởi S. E. Bove M.S. và SC (2003) [32]. Tính tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng} = \frac{\text{Trọng lượng trên chân sau phải}}{\text{Trọng lượng trên chân sau phải + trái}} \times 100$$

### **2.5.6.2. Đánh giá tác dụng của cao đặc KNC trên một số chất trung gian hóa học gây viêm và mô bệnh học**

#### **Các cytokine tiền viêm**

Lấy máu, ly tâm máu 2000 vòng trong 15 phút ở 4<sup>0</sup>C, tách lấy huyết thanh để xét nghiệm chất trung gian gây viêm PGE<sub>2</sub> và các cytokines tiền viêm TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , và IL-6.

#### **Xét nghiệm mô bệnh học khớp gối**

Sau 7 tuần dùng thuốc, chuột được giết và khớp gối chân sau bên phải được cắt ra, cố định trong Formalin 10%, làm tiêu bản mô bệnh học khớp gối bao gồm cả khớp giữa xương chày và xương đùi (tibiofemoral-TF) và khớp giữa xương bánh chè và xương đùi (patellofemoral-PF).

Tiến hành đánh giá sự thay đổi mô bệnh học sử dụng bảng chấm điểm đánh giá mô bệnh học sụn xương khớp theo phương pháp mô tả bởi Pritzker và cộng sự (2006) [61] và bảng chấm điểm đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa (Infrapatellar fat pad) theo phương pháp mô tả bởi Udo M. và cộng sự (2016) [59].

### **2.6. Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu sau thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0 của IBM.

### Chương 3

#### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả về tác dụng của cao đặc KNC lên sự thay đổi hình dáng của khớp gối, ngưỡng đau và phản ứng đau trên thực nghiệm

**Bảng 3.1. Sự thay đổi khả năng chịu đựng trọng lượng của chân sau chuột sau 2 tuần và 4 tuần**

Lô nghiên cứu	Tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng (%)			P <sub>b,c-a</sub>
	XPD (a) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Sau 2 tuần (b) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Sau 4 tuần (c) ( $\bar{X} \pm SD$ )	
Lô 1 (chứng)	50,81 ± 2,80	50,39 ± 2,99	51,62 ± 2,84	> 0,05
Lô 2 (mô hình)	29,34 ± 4,40	31,26 ± 2,76	32,12 ± 3,96	> 0,05
Lô 3 (trị 1)	29,12 ± 2,56	37,57 ± 2,57	40,64 ± 2,79	< 0,001
Lô 4 (trị 2)	29,39 ± 5,70	39,08 ± 2,36	44,10 ± 2,80	< 0,001
Lô 5 (tham chiếu)	29,11 ± 4,39	37,67 ± 3,32	41,82 ± 5,13	< 0,001
p <sub>2,3,4,5-1</sub>	< 0,001	< 0,001		-
p <sub>3,4,5-2</sub>	> 0,05	< 0,001		-

#### Nhận xét:

#### \* So sánh giữa các lô với nhau tại cùng thời điểm đo:

- Tại thời điểm xuất phát, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng khi so sánh các lô 2, lô 3, lô 4, lô 5 với nhau ( $p > 0,05$ ).

- Tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng đo được của lô 2 (lô mô hình), lô 3 (lô trị 1), lô 4 (lô trị 2), lô 5 (lô tham chiếu) giảm có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (lô chứng) với  $p < 0,001$ .



- Tại thời điểm sau 2 tuần và 4 tuần dùng thuốc (tuần 3 và tuần 6 sau tiêm MIA) tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng ở các lô 3, 4, 5 tăng có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ( $p < 0,001$ ).

- So sánh giữa 2 lô dùng KNC với nhau cũng như so sánh các lô dùng KNC với lô dùng indomethacin, phân phối chịu đựng trọng lượng ở các lô này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**\* So sánh trong cùng một lô giữa các thời điểm đo:**

- Ở lô 1, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng tại các thời điểm đo không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), giá trị dao động quanh 50%.

- Ở lô 2 (lô mô hình), tại các thời điểm sau 2 tuần, 4 tuần dùng thuốc có tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng tăng hơn nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với xuất phát điểm (1 tuần sau tiêm MIA)

- Ở các lô 3, 4 (dùng KNC) và lô 5 (dùng indomethacin): sau 2 tuần, 4 tuần tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng đều tăng hơn rõ rệt so với xuất phát điểm ( $p < 0,001$ ).

**Bảng 3.2. Sự thay đổi khả năng chịu đựng trọng lượng của chân sau chuột sau 6 tuần và 7 tuần**

Lô nghiên cứu	Tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng (%)			P <sub>d,e-a</sub>
	XPĐ (a) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Sau 6 tuần (d) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Sau 7 tuần (e) ( $\bar{X} \pm SD$ )	
Lô 1 (chứng)	50,81 ± 2,80	50,52 ± 4,55	51,06 ± 2,75	> 0,05
Lô 2 (mô hình)	29,34 ± 4,40	36,08 ± 3,84	37,97 ± 3,63	< 0,01
Lô 3 (trị 1)	29,12 ± 2,56	42,91 ± 4,15	44,38 ± 4,69	< 0,001
Lô 4 (trị 2)	29,39 ± 5,70	45,20 ± 2,35	45,91 ± 4,11	< 0,001
Lô 5 (tham chiếu)	29,11 ± 4,39	43,08 ± 4,59	44,57 ± 4,55	< 0,001
p <sub>2,3,4,5-1</sub>	< 0,001	p <sub>2-1</sub> < 0,001 p <sub>3,4,5-1</sub> < 0,01		-
p <sub>3,4,5-2</sub>	> 0,05	p <sub>3,5-2</sub> < 0,01 p <sub>4-2</sub> < 0,001		-

**Nhận xét:**

**\* So sánh giữa các lô với nhau tại cùng thời điểm đo:**

- Tại thời điểm xuất phát điểm, phân phối chịu đựng trọng lượng ở các lô 2, 3, 4, 5 không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

- Tại tất cả các thời điểm đo, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng đo được ở lô 2 (lô mô hình) giảm có ý nghĩa thống kê so với lô 1 (lô chứng) với  $p < 0,001$ .

- Sau khi dùng thuốc 6 tuần, 7 tuần, phân phối chịu đựng trọng lượng ở các lô 3, 4 và lô 5 tăng có ý nghĩa thống kê so với lô 2 ( $p < 0,001$  và  $p < 0,01$ ).

- So sánh giữa 2 lô 3 và 4 với nhau cũng như so sánh 2 lô 3, 4 với lô 5, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**\* So sánh trong cùng một lô giữa các thời điểm đo**

- Ở lô 1, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng tại các thời điểm đo không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), giá trị dao động quanh 50%.

- Ở lô 2, các thời điểm sau 6 tuần và 7 tuần dùng thuốc, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng tăng có ý nghĩa thống kê so với thời điểm xuất phát điểm ( $p < 0,01$ ).

- Ở các lô 3, 4 (dùng KNC) và lô 5 (dùng indomethacin), tại các thời điểm sau dùng thuốc 6 tuần, 7 tuần, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột đều tăng hơn rõ rệt so với xuất phát điểm ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ).

**3.2. Kết quả về tác dụng của cao đặc KNC trên một số chất trung gian hóa học gây viêm và mô bệnh học khớp gối trên thực nghiệm**

**3.2.1. Sự thay đổi nồng độ cytokine tiền viêm ở các lô nghiên cứu**

**Bảng 3.3. Sự thay đổi nồng độ PGE2 trong huyết thanh chuột**

Lô nghiên cứu	PGE2 (pg/mL) ( $\bar{X} \pm SD$ )	% tăng so với lô 1	% giảm so với lô 2	p
Lô 1 (chứng)	50,25 ± 7,70	-	-	$p_{2,3,4,5-1} < 0,001$ $p_{3,4,5-2} < 0,001$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{3,4-5} > 0,05$
Lô 2 (mô hình)	364,22 ± 104,68	624,82 %	-	
Lô 3 (trị 1)	188,25 ± 18,66	274,63 %	48,31%	
Lô 4 (trị 2)	170,72 ± 24,70	239,73 %	53,13 %	
Lô 5 (tham chiếu)	183,61 ± 19,82	265,39 %	49,59 %	

**Nhận xét:**

- Các lô 2, 3, 4, 5 tiêm MIA vào khớp gối chuột có nồng độ PGE2 tăng cao có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ( $p < 0,001$ ).

- Các lô 3, 4 (dùng KNC) và lô 5 (dùng indomethacin) có nồng độ PGE2 giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ( $p < 0,001$ ).

- So sánh giữa 2 lô 3 và 4 với nhau cũng như so sánh 2 lô 3, 4 với lô 5, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.4. Sự thay đổi nồng độ TNF- $\alpha$  trong huyết thanh chuột**

Lô nghiên cứu	TNF- $\alpha$ (pg/mL) ( $\bar{X} \pm SD$ )	% tăng so với lô 1	% giảm so với lô 2	p
Lô 1 (chứng)	20,66 $\pm$ 1,92	-	-	$p_{2,3,4,5-1} < 0,001$
Lô 2 (mô hình)	61,09 $\pm$ 5,84	195,69 %	-	
Lô 3 (trị 1)	32,94 $\pm$ 6,98	59,42 %	46,09 %	$p_{3-4} > 0,05$
Lô 4 (trị 2)	30,11 $\pm$ 2,36	45,73 %	50,72 %	$p_{3,4-5} > 0,05$
Lô 5 (tham chiếu)	30,83 $\pm$ 3,54	49,23 %	49,53 %	

**Nhận xét:**

- So với lô 1 (chứng), các lô 2, 3, 4, 5 tiêm MIA vào khớp gối chuột có nồng độ TNF- $\alpha$  tăng cao có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ).

- So với lô 2 (mô hình), các lô 3, 4 dùng KNC và lô 5 dùng indomethacin có nồng độ TNF- $\alpha$  giảm có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ).

- So sánh giữa 2 lô 3, 4 với nhau cũng như so sánh lô 3, 4 với lô 5, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.5. Sự thay đổi nồng độ IL-1 $\beta$  trong huyết thanh chuột**

<b>Lô nghiên cứu</b>	<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/mL) (<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>	<b>% tăng so với lô 1</b>	<b>% giảm so với lô 2</b>	<b>p</b>
Lô 1 (chứng)	20,36 $\pm$ 3,05	-	-	$p_{2,3,4,5-1} < 0,001$ $p_{3,4,5-2} < 0,001$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{3,4-5} > 0,05$
Lô 2 (mô hình)	84,63 $\pm$ 10,89	315,65 %	-	
Lô 3 (trị 1)	39,89 $\pm$ 5,38	95,93 %	52,86 %	
Lô 4 (trị 2)	36,45 $\pm$ 3,47	79,01 %	56,93 %	
Lô 5 (tham chiếu)	38,46 $\pm$ 4,10	88,91 %	54,55 %	

**Nhận xét:**

- So với lô 1 (chứng), các lô 2, 3, 4, 5 tiêm MIA vào khớp gối chuột có nồng độ IL-1 $\beta$  tăng cao có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ).

- So với lô 2 (mô hình), các lô 3, 4 dùng KNC và lô 5 dùng indomethacin có nồng độ IL-1 $\beta$  giảm có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ).

- So sánh giữa 2 lô 3, 4 với nhau cũng như so sánh lô 3, 4 với lô 5, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.6. Sự thay đổi nồng độ IL-6 trong huyết thanh chuột**

Lô nghiên cứu	IL-6 (pg/mL) ( $\bar{X} \pm SD$ )	% tăng so với lô 1	% giảm so với lô 2	p
Lô 1 (chứng)	24,86 ± 2,42	-	-	p <sub>2,3,4,5-1</sub> < 0,001
Lô 2 (mô hình)	62,54 ± 5,97	151,58 %	-	
Lô 3 (trị 1)	41,91 ± 8,92	68,59 %	32,99 %	p <sub>3-4</sub> > 0,05 p <sub>3,4-5</sub> > 0,05
Lô 4 (trị 2)	40,01 ± 4,60	60,94 %	36,02 %	
Lô 5 (tham chiếu)	40,20 ± 4,70	61,70	35,72 %	

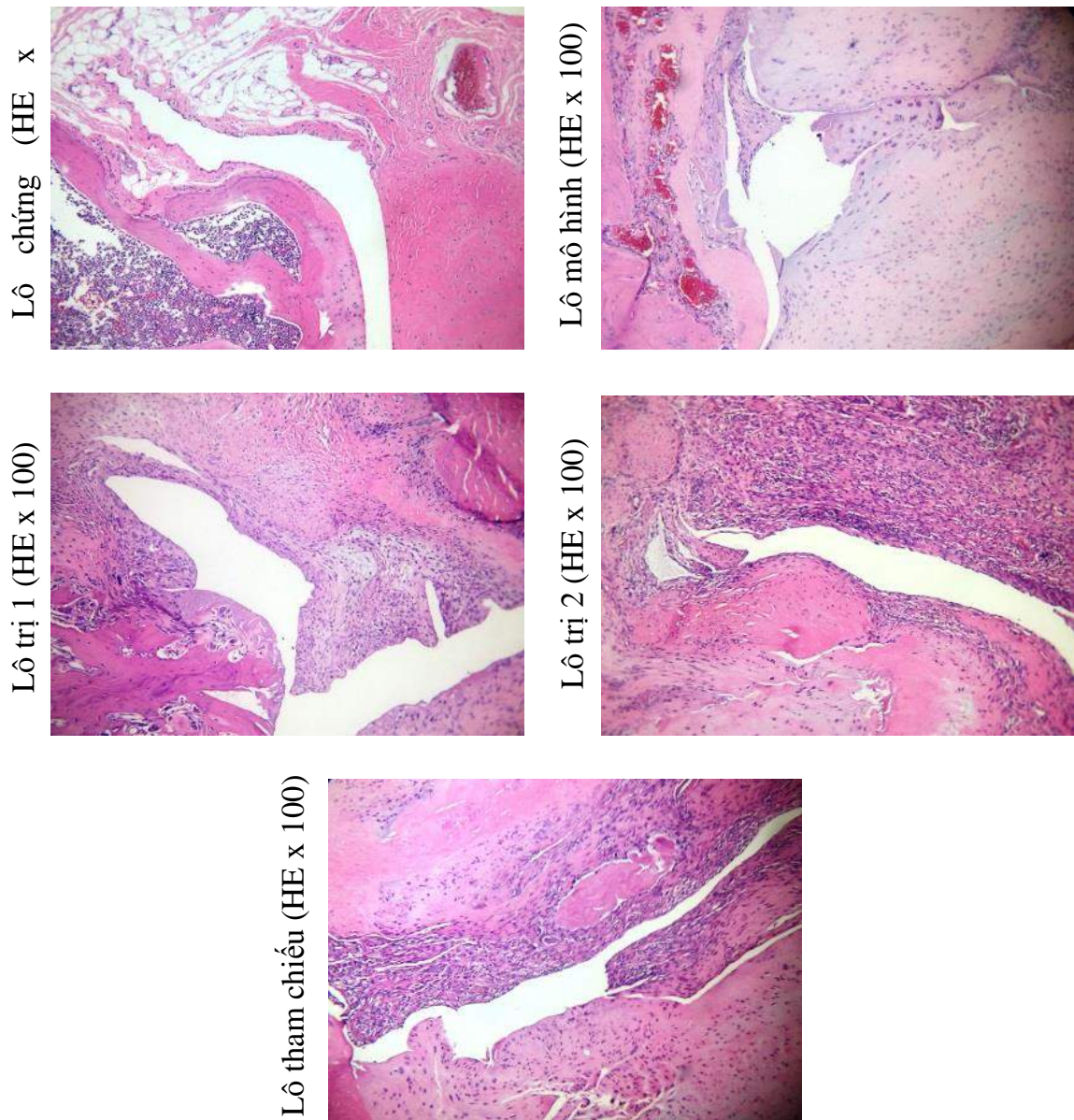
**Nhận xét:**

- So với lô 1 (chứng), các lô 2, 3, 4, 5 tiêm MIA vào khớp gối chuột có nồng độ IL-6 tăng cao có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ).

- So với lô 2 (mô hình), các lô 3, 4 dùng KNC và lô 5 dùng indomethacin có nồng độ IL-6 giảm có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ).

- So sánh giữa 2 lô 3, 4 với nhau cũng như so sánh lô 3, 4 với lô 5, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.2. Tổn thương mô bệnh học khớp gối



**Hình 3.1. Hình ảnh mô bệnh học khớp gối ở các lô chuột nghiên cứu**

#### Nhận xét:

- Lô chứng: Khớp gối với màng hoạt dịch mỏng được lót bởi biểu mô dẹt. Sụn khớp không bị tổn thương thoái hóa. Hình ảnh mô bệnh học khớp gối bình thường.

- Lô mô hình: Khớp gối với màng hoạt dịch dày, bị xâm nhiễm nhiều tế bào viêm là lympho và đại thực bào. Có nơi màng hoạt dịch bị hoại tử cơ huyết. Các mao mạch máu sung huyết. Mô sụn bị xơ hóa và thoái hóa hyalin. Hình ảnh viêm thoái hóa khớp gối.

- Lô trị 1: Khớp gối với màng hoạt dịch dày với các tế bào sợi tăng sinh, xâm nhiễm tế bào viêm là lympho và đại thực bào. Các mao mạch máu sung huyết. Hình ảnh viêm tăng sinh màng hoạt dịch khớp gối.

- Lô trị 2: Khớp gối với màng hoạt dịch dày với các tế bào sợi tăng sinh, xâm nhiễm nhiều tế bào viêm là lympho và đại thực bào. Các mao mạch máu sung huyết. Hình ảnh viêm tăng sinh màng hoạt dịch khớp gối.

- Lô tham chiếu: Khớp gối với màng hoạt dịch dày với các tế bào sợi tăng sinh, xâm nhiễm nhiều tế bào viêm là lympho và đại thực bào. Các mao mạch máu sung huyết. Hình ảnh viêm tăng sinh màng hoạt dịch khớp gối.

**Bảng 3.7. Điểm đánh giá tổn thương mô bệnh học sụn xương khớp**

Lô nghiên cứu	Điểm đánh giá ( $\bar{X} \pm SD$ )	% giảm so với lô 2	p
Lô 1 (chứng)	0,00 ± 0,00	-	$p_{3,4,5-2} < 0,01$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{3,4-5} > 0,05$
Lô 2 (mô hình)	18,90 ± 3,14	-	
Lô 3 (trị 1)	13,70 ± 3,30	27,51 %	
Lô 4 (trị 2)	12,80 ± 3,33	32,28 %	
Lô 5 (tham chiếu)	13,20 ± 3,22	30,16 %	

**Nhận xét:**

- Lô 1 (chứng), hình ảnh mô bệnh học khớp gối chuột bình thường, không có chuột nào có biểu hiện tổn thương, điểm trung bình đánh giá tổn thương mô bệnh học sụn xương khớp bằng 0.



- Lô 2 (mô hình), điểm trung bình đánh giá tổn thương mô bệnh học sụn xương khớp là 18,90.

- So với lô 2, điểm trung bình đánh giá tổn thương mô bệnh học sụn xương khớp ở các lô 3, 4 uống KNC và lô 5 uống indomethacin giảm có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

- So sánh hai lô 3, 4 với nhau, cũng như so sánh lô 3, 4 với lô 5, điểm trung bình đánh giá tổn thương mô bệnh học sụn xương khớp của chuột ở các lô này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.8. Điểm đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa**

Lô nghiên cứu	Điểm đánh giá ( $\bar{X} \pm SD$ )	% giảm so với lô 2	p
Lô 1 (chứng)	0,00 $\pm$ 0,00	-	$p_{3,4,5-2} < 0,01$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{3,4-5} > 0,05$
Lô 2 (mô hình)	4,20 $\pm$ 1,03	-	
Lô 3 (trị 1)	2,80 $\pm$ 0,92	33,33 %	
Lô 4 (trị 2)	2,40 $\pm$ 1,17	42,86 %	
Lô 5 (tham chiếu)	2,60 $\pm$ 1,17	38,10 %	

**Nhận xét:**

- Lô 1 (chứng), hình ảnh mô bệnh học khớp gối chuột bình thường, không có chuột nào có biểu hiện viêm khoang mỡ Hoffa. Điểm trung bình đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa bằng 0.

- Lô 2 (mô hình), điểm trung bình đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa là 4,20.

- So với lô 2, điểm trung bình đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa ở các lô 3, 4 uống KNC và ở lô 5 uống indomethacin giảm có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

- So sánh giữa 2 lô 3,4 với nhau, cũng như so sánh lô 3, 4 với lô 5, điểm trung bình đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa của chuột ở các lô này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

## Chương 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Đánh giá tác dụng của cao đặc KNC lên sự thay đổi hình dáng của khớp gối, ngưỡng đau và phản ứng đau

Mô hình gây thoái hóa khớp gối thực nghiệm bằng MIA (monosodium-iodoacetate) là mô hình điển hình có độ nhạy cao, dễ dàng tiến hành, được sử dụng phổ biến nhất và phù hợp với điều kiện thí nghiệm tại Việt Nam. Mô hình MIA dùng chất ức chế chuyển hóa MIA tiêm vào khớp gối của chuột, 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 thoái hóa khớp trên lâm sàng [36]. Mức độ nặng của khớp viêm phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tiêm MIA, nhiều nghiên cứu đã chứng minh MIA liều 1mg/30  $\mu$ L có hiệu quả nhất trong việc gây mô hình thoái hóa khớp để tiến hành các thử nghiệm.

Tại tất cả các thời điểm đo, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng đo được ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng với  $p < 0,001$ . Đáp ứng với đau của chuột được đánh giá thông qua tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng ở 2 chân sau của chuột. Bình thường chuột đứng cân bằng, phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột dao động quanh 50%. Khi chuột bị đau chân phải (ở đây là khớp gối phải), phân phối chịu đựng trọng lượng dồn sang bên trái (bên không đau), giảm đi ở bên phải (bên đau), phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột giảm. Như vậy, MIA tiêm vào khớp gối phải của chuột gây viêm, thoái hóa từ đó gây đau khớp gối phải.

Indomethacin là thuốc chống viêm giảm đau không steroid, dẫn xuất từ acid indolacetic. Indomethacin có tác dụng giảm đau, hạ sốt, chống viêm và chống ngưng tập tiểu cầu. Cơ chế tác dụng của thuốc indomethacin được cho rằng: thuốc có tác dụng chủ yếu qua ức chế prostaglandin synthetase, do đó ngăn cản tạo prostaglandin, thromboxan và các sản phẩm khác của enzym cyclo-oxygenase [22].

Nghiên cứu lựa chọn Indomethacin làm thuốc tham chiếu do thuốc có tác dụng chống viêm mạnh hơn phenylbutazon 20-80 lần và mạnh hơn hydrocortison 2-4 lần. Đối kháng rõ với PG. Tác dụng trên cả giai đoạn đầu và cuối của viêm, nên phù hợp với mô hình viêm cấp và mạn tính. Mặt khác, tác dụng giảm đau và chống viêm của indomethacin có liên quan mật thiết với nhau, liều chống viêm/ liều giảm đau = 1/1 [22].

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

Sau 1 tuần tiêm MIA, các lô nghiên cứu đã mô phỏng được khá rõ diễn biến lâm sàng của quá trình viêm thông qua sự hạn chế hoạt động khớp gối, khớp gối tổn thương và thay đổi các chỉ số interleukin. Hạn chế hoạt động khớp gối thể hiện qua mức giảm tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột (bảng 3.1).

Khi so sánh giữa các lô với nhau tại cùng một thời điểm, sau khi dùng thuốc, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột ở các lô dùng thuốc KNC và lô dùng thuốc tham chiếu indomethacin đều tăng có ý nghĩa thống kê so với lo mô hình với  $p < 0,001$  và  $p < 0,01$ ; chưa thấy sự khác biệt khi so sánh lô nghiên cứu và lô tham chiếu ( $p > 0,05$ ).

Khi so sánh trong cùng 1 lô giữa các thời điểm đo, tại các thời điểm tuần thứ 7, 8 sau tiêm MIA, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột tăng hơn so với sau khi tiêm MIA 1 tuần (xuất phát điểm), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ . Tình trạng viêm tại ổ khớp tiến triển mạnh gây

viêm cấp tính sau khi tiêm MIA, tuy nhiên tình trạng tiến triển viêm giảm dần ở tuần thứ 7, 8 sau tiêm, lúc này tổn thương thoái hóa khớp chủ yếu là viêm mạn tính. Cao đặc KNC ở cả 2 mức liều 0,94g cao đặc/kg/ngày, liều 1,88g cao đặc/kg/ngày và indomethacin mức liều 2mg/kg/ngày đều có tác dụng làm tăng rõ rệt khả năng chịu đựng trọng lượng so với XPĐ ( $p < 0,001$ ).

Cao đặc KNC và indomethacin tác động trên cả giai đoạn tiến triển cấp tính (b, c) và giai đoạn tiến triển mạn tính (d, e), làm giảm đau rõ rệt trên khớp gây viêm, thoái hóa, thể hiện qua tác dụng làm tăng tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng của chuột. Tác dụng giảm đau của cao đặc KNC và indomethacin là tương tự nhau.

Như vậy, indomethacin và các lô dùng cao đặc KNC đều thể hiện tác dụng giảm đau, tăng khả năng chịu đựng trọng lượng của chuột. Theo Moncada và Vane (1978), do làm giảm tổng hợp PG F<sub>2</sub> $\alpha$  nên các thuốc NSAID làm giảm tính cảm thụ của các ngọn dây cảm giác với các chất gây đau của phản ứng viêm như bradykinin, histamine, sterotinin [60].

#### **4.2. Tác dụng của cao đặc KNC trên một số chất trung gian hóa học gây viêm và mô bệnh học khớp gối trên thực nghiệm**

##### *Sự thay đổi nồng độ các cytokine tiền viêm*

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) là chất trung gian dị hóa chính liên quan đến sự thoái hóa sụn và sự tiến triển của viêm khớp trong các bệnh như viêm khớp dạng thấp và viêm xương khớp [60]. Thuốc chống viêm không steroid (NSAID) và thuốc ức chế cyclooxygenase-2 (COX-2) chọn lọc làm giảm sản xuất PGE<sub>2</sub> để làm giảm tình trạng viêm trong các bệnh này, nhưng có độc tính có thể bao gồm cả chảy máu đường tiêu hóa và prothrombin. Trong các tế bào, axit arachidonic được chuyển thành PGE<sub>2</sub> thông qua các enzyme cyclooxygenase (COX) và các chất tổng hợp tuyến tiền liệt E (PGES) [64].

Cytokine là các protein hay glycoprotein không phải kháng thể được sản xuất và phóng thích bởi các tế bào bạch cầu viêm và một số tế bào khác không phải bạch cầu. Các protein này hoạt động trong vai trò là các chất trung gian điều hòa giữa các tế bào trong cơ thể. Các cytokine chính tham gia vào quá trình phá hủy sụn khớp, gây quá thoái hóa khớp điển hình như:

Ở mô khớp, tế bào T sản xuất IFN –  $\gamma$  và các cytokine tiền viêm khác mà kích thích đại thực bào và các nguyên bào sợi (fibroblasts) cũng như các tế bào sụn (chondrocytes), tế bào hủy xương (osteoclasts), và tế bào B. Các đại thực bào và nguyên bào sợi bị hoạt hoá giải phóng ra các cytokines khác nhau, gồm TNF- $\alpha$ , một thành phần trung tâm của dây chuyền cytokine, kích thích sự sản xuất các chất trung gian phụ gây viêm khác. TNF- $\alpha$  hoạt hóa và tăng sinh các tế bào màng hoạt dịch tạo tổ chức Pannus, giải phóng men tiêu sợi collagen; đồng thời còn hoạt hóa tế bào sụn làm phá hủy sụn, gây ức chế tổng hợp proteoglycan.

Interleukine-1 $\beta$  là một cytokine của phản ứng viêm cấp tính, được giải phóng vào đáp ứng với tình trạng nhiễm khuẩn hay tổn thương tế bào gây ra bởi hệ thống miễn dịch bẩm sinh [54]. IL-1 $\beta$  được tiết ra từ monocyte/macrophage, tế bào B, fibroblasts, hầu hết các tế bào biểu mô và các tế bào nội mô; được dự trữ trong tế bào keatin [74]. Vai trò sinh học của IL-1 $\beta$  được biết đến hiện nay: Tăng biểu hiện của các phân tử kết dính, tăng sự di cư của neutrophils và macrophage, gây ra tình trạng sinh lý giống sock, tăng tạo protein ở gan, sốt, tăng sản xuất protein và sự tạo mới hồng cầu, thoái hóa sụn, kích hoạt iNOS, gây phản ứng viêm cấp tính.

TNF- $\alpha$  và IL-1 $\beta$  tác động lên leukocyte và endothelium để gây ra phản ứng viêm cấp tính, là các cytokine chính tham gia vào quá trình phá hủy sụn khớp trong thoái hóa khớp, có tác dụng kích thích các tế bào sụn tăng tổng hợp enzyme proteinase, tăng quá trình tổng hợp các cytokine tiền viêm gây

thoái hóa khớp [36]. Cả 2 cytokine này còn sinh ra IL-6 để rồi 3 phân tử (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) cùng đồng loạt tác động và gây ra nhiều biến đổi tại mô tổn thương cũng như toàn thân. IL-6 là một loại cytokine tiền viêm tạo ra bởi nhiều loại tế bào khác nhau bao gồm tế bào T và tế bào B, tế bào bạch cầu, bạch cầu đơn nhân và nguyên bào sợi. IL-6 kết hợp trực tiếp với phức hợp thụ thể màng IL-6 và glycoprotein-130 dẫn tới hoạt hóa tế bào viêm như đại thực bào và bạch cầu trung tính từ đó kích hoạt các phản ứng viêm, gây hủy hoại sụn khớp, xương. IL-6 cũng có khả năng hoạt hóa các tế bào không có thụ thể màng IL-6 miễn là chúng có chứa thụ thể gp130 phổ biến. Cơ chế này liên quan tới thụ thể dạng hòa tan của IL-6.

Sự gia tăng nồng độ IL-6 cũng như nồng độ thụ thể IL-6 dạng hòa tan có liên quan đến mức độ trầm trọng của bệnh và sự tiến triển của bệnh. IL-6 tác động trực tiếp trên bạch cầu trung tính qua receptor của IL-6 tại màng tế bào. Đã có bằng chứng chứng minh ức chế IL-6 sẽ ngăn chặn sự bám dính của bạch cầu trung tính. Tác động khác của IL-6 trên bạch cầu trung tính bao gồm duy trì sự tồn tại của bạch cầu trung tính, hoạt hóa tăng sinh bạch cầu thông qua các cytokine viêm, huy động tập trung bạch cầu trung tính từ tuần hoàn và từ tủy xương. Việc giải phóng các receptor IL-6 hòa tan cũng đóng một vai trò quan trọng trong quá trình viêm cấp cũng như mạn tính.

MIA sau khi được tiêm vào khớp gối chuột đã gây quá trình viêm mạnh, kích thích làm tăng nồng độ PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6. Kết quả ở các bảng 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 cho thấy chuột ở các lô dùng indomethacin và lô dùng cao đặc KNC ở cả 2 mức liều đều thể hiện tác dụng giảm viêm thông qua giảm nồng độ PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 so với lô mô hình sau 7 tuần liên tục dùng thuốc, kết quả có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .

So sánh giữa 2 lô dùng KNC với nhau cũng như so sánh 2 lô dùng KNC với lô dùng indomethacin, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p >$

0,05), cho thấy tác dụng làm giảm nồng độ các cytokine tiền viêm là tương tự nhau.

Tác dụng giảm đau chống viêm của cao đặc KNC được chứng minh thông qua tác dụng làm giảm nồng độ các cytokine tiền viêm. Các nghiên cứu trong và ngoài nước đã chỉ ra rằng thành phần dược liệu có trong cao đặc có tác dụng chống thoái hóa khớp thông qua giảm nồng độ các cytokin tiền viêm.

Diễn hình với nghiên cứu của Xu Y về tác dụng điều trị thoái hóa khớp của Độc hoạt và Tế Tân được báo cáo năm 2014 đã chứng minh khả năng 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 $\beta$  và TNF -  $\alpha$ , giảm sự biểu hiện các mARN TNF -  $\alpha$  đồng thời tăng biểu hiện proteoglycan và collagen [77],[78]. Phân tích tác dụng dược lý của 119 thành phần của Tế tân cũng cho thấy tác dụng chống viêm của Tế tân làm ức chế sản sinh COX-2, COX-1, iNOS và TNF- $\alpha$  [55].

Nghiên cứu khác về tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của TD0015 trên thực nghiệm của Nguyễn Thị Thanh Hà và Trần Thị Giáng Hương (2018), TD0015 với thành phần bài thuốc gồm: Ngưu tất, Đỗ trọng, Bạch thược, Cam thảo, ... được thực hiện trên chuột cống trắng được gây mô hình thoái hóa khớp gối bằng MIA (monosodium - iodoacetate) 3mg/khớp cho kết quả TD0015 làm giảm hạn chế vận động khớp gối, giảm tổn thương cấu trúc sụn khớp, giảm các chỉ số IL - 1 $\beta$ , TNF -  $\alpha$  [12]. Vị thuốc Ngưu tất có tác dụng thúc đẩy quá trình tổng hợp protein với hành phần hóa học chính là saponin, trên các mô hình thực nghiệm chứng minh rằng các liều khác nhau của saponin làm giảm rõ rệt khả năng phản ứng viêm ở **chuột**, làm giảm cơn đau của chuột trên mô hình gây đau bởi phiền nóng và cải thiện tình trạng huyết học của chuột [53],[76]. Rõ ràng tác dụng chống viêm, giảm đau đã



được ghi nhận là có liên quan đến saponin [37]. Tang và cộng sự [68] đã đánh giá hoạt tính chống viêm của saponin trong cây Ngưu tất chống lại sự sản sinh NO do lipopolysaccharit trong RAW 264.7 (dòng tế bào đại thực bào bạch cầu đơn nhân của chuột) và các hợp chất này ức chế đáng kể việc sản xuất NO, ức chế tác dụng làm dẫn mạch, giảm tính thấm thành mạch, giảm sản xuất các prostaglandin, các cytokine tiền viêm, ức chế phản ứng viêm.

Cam thảo có tính bình, vị ngọt tác dụng vào các kinh tỳ, vị, tâm và phế. Theo một số nghiên cứu lâm sàng, cây cam thảo chứa hơn 300 hợp chất khác nhau có tính chống viêm, kháng khuẩn mạnh mẽ. Năm 2008, Eun Myoung Shin, Hong Yu Zhou và cộng sự tiến hành đề tài nghiên cứu tác dụng chống viêm của glycyrol phân lập từ *Glycyrrhiza uralensis* (Cam thảo) trong các đại thực bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS, cho kết quả là Glycyrol trên các mức liều tăng dần có tác dụng làm giảm mRNA của các cytokine tiền viêm IL-1 $\beta$  và IL-6. Kích hoạt NF- $\kappa$ B do LPS gây ra đã được ngăn chặn trong các đại thực bào RAW264.7 bằng cách ức chế quá trình phosphoryl hóa I- $\kappa$ B $\alpha$ . Ngoài ra, sử dụng glycyrol (30 và 100 mg/kg, ip) làm giảm độ dày của sung phù chân chuột do carrageenan gây ra [30]. Trong dược liệu Cam thảo còn chứa các hoạt chất flavonoid, cho khả năng ức chế các cytokine tiết ra từ đại thực bào như TNF- $\alpha$ , IL-1, giúp làm giảm tiến triển của các bệnh viêm [62].

Tang kí sinh vị đắng tính bình quy kinh Can Thận, với nhiều thành phần hóa học có tác dụng chữa đau xương khớp như avicularin, quercetin. Võ Văn Anh và cộng sự năm 2012 nghiên cứu tác dụng của avicularin có trong dược liệu Tang kí sinh trên mô hình *invitro* cho thấy avicularin thể hiện hoạt tính chống viêm bằng cách ức chế sản xuất NO, PGE2 và ức chế giải phóng các cytokine [73]. Tác dụng chống viêm của Tang kí sinh cũng được chứng minh qua nghiên cứu Taguchi và cộng sự [69] về tác dụng chống viêm của

quercetin trên nhiều mô hình thử nghiệm khác nhau trên chuột lang, chuột cống và chuột nhắt. Kết quả cho thấy quercetin khi dùng đường uống với các mức liều 50, 100 và 200 mg/kg có tác dụng giảm phù ở chân chuột gây ra do các tác nhân khác nhau như carrageenan, dextran, histamine, serotonin và bradykinin. Ở liều 200 mg/kg, chất này còn ức chế phù do nước nóng (54°C).

Đương quy vị ngọt cay ôn, vào các kinh can, tâm, tỳ có tác dụng bổ huyết, hoạt huyết, điều kinh, giảm đau, nhuận tràng. Tác dụng giảm đau chống viêm của Đương quy được Chunchao Han và Jianyou Guo cùng thực hiện vào năm 2011 về hoạt động kháng khuẩn và chống viêm của cặp thảo mộc truyền thống Trung Quốc, *Angelica sinensis* (Đương quy) và *Sophora flavescens* (Hoàng cầm râu) cho kết quả là: Khả năng chống viêm của chiết xuất Đương quy (AE), chiết xuất Hoàng cầm râu (SE) và chiết xuất kết hợp 2 vị thảo mộc thông qua việc điều hòa yếu tố hạt nhân kappa-B (NF- $\kappa$ B), maleic dialdehyde (MDA), tế bào đa hình (PMN), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), oxit nitric cảm ứng synthase (iNOS) và yếu tố hoại tử khối u (TNF- $\alpha$ ), phân tử bám dính (ICAM-1) và cyclooxygenase-2 (COX-2) được xác định bằng ELISA [41].

Trong các nghiên cứu trên mô hình động vật với thành phần chính trong Tần giao là gentiopicoside được chứng minh là có tác dụng chống viêm. Nghiên cứu của Kondo, Y., Takano, F. và Hojo, H. (1994) tiến hành trên mô hình được kích thích viêm bằng LPS ở chuột bằng trực khuẩn Calmette-Guerin (BCG) làm tăng sự sản sinh các yếu tố hoại tử khối u (TNF- $\alpha$ ), các chất trung gian gây viêm chủ yếu trong huyết thanh với đỉnh ở 90-120 phút, sau đó là tăng hoạt động transaminase huyết thanh. Khi điều trị bằng gentiopicoside đã ngăn chặn đáng kể sự gia tăng TNF- $\alpha$  trong huyết thanh ở liều điều trị, có tác dụng chống viêm hiệu quả [49].

*Sự thay đổi mô bệnh học khớp gối*

Mức độ thoái hóa khớp gối được căn cứ vào các chỉ số tổn thương xương dưới sụn, tổn thương proteoglycan, tổn thương tế bào sụn và viêm màng hoạt dịch.

Thành phần xương dưới sụn nằm ngay bên dưới sụn khớp (đầu xương), có vai trò hỗ trợ sụn khớp trong việc chống sock, điều chỉnh áp lực trong khoang khớp để khớp có thể vận động bình thường. Xương dưới sụn cũng có nhiệm vụ cung cấp một phần dinh dưỡng cho lớp sụn nằm gần mặt xương dưới sụn, thúc đẩy quá trình chuyển hóa tại sụn khớp. Quá trình lão hóa và tác động của lực cơ học trong quá trình vận động làm thay đổi hình dạng và cấu trúc của xương dưới sụn. Trong quá trình thoái hóa, xương dưới sụn bị tổn thương dẫn đến có những phản ứng bất thường tạo thành các vùng xương rỗng, vùng xương dày - xơ xen kẽ, lâu ngày tạo thành gai xương. Xương dưới sụn bị hư tổn khiến lớp sụn mất đi điểm tựa chịu lực và một nguồn cung cấp dinh dưỡng. Đồng thời, sụn thoái hóa với các vết loét, nứt gãy, cũng lại là yếu tố làm hủy hoại xương dưới sụn. Tác động qua lại này khiến cho quá trình khớp thoái hóa xảy ra nhanh và trầm trọng hơn. Như vậy, ngăn chặn sự hủy hoại của hai thành phần này chính là giúp chặn quá trình thoái hóa khớp [40].

Sụn khớp được cấu tạo từ 80% nước, 5 – 10% là Proteoglycan và các sợi collagen typ II. Proteoglycan tạo thành từ protein lõi liên kết hoá trị với các Glycosaminoglycan (GAG), gắn với acid hyaluronic và phân bố trong mạng lưới collagen typ II. Cấu trúc này tạo thành lớp đệm hút nước, bôi trơn và giảm xóc tuyệt vời trong các khớp. Khi khớp gối bị tổn thương, các proteoglycan mất dần, các sợi collagen bị thoái hóa làm thay đổi cấu trúc và sự toàn vẹn chức năng của tổ chức. Các bằng chứng cho thấy, tế bào sụn đóng vai trò chủ yếu trong quá trình này, đó là làm tăng bất thường các enzyme proteolytic, đặc biệt là matrix metalloprotease (MMPs). Các enzyme

này gây biến đổi thoái hóa các bó sợi làm nên thành phần của sụn. Trong thoái hóa khớp, các enzyme collagenase, stromelysin I và gelatinase xuất hiện là thoái hóa các phân tử lớn của chất căn bản, trong khi các phân tử kết dính trong đó có nhiều enzyme họ odamalyisin có thể đóng vai trò trung tâm trong việc phá hủy cấu trúc của các phân tử kết dính. Các mảnh proteoglycan ít có hiệu quả giữ các phân tử nước hơn bình thường, làm giảm tác động các quá tải cơ học.

Tế bào sụn (chondrocytes): là tế bào trung mô chuyên biệt cao, cùng với collagen, proteoglycan, chất nền protein và lipit tạo nên sụn khớp. Tế bào sụn nằm rải rác khắp mô sụn. Trong quá trình phát triển của sụn, tế bào sụn không thay đổi về thể tích, có hình gần tròn. Tuy nhiên tế bào sụn có thể thay đổi hình thái tùy theo tuổi, tình trạng bệnh lý, vị trí chịu lực. Tế bào sụn thích hợp trong môi trường kỵ khí, được nuôi dưỡng bởi dịch khớp tiết ra từ bao hoạt dịch bằng hình thức khuếch tán. Tế bào sụn tổng hợp nên chất căn bản, dưới sự kích thích bởi các yếu tố hóa học (các cytokine và các yếu tố tăng trưởng) và yếu tố vật lý (lực tải, áp lực thủy tĩnh). Khi tế bào sụn bị tổn thương, sụn thoái hóa chuyển sang màu vàng nhạt hay nâu, mất tính đàn hồi, mỏng đi, khô và nứt. Khi bệnh tiếp tục tiến triển nặng lên sẽ xuất hiện những vết loét, mất dần tổ chức sụn làm trơ ra các đầu xương phía dưới, phần diềm xương, mọc thêm gai xương.

Tổn thương màng hoạt dịch là biểu hiện thứ phát và muộn hơn thường biến đổi xơ hoá màng hoạt dịch và bao khớp, đôi khi có viêm tràn dịch ổ khớp thứ phát do các mảnh sụn nhỏ bị bong trở thành các di vật nhỏ trong ổ khớp kích thích giống như viêm khớp do vi tinh thể. Mô bệnh học màng hoạt dịch trong thoái hóa khớp là hình ảnh không đồng nhất, từ biểu hiện tăng sinh rõ rệt lớp liên bào phủ và tập trung nhiều lympho và monocyct, đến màng xơ dày do thâm nhiễm các sợi xơ hóa mạnh. Các biểu hiện này gợi ý trong thoái hóa

khớp các tế bào bề mặt màng hoạt dịch giữ vai trò chủ yếu, như là các yếu tố kích thích tiền viêm. Nguyên nhân gây ra tổn thương màng hoạt dịch là do các yếu tố tấn công cơ học tác động trực tiếp lên mặt sụn gây ra sự hoạt hóa và giải phóng các enzyme làm thoái biến chất cận bã, dẫn đến phá hủy sụn khớp. Sự mất cân bằng giữa tổng hợp và thoái hóa của sụn khớp kéo theo sự tích nước tại mô sụn, do đó làm giảm độ chắc và độ đàn hồi của sụn. Các mảnh vỡ của sụn rơi vào trong ổ khớp sẽ dẫn tới viêm màng hoạt dịch. Hiện tượng mất cân bằng này lại càng gia tăng bởi các cytokines, đặc biệt là chất trung gian interleukin 1 (IL-1) có khả năng kích thích các tế bào sụn tiết enzym, làm tăng cường sự tiêu hủy của sụn, ức chế tế bào sụn tổng hợp collagen và proteoglycan, kết quả dẫn đến hủy hoại sụn không hồi phục.

Ở lô mô hình, tuần thứ 8 sau tiêm MIA, các tổn thương ở mức độ nhẹ đến trung bình, tăng cao rõ rệt so với lô chứng. Chuột ở lô mô hình có hình ảnh viêm thoái hóa khớp gối rõ với biểu hiện: khớp gối có màng hoạt dịch dày, bị xâm nhiễm nhiều tế bào viêm là lympho và đại thực bào; có nơi màng hoạt dịch bị hoại tử xơ huyết; các mao mạch máu sung huyết; mô sụn bị xơ hóa và thoái hóa hyalin.

Chuột ở các lô dùng thuốc KNC (lô trị 1, lô trị 2) và ở lô dùng indomethacin (lô tham chiếu) vẫn còn hình ảnh màng hoạt dịch dày, xâm nhiễm tế bào viêm, xung huyết mao mạch, tuy nhiên mức độ giảm nhiều so với ở lô mô hình, và chủ yếu được chẩn đoán là viêm tăng sinh màng hoạt dịch khớp gối. Các biểu hiện hoại tử, xơ hóa, thoái hóa nhìn thấy rõ ở lô mô hình thì ở các lô dùng thuốc không còn hoặc số lượng ít, nhìn không rõ.

So sánh giữa 2 lô dùng KNC với nhau, cũng như so sánh 2 lô dùng KNC với lô dùng indomethacin, hình ảnh mô bệnh học khớp gối phải của chuột ở các lô này không khác biệt nhau nhiều.

Ở lô uống indomethacin 2 mg/kg/ngày và lô dùng cao đặc KNC ở cả 2 mức liều, mức độ tổn thương giảm so với mô hình, thể hiện rõ nhất ở cấu trúc proteoglycan, màng hoạt dịch khớp gối, tổn thương sụn xương khớp, kết quả có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ . Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô dùng KNC ở 2 mức liều và lô dùng thuốc tham chiếu indomethacin với  $p > 0,05$ .

Khoang mỡ Hoffa là mô mỡ hiện diện trong khớp gối, dưới xương bánh chè, vị trí của nó gần với sụn khớp và mang hoạt dịch. Đây là nơi sản xuất ra nhiều cytokine và adipokine có vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh khớp gối. tình trạng viêm khối mỡ Hoffa gây đau mặt trước gối, vị trí gân bánh chè và bánh chè. Có thể có cảm giác khớp gối không vững hoặc kẹt khớp, tràn dịch khớp. Trên mô hình nghiên cứu cho thấy rằng, lô dùng cao đặc KNC ở cả 2 mức liều và indomethacin đều cho tác dụng làm giảm tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . So sánh giữa 2 lô dùng KNC với nhau, cũng như so sánh 2 lô dùng KNC với lô dùng indomethacin, điểm trung bình đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa của chuột ở các lô cho thấy tác dụng giảm viêm tương đương nhau, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Tác dụng chống viêm, giảm đau được chứng minh trong các mô hình nghiên cứu thông qua tác dụng làm giảm tổn thương mô dưới sụn, tổn thương proteoglycan, tổn thương tế bào sụn và viêm màng hoạt dịch của các dược liệu trong cao đặc KNC. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi là tương đồng với nghiên cứu của Weng đã công bố tác dụng điều trị thoái hóa khớp của polysaccharid trong Ngưu tất trên chuột cống SD. Polysaccharid là một đại phân tử với nhiều hoạt động sinh học, đóng một vai trò quan trọng trong các bệnh ở người [80],[29]. Gần đây, các nghiên cứu đã chứng minh rằng polysaccharit góp phần tăng sinh tế bào sụn [79],[56]. Vì sụn có khả năng phục hồi và tái tạo

kém nên việc tăng sinh tế bào sụn là rất cần thiết, có thể góp phần ức chế sự phát triển và tiến triển của viêm khớp [78]. Kết quả nghiên cứu trên mô hình thử nghiệm cho thấy tác dụng chống thoái hóa của Ngưu tất thông qua tác dụng làm tăng sinh sụn và tăng biểu hiện collagen typ II ở sụn [75]. Năm 2011, DaiXun Jiang, YiShan Chen và cộng sự tiến hành thực hiện đề tài nghiên cứu về ảnh hưởng của chiết xuất rễ cây *Paeonia lactiflora* (Bạch thược) đối với hoạt động có liên quan của cAMP-phosphodiesterase và tác dụng chống viêm, cho kết quả là Chiết xuất Bạch thược có sự ức chế đáng kể đối với hoạt động cAMP-PDE ( $p < 0,01$ ), hạn chế phụ thuộc liều vào vỡ hô hấp bạch cầu trung tính ( $p < 0,001$ ), ức chế ở nồng độ thấp và thúc đẩy ở nồng độ cao khi giải phóng elastase ( $p < 0,05$ ), và có sự hạn chế rõ ràng đối với tình trạng viêm cục bộ của mô hình động vật ( $p < 0,01$ ) [43]. Ngoài ra, sự phối hợp của một số dược liệu trong cao đặc KNC cũng được chứng minh qua nghiên cứu của Eum và cộng sự về tác dụng của chế phẩm CML – Một chiết xuất từ Đỗ trọng, Quế, Cam thảo, Bạch thược có tác dụng chống viêm và giảm đau tốt trên chuột cống [33].

Đề tài nghiên cứu của chúng tôi đã sơ bộ đánh giá được tác dụng của cao đặc KNC cả 2 liều 0,91g/kg và 1,88g/kg uống liên tục trong 7 tuần sau 1 tuần tiêm MIA đều thể hiện khả năng bảo vệ khớp gối trong thoái hóa khớp tương đối rõ, làm giảm hạn chế hoạt động khớp gối của chuột, giảm tổn thương khớp gối, giảm chỉ số interleukin và cải thiện cấu trúc sụn khớp trên vi thể. Có thể cho rằng, cơ chế tác dụng của cao đặc KNC liên quan đến giảm các chất trung gian hóa học, do trong thành phần của cao đặc có các vị thuốc như ngưu tất, bạch thược, đỗ trọng, cam thảo, tang ký **sinh**, đương quy... đã được chứng minh tác dụng giảm đau chống viêm và chống thoái hóa khớp trên thực nghiệm. Những kết luận này góp phần tạo tiền đề cho những nghiên

cứu tiếp theo, nhằm nghiên cứu sâu hơn về cơ chế chống viêm và sử dụng thuốc trên lâm sàng của cao đặc KNC.



## KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu trên mô hình gây thoái hóa khớp gối của chuột công bằng Monosodium iodoacetate (MIA) nhằm đánh giá tác dụng chống thoái hóa khớp của cao đặc KNC trên mô hình thực nghiệm, nhóm nghiên cứu đưa ra kết luận như sau:

### **1. Tác dụng của cao đặc KNC lên sự thay đổi hình dáng của khớp gối, ngưỡng đau và phản ứng đau trên thực nghiệm.**

Cao đặc KNC liều 0,94g cao đặc/kg/ngày và 1,88g cao đặc/kg/ngày dùng đường uống trong 7 tuần trên chuột công bằng gây thoái hóa khớp gối bằng Monosodium iodoacetate (MIA) có tác dụng chống viêm, giảm đau, chống thoái hóa khớp gối, thể hiện qua các chỉ tiêu: làm giảm đau do viêm, thoái hóa khớp gối thông qua làm tăng tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng của chân sau chuột ( $p < 0,001$  và  $p < 0,01$  so với lô mô hình ;  $p < 0,001$  so với trước dùng thuốc). Khi chuột bị viêm, thoái hóa khớp gối 1 bên, chịu đựng trọng lượng bên đau sẽ giảm so với bên đối diện, tỷ lệ phân phối chịu đựng trọng lượng giảm.

### **2. Tác dụng của cao đặc KNC trên một số chất trung gian hóa học gây viêm và mô bệnh học khớp gối trên thực nghiệm.**

#### ***2.1. Tác dụng của cao đặc KNC trên một số chất trung gian hóa học gây viêm***

- Làm giảm viêm thông qua làm giảm chất trung gian gây viêm PGE2 và các cytokines tiền viêm TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , và IL-6 trong huyết thanh chuột ( $p < 0,001$  so với lô mô hình)

#### ***2.2. Tác dụng của cao đặc KNC trên mô bệnh học khớp gối***

- Trên hình ảnh mô bệnh học khớp gối, cao đặc KNC liều 0,94g cao đặc/kg/ngày và 1,88g cao đặc/kg/ngày có tác dụng làm giảm xâm nhiễm tế

bào viêm, giảm xung huyết mao mạch, ít hoặc không còn biểu hiện hoại tử, xơ hóa, thoái hóa so với ở lô mô hình.

- Điểm trung bình đánh giá tổn thương mô bệnh học sụn xương khớp và điểm trung bình đánh giá tình trạng viêm khoang mỡ Hoffa ở các lô uống KNC giảm so với lô mô hình ( $p < 0,01$ ).

Các tác dụng lên sự thay đổi hình dáng khớp gối, ngưỡng đau, phản ứng đau, lên một số chất trung gian hóa học gây viêm và mô bệnh học khớp gối của cao đặc KNC tương đương với tác dụng của indomethacin liều 2 mg/kg/ngày.

**KIẾN NGHỊ**

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy cao đặc KNC có tác dụng chống viêm giảm đau tốt trên mô hình thoái hóa khớp gối, do đó chúng tôi đề xuất cao đặc KNC tiếp tục được nghiên cứu trên lâm sàng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. **Trần Ngọc Ân và Nguyễn Thị Ngọc Lan** (2004). “Thoái hóa khớp và thoái hóa cột sống”, *Bệnh học nội khoa tập I (dùng cho đối tượng sau đại học)*, Nhà xuất bản Y học.
2. **Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự** (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập I, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
3. **Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự** (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập II, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
4. **Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự** (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập III, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
5. **Bộ Y tế** (2018). Thông tư 29/2018/TT-BYT, Thông tư quy định về thử thuốc trên lâm sàng.
6. **Bộ Y tế** (2015). Thông tư 05/2015/TT-BYT Ban hành các danh mục thuốc đông y, thuốc từ dược liệu và vị thuốc y học cổ truyền thuộc phạm vi thanh toán của bảo hiểm y tế.
7. **Bộ Y tế** (2012). Thông tư 03/2012/TT-BYT, Thông tư hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng.
8. **Bộ Y tế** (2018). *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
9. **Lê Quang Cường chủ biên** (2015). *Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng đông y, thuốc từ dược liệu*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
10. **Nguyễn Ngọc Châu** (2012). *Nghiên cứu nồng độ IL-1, TNF  $\alpha$  và mật*

*độ khoáng xương ở bệnh nhân thoái hóa khớp*, Luận án tiến sỹ, Học viện Quân y.

11. **Đoàn Văn Đệ** (2004). Cơ chế bệnh sinh thoái hóa khớp, *Hội Thấp khớp học Việt Nam*, Hà Nội, tr 7-12
12. **Nguyễn Thị Thanh Hà, Trần Thị Giáng Hương** (2018). Tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của TD0015 trên thực nghiệm. Tạp chí nghiên cứu Y học.
13. **Nguyễn Nhược Kim chủ biên** (2015). *Phương tế học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
14. **Nguyễn Nhược Kim chủ biên** (2011). *Lý luận Y học cổ truyền*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
15. **Trần Văn Kỳ** (2014). *Dược học cổ truyền*. Nhà xuất bản Đồng Nai.
16. **Nguyễn Thị Ngọc Lan** (2012). “Thoái hóa khớp”, *Bệnh học cơ xương khớp nội khoa*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
17. **Đỗ Tất Lợi** (2015). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
18. **Uông Ngang**, Trần Văn Quảng dịch (2015). *Thang đầu ca quyết*, Nhà xuất bản Phương Đông.
19. **Vũ Bích Ngọc** (2018). *Mô hình động vật trong nghiên cứu các bệnh về khớp*, Bài giảng Tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
20. **Hoàng Duy Tân, Hoàng Anh Tuấn** (2016). *Phương tế học*, Nhà xuất bản Thuận Hóa.
21. **Nguyễn Văn Triệu** (2004). Cơ chế phân tử của sự thiếu hụt oxy trong hoạt hóa HIF ở tế bào sụn khớp bệnh nhân thoái hóa khớp, *Hội thấp khớp học Việt Nam*, tr 46- 48.
22. **Trường Đại học Y Hà Nội**, *Dược lý học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

## Tiếng Anh

23. **Allam MM, El-Gohary OA.** (2017). Gastroprotective effect of ghrelin against indomethacin-induced gastric injury in rats: possible role of heme oxygenase-1 pathway. *General physiology and biophysics*, 36: 321
24. **Dieppe P.A.** (1995). Recommended methodology for assessing the progression of osteoarthritis of the hip and knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*, 3, pg 73-77
25. **M. J. Janusz A., M. Bendele K., K. Brown 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 and Cartilage*, 10, pg 785-791.
26. **Golding M.B.** (2000). The role of the chondrocyte in osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, 43 (9), pg 1916-1926.
27. **Mingjian Bei, Faming Tian, Ning Liu, et al** (2019). A Novel Rat Model of Patellofemoral Osteoarthritis Due to Patella Baja, or Low-Lying Patella, *Med Sci Monit*, 25, pg 2702-2717.
28. **Aulin C., Lundback P., Palmblad K. et al** (2017). An *in vivo* cross-linkable hyaluronan gel with inherent anti-inflammatory properties reduces OA cartilage destruction in female mice subjected to cruciate ligament transection, *Osteoarthritis Cartilage*, 25, pg 157-165.
29. **Chen Y, Shen Z and Chen X.** Modulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on serum antioxidant enzymes activities in ovarian cancer rats. *Carbohydr Polym.* 78:258–262. 2009.
30. **Choi YY., Kim MH., Han JM et al** (2014). The anti-inflammatory potential of Cortex Phellodendron *in vivo* and *in vitro*: down-regulation of NO and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B and

MAPK activation. *The Immunopharmacol*, 19(2), 214 - 220

31. **Altman R.D., Gold G.E.** (2007). Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised, *Osteoarthritis Cartilage*, 15 (Suppl A), pg 1-56.
32. **Bove S.E., Calcaterra S.L., Brooker R.M. 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, pg 821-830
33. **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
34. **Barcelos F.** (2006). Obesity and cardiovascular risk factors in patients with osteoarthritis, *Ann Rheu Dis*, 65 (11), pg 223 -225.
35. **Felson, D.T.** (2006). Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*. 354: 841–848
36. **Joana F.G., Sara A., Raquel MS et al** (2012). Dose-dependent expression of neuronal injury markers during experimental osteoarthritis induced by monoiodoacetate in the rat. *Molecular Pain* 8, 50.
37. **Gao CM, Gao J, Ma RL, Xu XX, et al.** (2003). Research on analgesic and anti-inflammatory and invigorate circulation effects of total saponins of *Achyranthes*. *Anhui Med Pharm J*; 7:248-9
38. **Gou Y., Tian F., Kong Q. et al** (2018). Salmon calcitonin attenuates degenerative changes in cartilage and subchondral bone in lumbar facet joint in an experimental rat model, *Med Sci Monit*, 24, pg 2849-2857.
39. **Hardy M.M., Seibert K., Manning P.T. et al** (2002).

Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum*; 46(7):1789-803.

40. **Horton W.E, Bennion J.P, Yang L. et al** (2006). Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 6(4), 379-381.
41. **Chunchao Han & Jianyou Guo** (2011). Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of Traditional Chinese Herb Pairs, *Angelica sinensis* and *Sophora flavescens*, *Inflammation*, vol. 35, 913–919 (2012)
42. **Iijima H., Aoyama T., Ito A. et al** (2015). Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, 23, pg 1563-1574.
43. **Jiang, D., Chen, Y., Hou, X., Xu, J., Mu, X., & Chen, W.** (2011). Influence of *Paeonia lactiflora* roots extract on cAMP-phosphodiesterase activity and related anti-inflammatory action. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 914–920.
44. **Sokolove J., Lepus C.M.** (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations, *The Adv Musculoskelet Dis*, 5 (2), pg 45-66.
45. **Bedson J., Croft P.R.** (2008). The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: A systematic search and summary of the literature, *BMC Musculoskeletal Disorders*, pg 9-116.
46. **Collins N.J., Hinman R.S., Menz H.B. et al** (2017). Immediate effects of foot orthoses on pain during functional tasks in people with patellofemoral osteoarthritis: a cross-over, proof-of-concept



study, *Knee*, 24, pg76-81.

47. **Kanazawa H., Maruyama Y., Shitoto K. et al** (2017). Survival and clinical results of a modified “crosse de hockey” procedure for chronic isolated patellofemoral joint osteoarthritis: mid-term follow-up, *J Orthop Traumatol*, 18, pg 23-30.
48. **Kim JK, Park SW, Kang JW 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
49. **Kondo, Y., Takano, F., & Hojo, H.** (1994). *Suppression of Chemically and Immunologically Induced Hepatic Injuries by Gentiopicroside in Mice. Planta Medica*, 60(05), 414–416. doi:10.1055/s-2006-959521
50. **Lampropoulou-Adamidou K., Lelovas P., Karadimas E.V. et al** (2014). Useful animal models for the research of osteoarthritis, *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 24, pg 263-271.
51. **Lee Y.H., Yang J., Jeong H.K.** (2017). Suh JS. Assessment of the patellofemoral cartilage: Correlation of knee pain score with magnetic resonance cartilage grading and magnetization transfer ratio asymmetry of glycosaminoglycan chemical exchange saturation transfer, *Magn Reson Imaging*, 35, pg 61-68.
52. **Kuyinu E.L., Narayanan G., Nair L.S. et al** (2016). Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes, *J Orthop Surg Res*, 11, pg 19.
53. **Li ZK, Li DD.** (1997). The immunomodulatory effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides. *Yao Xue Xue Bao*; 32:881-7
54. **Li Y, Wang Y, Chubinskaya S, Schoeberl B et al.** (2015). Effects

of insulin-like growth factor-1 and dexamethasone on cytokine-challenged cartilage: relevance to post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 23:266–74

55. **Liu J1, Liu GX2, Shang MY., et al** (2020), “Identification based on HPLC and anti-inflammatory targets as well as related constituents analysis of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* and *A. sieboldii*” *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 45(6):1374-1383
56. **Li H, Li X, Liu G, et al.** *Bauhinia championi* (Benth.) Benth polysaccharides upregulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in chondrocytes. *Int J Mol Med.* 32:1329–1336. 2013.
57. **Louise Murphy, C. G. Helmick** (2012). The Impact of Osteoarthritis in the United States: A Population-Health Perspective, *AJN*, 113 (3), pg S13-S19.
58. **Ostergaard M., Court Payen M., Gideon P. et al** (1995). Ultrasonography in arthritis of the knee. A comparison with MR imaging, *Acta Radiol*, 36, pg 19-26.
59. **Udo M., Muneta T., Tsuji K. et al** (2016). Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems, *Osteoarthritis Cartilage*, 24, pg 1284-1291.
60. **S. Moncada and J. R. Vane** (1978), Prostaglandins, 16, pg 373-388.
61. **Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. (2006).** *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging.* *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14: 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014> PMID: 16242352.
62. **Peluso L, Raguzzini A., et al.** (2013), “Effect of flavonoids on circulating levels of TNF-alpha and IL-6 in humans: a systematic

- review and meta-analysis”, *Mol Nutr Food Res*, 57(5), pp. 784-801.
63. **Stoop R., Buma P., van der Kraan P.M. et al** (2000). Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection, *Arthritis Rheum*, 43, pg 2121-2131.
  64. **Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL, et al** (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *Dec 27*; 271(52):33157-60
  65. **Andreas Schäffler, Christa Büchler** (2007). Concise Review: Adipose Tissue Derived Stromal Cells-Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies, *Stem Cells*, 25, pg 818-827
  66. **Thitinan Srikulmontree** (2012). *Osteoarthritis*, The American College of Rheumatology.
  67. **Ikufumi Takahashi, Taro Matsuzaki, Hiroshi Kuroki** (2018). Induction of osteoarthritis by injecting monosodium iodoacetate into the patellofemoral joint of an experimental rat model, *PLoS One*, 13(4), pg e0196625.
  68. **Tang YF, An N, Li YH, et al.** (2016). Two new isoflavonoid glucosides from the roots of *Achyranthes bidentata* and their activities against nitric oxide production. *Phytochem Lett*; 17:187-9.
  69. **Taguchi K., Hagiwara Y., Kajiyama K., et al.** (1993), “Pharmacological studies of *Houttuynia herba*; the anti-inflammatory effect of quercitrin”, *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 113(4), pp. 327-333
  70. **Tsai P.H., Lee H.S., Siow T.Y. et al** (2016). Abnormal perfusion in patellofemoral subchondral bone marrow in the rat anterior cruciate ligament transection model of post-traumatic osteoarthritis: A

dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging study, *Osteoarthritis Cartilage*, 24, pg 129-193.

71. **Takahashi I., Matsuzaki T., Hosono M.** (2017). Long-term histopathological developments in knee-joint components in a rat model of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate, *J Phys Ther Sci*, 27, pg 590-597.
72. **Drew B.T., Redmond A.C., Smith T.O. et al** (2016). Which patellofemoral joint imaging features are associated with patellofemoral pain? Systematic review and meta-analysis, *Osteoarthritis Cartilage*, 24, pg 224-236.
73. **Vo VA, Lee JW, Chang JE, et al.** (2012) Avicularin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppressing ERK Phosphorylation in RAW 264.7 Macrophages. *Biomol Ther* 20(6):532-7
74. **Vuolteenaho K, Moilanen T, Hämäläinen M et al.** (2003). Regulation of nitric oxide production in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. Role of endogenous IL-1 inhibitors. *Scand J Rheumatol.* 32:19–24
75. **Weng X, Lin P, Liu F et al** (2014). Achyranthes bidentata polysaccharides activate the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway to promote chondrocyte proliferation. *Int J Mol Med*, 34(4), 1045 - 1050.
76. **Xiang DB, Jiang C, Li XY.** (1994). Influence of Achyranthes bidentata polysaccharides on function of Tlymphocytes and natural killer cells. *Chin J Pharmacol Toxicol*; 8:209-12.
77. **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 - 609

78. **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 - 487.
79. **Yu F, Li X, Cai L, et al.** Achyranthes bidentata polysaccharides induce chondrocyte proliferation via the promotion of the G1/S cell cycle transition. *Mol Med Rep*. 7:935–940. 2013.
80. **Yu Z, Che J, Ma X and He JM.** Effect of *Aloe vera* polysaccharides on immunity and antioxidant activities in oral ulcer animal models. *Carbohydr Polym*. 75:307–311. 2009
81. **Zhang X., Eyles J.P., Makovey J.** et al (2017). Is the effectiveness of patellofemoral bracing modified by patellofemoral alignment and trochlear morphology? *BMC Musculoskelet Disord*, 18, pg 168 .

**Phụ lục 1**

**NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP, ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN  
CỦA BÀI THUỐC KNC TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

**Phụ lục 2**

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM GIẢM ĐAU CỦA  
BÀI THUỐC KNC TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

[1]	<b>Trần Ngọc Ân và Nguyễn Thị Ngọc Lan</b> (2004). “Thoái hóa khớp và thoái hóa cột sống”, <i>Bệnh học nội khoa tập I (dùng cho đối tượng sau đại học)</i> , Nhà xuất bản Y học.
[2]	<b>Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự</b> (2006). <i>Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam</i> , tập I, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
[3]	<b>Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự</b> (2006). <i>Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam</i> , tập II, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
[4]	<b>Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương và cộng sự</b> (2006). <i>Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam</i> , tập III, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
[5]	<b>Bộ Y tế</b> (2018). Thông tư 29/2018/TT-BYT, Thông tư quy định về thử thuốc trên lâm sàng.
[6]	<b>Bộ Y tế</b> (2015). Thông tư 05/2015/TT-BYT Ban hành các danh mục thuốc đông y, thuốc từ dược liệu và vị thuốc y học cổ truyền thuộc phạm vi thanh toán của bảo hiểm y tế.
[7]	<b>Bộ Y tế</b> (2012). Thông tư 03/2012/TT-BYT, Thông tư hướng dẫn về thử thuốc trên lâm sàng.
[8]	<b>Bộ Y tế</b> (2018). <i>Dược điển Việt Nam</i> , lần xuất bản thứ năm, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[9]	<b>Lê Quang Cường chủ biên</b> (2015). <i>Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng đông y, thuốc từ dược liệu</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[10]	<b>Nguyễn Ngọc Châu</b> (2012). <i>Nghiên cứu nồng độ IL-1, TNF <math>\alpha</math> và mật</i>



	<i>độ khoáng xương ở bệnh nhân thoái hóa khớp</i> , Luận án tiến sỹ, Học viện Quân y.
[11]	<b>Đoàn Văn Đệ</b> (2004). Cơ chế bệnh sinh thoái hóa khớp, <i>Hội Thấp khớp học Việt Nam</i> , Hà Nội, tr 7-12
[12]	<b>Nguyễn Thị Thanh Hà, Trần Thị Giáng Hương</b> (2018). Tác dụng điều trị thoái hóa khớp gối của TD0015 trên thực nghiệm. Tạp chí nghiên cứu Y học.
[13]	<b>Nguyễn Nhược Kim chủ biên</b> (2015). <i>Phương tế học</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[14]	<b>Nguyễn Nhược Kim chủ biên</b> (2011). <i>Lý luận Y học cổ truyền</i> , Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
[15]	<b>Trần Văn Kỳ</b> (2014). <i>Dược học cổ truyền</i> . Nhà xuất bản Đồng Nai.
[16]	<b>Nguyễn Thị Ngọc Lan</b> (2012). “Thoái hóa khớp”, <i>Bệnh học cơ xương khớp nội khoa</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[17]	<b>Đỗ Tất Lợi</b> (2015). <i>Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam</i> , Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
[18]	<b>Uông Ngang, Trần Văn Quảng dịch</b> (2015). <i>Thang đầu ca quyết</i> , Nhà xuất bản Phương Đông.
[19]	<b>Vũ Bích Ngọc</b> (2018). <i>Mô hình động vật trong nghiên cứu các bệnh về khớp</i> , Bài giảng Tế bào gốc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.
[20]	<b>Hoàng Duy Tân, Hoàng Anh Tuấn</b> (2016). <i>Phương tế học</i> , Nhà xuất bản Thuận Hóa.
[21]	<b>Nguyễn Văn Triệu</b> (2004). Cơ chế phân tử của sự thiếu hụt oxy trong hoạt hóa HIF ở tế bào sụn khớp bệnh nhân thoái hóa khớp, <i>Hội thấp khớp học Việt Nam</i> , tr 46- 48.
[22]	<b>Trường Đại học Y Hà Nội, Dược lý học lâm sàng</b> , Nhà xuất bản Y

học, Hà Nội.

### Tiếng Anh

[23]	<b>Allam MM, El-Gohary OA.</b> (2017). Gastroprotective effect of ghrelin against indomethacin-induced gastric injury in rats: possible role of heme oxygenase-1 pathway. <i>General physiology and biophysics</i> , 36: 321
[24]	<b>Dieppe P.A.</b> (1995). Recommended methodology for assessing the progression of osteoarthritis of the hip and knee joints. <i>Osteoarthritis Cartilage</i> , 3, pg 73-77
[25]	<b>M. J. Janusz A., M. Bendele K., K. Brown et al</b> (2002). Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor, <i>Osteoarthritis and Cartilage</i> , 10, pg 785-791.
[26]	<b>Golding M.B.</b> (2000). The role of the chondrocyte in osteoarthritis, <i>Arthritis Rheum</i> , 43 (9), pg 1916-1926.
[27]	<b>Mingjian Bei, Faming Tian, Ning Liu, et al</b> (2019). A Novel Rat Model of Patellofemoral Osteoarthritis Due to Patella Baja, or Low-Lying Patella, <i>Med Sci Monit</i> , 25, pg 2702-2717.
[28]	<b>Aulin C., Lundback P., Palmblad K. et al</b> (2017). An <i>in vivo</i> cross-linkable hyaluronan gel with inherent anti-inflammatory properties reduces OA cartilage destruction in female mice subjected to cruciate ligament transection, <i>Osteoarthritis Cartilage</i> , 25, pg 157-165.
[29]	<b>Chen Y, Shen Z and Chen X.</b> Modulatory effect of <i>Ganoderma lucidum</i> polysaccharides on serum antioxidant enzymes activities in ovarian cancer rats. <i>Carbohydr Polym.</i> 78:258–262. 2009.
[30]	<b>Choi YY., Kim MH., Han JM et al</b> (2014). The anti-inflammatory potential of Cortex Phellodendron <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> : down-

	regulation of NO and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B and MAPK activation. <i>The Immunopharmacol</i> , 19(2), 214 - 220
[31]	<b>Altman R.D., Gold G.E.</b> (2007). Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised, <i>Osteoarthritis Cartilage</i> , 15 (Suppl A), pg 1-56.
[32]	<b>Bove S.E., Calcaterra S.L., Brooker R.M. et al</b> (2003). Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis, <i>Osteoarthritis Cartilage</i> , 11, pg 821-830
[33]	<b>Eum HA, Lee WY, Kim SH et al</b> (2005). Anti-inflammatory activity of CML-1: an herbal formulation. <i>Am J Chin Med</i> , 33(1), 29 - 40
[34]	<b>Barcelos F.</b> (2006). Obesity and cardiovascular risk factors in patients with osteoarthritis, <i>Ann Rheu Dis</i> , 65 (11), pg 223 -225.
[35]	<b>Felson, D.T.</b> (2006). Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. <i>N Engl J Med</i> . 354: 841–848
[36]	<b>Joana F.G., Sara A., Raquel MS et al</b> (2012). Dose-dependent expression of neuronal injury markers during experimental osteoarthritis induced by monoiodoacetate in the rat. <i>Molecular Pain</i> 8, 50.
[37]	<b>Gao CM, Gao J, Ma RL, Xu XX, et al.</b> (2003). Research on analgesic and anti-inflammatory and invigorate circulation effects of total saponins of <i>Achyranthes</i> . <i>Anhui Med Pharm J</i> ; 7:248-9
[38]	<b>Gou Y., Tian F., Kong Q. et al</b> (2018). Salmon calcitonin attenuates degenerative changes in cartilage and subchondral bone in lumbar facet joint in an experimental rat model, <i>Med Sci Monit</i> , 24, pg 2849-2857.

[39]	<b>Hardy M.M., Seibert K., Manning P.T. et al</b> (2002). Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. <i>Arthritis Rheum</i> ; 46(7):1789-803.
[40]	<b>Horton W.E, Bennion J.P, Yang L. et al</b> (2006). Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. <i>J Musculoskelet Neuronal Interact</i> , 6(4), 379-381.
[41]	<b>Chunchao Han &amp; Jianyou Guo</b> (2011). Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of Traditional Chinese Herb Pairs, <i>Angelica sinensis</i> and <i>Sophora flavescens</i> , <i>Inflammation</i> , vol. 35, 913–919 (2012)
[42]	<b>Iijima H., Aoyama T., Ito A. et al</b> (2015). Effects of short-term gentle treadmill walking on subchondral bone in a rat model of instability-induced osteoarthritis, <i>Osteoarthritis Cartilage</i> , 23, pg 1563-1574.
[43]	<b>Jiang, D., Chen, Y., Hou, X., Xu, J., Mu, X., &amp; Chen, W.</b> (2011). Influence of <i>Paeonia lactiflora</i> roots extract on cAMP-phosphodiesterase activity and related anti-inflammatory action. <i>Journal of Ethnopharmacology</i> , 137(1), 914–920.
[44]	<b>Sokolove J., Lepus C.M.</b> (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations, <i>Ther Adv Musculoskelet Dis</i> , 5 (2), pg 45-66.
[45]	<b>Bedson J., Croft P.R.</b> (2008). The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: A systematic search and summary of the literature, <i>BMC Musculoskeletal Disorders</i> , pg 9-116.
[46]	<b>Collins N.J., Hinman R.S., Menz H.B. et al</b> (2017). Immediate effects of foot orthoses on pain during functional tasks in people with

	patellofemoral osteoarthritis: a cross-over, proof-of-concept study, <i>Knee</i> , 24, pg76-81.
[47]	<b>Kanazawa H., Maruyama Y., Shitoto K. et al</b> (2017). Survival and clinical results of a modified “crosse de hockey” procedure for chronic isolated patellofemoral joint osteoarthritis: mid-term follow-up, <i>J Orthop Traumatol</i> , 18, pg 23-30.
[48]	<b>Kim JK, Park SW, Kang JW et al</b> (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
[49]	<b>Kondo, Y., Takano, F., &amp; Hojo, H.</b> (1994). <i>Suppression of Chemically and Immunologically Induced Hepatic Injuries by Gentiopicroside in Mice. Planta Medica</i> , 60(05), 414–416. doi:10.1055/s-2006-959521
[50]	<b>Lampropoulou-Adamidou K., Lelovas P., Karadimas E.V. et al</b> (2014). Useful animal models for the research of osteoarthritis, <i>Eur J Orthop Surg Traumatol</i> , 24, pg 263-271.
[51]	<b>Lee Y.H., Yang J., Jeong H.K.</b> (2017). Suh JS. Assessment of the patellofemoral cartilage: Correlation of knee pain score with magnetic resonance cartilage grading and magnetization transfer ratio asymmetry of glycosaminoglycan chemical exchange saturation transfer, <i>Magn Reson Imaging</i> , 35, pg 61-68.
[52]	<b>Kuyinu E.L., Narayanan G., Nair L.S. et al</b> (2016). Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes, <i>J Orthop Surg Res</i> , 11, pg 19.
[53]	<b>Li ZK, Li DD.</b> (1997). The immunomodulatory effect of <i>Achyranthes bidentata</i> polysaccharides. <i>Yao Xue Xue Bao</i> ; 32:881-7

[54]	<b>Li Y, Wang Y, Chubinskaya S, Schoeberl B et al.</b> (2015). Effects of insulin-like growth factor-1 and dexamethasone on cytokine-challenged cartilage: relevance to post-traumatic osteoarthritis. <i>Osteoarthr Cartil.</i> 23:266–74
[55]	<b>Liu J1, Liu GX2, Shang MY., et al</b> (2020), “Identification based on HPLC and anti-inflammatory targets as well as related constituents analysis of <i>Asarum heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i> and <i>A. sieboldii</i> ” <i>Zhongguo Zhong Yao Za Zhi</i> , 45(6):1374-1383
[56]	<b>Li H, Li X, Liu G, et al.</b> <i>Bauhinia championi</i> (Benth.) Benth polysaccharides upregulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in chondrocytes. <i>Int J Mol Med.</i> 32:1329–1336. 2013.
[57]	<b>Louise Murphy, C. G. Helmick</b> (2012). The Impact of Osteoarthritis in the United States: A Population-Health Perspective, <i>AJN</i> , 113 (3), pg S13-S19.
[58]	<b>Ostergaard M., Court Payen M., Gideon P. et al</b> (1995). Ultrasonography in arthritis of the knee. A comparison with MR imaging, <i>Acta Radiol</i> , 36, pg 19-26.
[59]	<b>Udo M., Muneta T., Tsuji K. et al</b> (2016). Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems, <i>Osteoarthritis Cartilage</i> , 24, pg 1284-1291.
[60]	<b>S. Moncada and J. R. Vane</b> (1978), Prostaglandins, 16, pg 373-388.
[61]	<b>Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. (2006).</b> <i>Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging.</i> <i>Osteoarthritis Cartilage.</i> 2006; 14: 13–29. <a href="https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014">https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014</a> PMID: 16242352.
[62]	<b>Peluso L, Raguzzini A., et al.</b> (2013), “Effect of flavonoids on

	circulating levels of TNF-alpha and IL-6 in humans: a systematic review and meta-analysis”, <i>Mol Nutr Food Res</i> , 57(5), pp. 784-801.
[63]	<b>Stoop R., Buma P., van der Kraan P.M. et al</b> (2000). Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection, <i>Arthritis Rheum</i> , 43, pg 2121-2131.
[64]	<b>Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL, et al</b> (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. <i>Dec 27</i> ; 271(52):33157-60
[65]	<b>Andreas Schäffler, Christa Büchler</b> (2007). Concise Review: Adipose Tissue Derived Stromal Cells-Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies, <i>Stem Cells</i> , 25, pg 818-827
[66]	<b>Thitinan Srikulmontree</b> (2012). <i>Osteoarthritis</i> , The American College of Rheumatology.
[67]	<b>Ikufumi Takahashi, Taro Matsuzaki, Hiroshi Kuroki</b> (2018). Induction of osteoarthritis by injecting monosodium iodoacetate into the patellofemoral joint of an experimental rat model, <i>PLoS One</i> , 13(4), pg e0196625.
[68]	<b>Tang YF, An N, Li YH, et al.</b> (2016). Two new isoflavonoid glucosides from the roots of <i>Achyranthes bidentata</i> and their activities against nitric oxide production. <i>Phytochem Lett</i> ; 17:187-9.
[69]	<b>Taguchi K., Hagiwara Y., Kajiyama K., et al.</b> (1993), “Pharmacological studies of <i>Houttuynia herba</i> ; the anti-inflammatory effect of quercitrin”, <i>Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan</i> , 113(4), pp. 327-333
[70]	<b>Tsai P.H., Lee H.S., Siow T.Y. et al</b> (2016). Abnormal perfusion in patellofemoral subchondral bone marrow in the rat anterior cruciate

	ligament transection model of post-traumatic osteoarthritis: A dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging study, <i>Osteoarthritis Cartilage</i> , 24, pg 129-193.
[71]	<b>Takahashi I., Matsuzaki T., Hosono M.</b> (2017). Long-term histopathological developments in knee-joint components in a rat model of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate, <i>J Phys Ther Sci</i> , 27, pg 590-597.
[72]	<b>Drew B.T., Redmond A.C., Smith T.O. et al</b> (2016). Which patellofemoral joint imaging features are associated with patellofemoral pain? Systematic review and meta-analysis, <i>Osteoarthritis Cartilage</i> , 24, pg 224-236.
[73]	<b>Vo VA, Lee JW, Chang JE, et al.</b> (2012) Avicularin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppressing ERK Phosphorylation in RAW 264.7 Macrophages. <i>Biomol Ther</i> 20(6):532-7
[74]	<b>Vuolteenaho K, Moilanen T, Hämäläinen M et al.</b> (2003). Regulation of nitric oxide production in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. Role of endogenous IL-1 inhibitors. <i>Scand J Rheumatol</i> . 32:19–24
[75]	<b>Weng X, Lin P, Liu F et al</b> (2014). Achyranthes bidentata polysaccharides activate the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway to promote chondrocyte proliferation. <i>Int J Mol Med</i> , 34(4), 1045 - 1050.
[76]	<b>Xiang DB, Jiang C, Li XY.</b> (1994). Influence of Achyranthes bidentata polysaccharides on function of Tlymphocytes and natural killer cells. <i>Chin J Pharmacol Toxicol</i> ; 8:209-12.
[77]	<b>Xu Y, Dai GJ, Liu Q et al</b> (2014). Effect of Ermiao Recipe with



	medicinal guide <i>Angelicae Pubescentis Radix</i> on promoting the homing of bone marrow stem cells to treat cartilage damage in osteoarthritis rats. <i>Chin J Intergr Med</i> , 20(8), 600 - 609
[78]	<b>Xu Y, Dai G, Liu Q et al</b> (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. <i>J Tradit Chin Med</i> , 34(4), 477 - 487.
[79]	<b>Yu F, Li X, Cai L, et al.</b> <i>Achyranthes bidentata</i> polysaccharides induce chondrocyte proliferation via the promotion of the G1/S cell cycle transition. <i>Mol Med Rep</i> . 7:935–940. 2013.
[80]	<b>Yu Z, Che J, Ma X and He JM.</b> Effect of <i>Aloe vera</i> polysaccharides on immunity and antioxidant activities in oral ulcer animal models. <i>Carbohydr Polym</i> . 75:307–311. 2009
[81]	<b>Zhang X., Eyles J.P., Makovey J.</b> et al (2017). Is the effectiveness of patellofemoral bracing modified by patellofemoral alignment and trochlear morphology? <i>BMC Musculoskelet Disord</i> , 18, pg 168 .