

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



NGUYỄN NGỌC KHÁNH

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ
XƠ GAN CỦA VIÊN NANG CTHEPAB
TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

LUẬN ÁN 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



NGUYỄN NGỌC KHÁNH

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU TRỊ
XƠ GAN CỦA VIÊN NANG CTHEPAB
TRÊN ĐỘNG VẬT THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành : Y học cổ truyền

Mã số : 8720115

LUẬN VĂN THẠC SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. Đậ Xuân Cảnh**
- 2. PGS.TS. Lê Thị Tuyết**

HÀ NỘI - 2020

LỜI CẢM ƠN

Để 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 PGS.TS Đậu Xuân Cảnh, PGS.TS Lê Thị Tuyết, người đã tận tâm giúp đỡ, hướng dẫn, chỉ bảo và động viên tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án và cả trong cuộc sống hàng ngày.

Tôi xin cảm ơn PGS.TS Nguyễn Hoàng Ngân cùng các cán bộ Học Viện Quân Y đã giúp tôi xây dựng mô hình nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các tác giả có tên trong các bài báo khoa học đã công bố đã hỗ trợ và giúp đỡ tôi trong quá trình tiến hành các thí nghiệm của luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới tập thể các Giáo sư, Phó giáo sư, Tiến sĩ trong Hội đồng thông qua đề cương, Hội đồng chấm luận văn Thạc sĩ là những người thầy, những nhà khoa học đã đóng góp cho tôi nhiều ý kiến quý báu để tôi hoàn thiện và bảo vệ thành công luận văn này.

Cuối cùng, tôi muốn bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới những người thân trong gia đình đã luôn giúp đỡ, động viên trong quá trình học tập và nghiên cứu. Cảm ơn các anh chị em, các bạn, đồng nghiệp, những người luôn đồng hành cùng tôi, động viên và chia sẻ trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu đã qua.

Xin trân trọng cảm ơn!

HỌC VIÊN

Nguyễn Ngọc Khánh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Ngọc Khánh, Học viên Lớp cao học 10 khóa 2017-2019 chuyên ngành Y học cổ truyền - Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, xin cam đoan:

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

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

Hà Nội, tháng 8 năm 2020

Tác giả

Nguyễn Ngọc Khánh

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. Tổng quan bệnh học xơ gan.....	3
1.1.1. Định nghĩa	3
1.1.2. Dịch tễ học.....	3
1.1.3. Bệnh nguyên.....	4
1.1.4. Sinh lý bệnh của xơ hóa gan và xơ gan.....	5
1.1.5. Mô bệnh xơ gan sau hoại tử	7
1.1.6. Lâm sàng	9
1.1.7. Cận lâm sàng	9
1.1.8. Chẩn đoán xác định	9
1.1.9. Điều trị.....	10
1.1.10. Theo y học cổ truyền	11
1.2. Các mô hình gây xơ gan trên động vật thí nghiệm.....	13
1.2.1. Gây xơ gan bằng các tác nhân hóa học	13
1.2.2. Gây xơ gan bằng phương pháp thắt ống dẫn mật.....	16
1.3. Viên nang cứng CT _{HepaB}	17
1.3.1. Cơ sở xây dựng của chế phẩm thuốc nghiên cứu CT _{HepaB}	17
1.3.2. Viên nang cứng CT _{HepaB}	17
1.3.3. Tác dụng các vị trong bài thuốc.	18
1.4. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước về xơ gan – viêm gan virus B.....	23
1.4.1. Nghiên cứu ngoài nước	23
1.4.2. Nghiên cứu trong nước.....	25
CHƯƠNG 2: CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN	
CỨU	27
2.1. Chất liệu nghiên cứu	27
2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu.....	27

2.1.2. Thuốc đối chứng.....	28
2.1.3. Thuốc gây mô hình xơ gan trên chuột cống trắng.....	28
2.1.4. Phương tiện – Hóa chất nghiên cứu khác.....	29
2.2. Đối tượng nghiên cứu	30
2.2.1. Đối tượng.....	30
2.2.2. Tiêu chuẩn chọn mẫu	30
2.2.3. Động vật sử dụng trong nghiên cứu	31
2.3. Địa điểm nghiên cứu.....	31
2.4. Thời gian nghiên cứu	31
2.5. Phương pháp nghiên cứu	31
2.5.1. Thiết kế nghiên cứu.....	31
2.5.2. Các bước nghiên cứu.....	31
2.5.3. Cách tiến hành nghiên cứu	32
2.6. Chỉ tiêu nghiên cứu.....	39
2.6.1. Triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng	39
2.6.2. Nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CT _{HepaB} trên mô hình động vật thực nghiệm	39
2.7. Xử lý số liệu.....	39
2.8. Sai số và cách không chế sai số.....	39
2.9. Đạo đức nghiên cứu	40
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	41
3.1. Kết quả nghiên cứu triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng.....	41
3.1.1. Kết quả đánh giá về thể trạng chuột.....	41
3.1.2. Kết quả biến đổi enzym AST và ALT của gan chuột	42
3.1.3. Kết quả thay đổi đại thể gan chuột.....	44
3.1.4. Kết quả thay đổi vi thể gan chuột.....	46
3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CT _{HepaB} trên mô hình động vật thực nghiệm.	48
3.2.1. Kết quả đánh giá về thể trạng chuột.....	48

3.2.2. Kết quả đánh giá về một số chỉ tiêu trong máu chuột	49
3.2.3. Kết quả đánh giá về một số chỉ tiêu trong gan chuột	53
3.2.4. Kết quả đánh giá về hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột.....	55
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	58
4.1. Nghiên cứu triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng.	58
4.2. Nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CTHePaB trên mô hình động vật thực nghiệm	60
KẾT LUẬN	69
KHUYẾN NGHỊ.....	70
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AST	Aspartate transaminase
ALT	Alanine aminotransferase
Anti-HBc	Antibody to hepatitis B core antigen
CD4, 8	Cluster of Differentiation 4,8
CPY450	Cytochromes P450
CCl ₄	Carbon tetrachloride
DMN	Dimethylnitrosamine
DEN	Diethylnitrosamine
ECM	Extracellular matrix
GGT	Gamma Glutamyl transferase
HbsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B virus
HBV-DNA	Hepatitis B virus - Deoxyribonucleic Acid
HCV	Hepatitis C virus
HE	Hematoxylin Eosin
ICH	International Conference on Harmonization
NASH	Nonalcoholic Fatty Steatohepatitis
NK	Natural killer cell
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
TAA	ThioAcetAmide
TGF	Transforming growth factor
WHO	World Health Organization
α -SMA	α -smooth muscle actin

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1.	Bậc hoặc điểm số mô bệnh học tương đương để phân độ giai đoạn xơ hóa gan	8
Bảng 1.2.	Thang điểm để đánh giá giai đoạn xơ gan theo chỉ số Child – Pugh..	10
Bảng 3.1.	Kết quả đánh giá cân nặng của chuột nghiên cứu	41
Bảng 3.2.	Hoạt độ enzym AST trung bình trong máu chuột tăng tại các thời điểm nghiên cứu	42
Bảng 3.3.	Hoạt độ enzym ALT trung bình trong máu chuột tăng tại các thời điểm nghiên cứu	43
Bảng 3.4.	Tác dụng của CTHepaB lên cân nặng của chuột nghiên cứu	48
Bảng 3.5.	Tác dụng CTHepaB lên AST của chuột nghiên cứu	49
Bảng 3.6.	Tác dụng CTHepaB lên ALT của chuột nghiên cứu	50
Bảng 3.7.	Tác dụng CTHepaB lên nồng độ albumin huyết tương trong máu chuột nghiên cứu	51
Bảng 3.8.	Tác dụng CTHepaB lên thời gian prothrombin của máu chuột nghiên cứu	52
Bảng 3.9.	Tác dụng CTHepaB lên hàm lượng hydroxyprolin trong gan chuột nghiên cứu	53
Bảng 3.10.	Tác dụng CTHepaB lên cân nặng gan chuột nghiên cứu	54
Bảng 3.11.	Ảnh hưởng của Viên nang CTHepaB lên hình ảnh đại thể gan chuột	55
Bảng 3.12.	Ảnh hưởng của Viên nang CTHepaB lên hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột	57

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1.	Cấu trúc xoang và vị trí tế bào sao ở gan bình thường	5
Hình 1.2.	Xơ gan - Mô sợi xơ tăng sản phân cắt gan thành các tiểu thùy giả và thâm nhập nhiều tế bào viêm mạn.....	8
Hình 1.3.	Cải thiện xơ hóa sau 3 năm điều trị lamivudine cho bệnh nhân viêm gan B mạn tính	10
Hình 1.4.	Dạng thô của các vị thuốc trong bài thuốc CTHePaB.....	18
Hình 1.5.	Cà gai leo.....	18
Hình 1.6.	Cỏ sữa lá nhỏ.....	19
Hình 1.7.	Chi tử.....	19
Hình 1.8.	Đại Hoàng.....	20
Hình 1.9.	Đinh lăng	20
Hình 1.10.	Nấm trùng thảo.....	21
Hình 1.11.	Nấm linh chi đỏ.....	22
Hình 1.12.	Hà thủ ô đỏ	22
Hình 2.1.	Viên nang cứng CTHePaB dùng để thử trên chuột cống trắng.....	27
Hình 2.2.	Thuốc đối chứng Silymarin, biệt dược Legalon.....	28
Hình 2.3.	Máy xét nghiệm huyết học và sinh hóa.....	29
Hình 2.4.	Chuột cống trắng chủng Wistar.....	30
Hình 2.5.	Cho chuột ăn.....	32
Hình 2.6.	Cân gan chuột.....	34
Hình 2.7.	Phân tích lấy gan, lách thận quan sát đại thể và làm mô bệnh học	36
Hình 2.8.	Chuột uống thuốc bằng kim đầu tù	36
Hình 2.9.	Lấy máu hóc mắt chuột làm xét nghiệm	37
Hình 2.10.	Máy đo quang Biochrom.....	37
Hình 3.1.	Hình ảnh đại thể gan chuột tại thời điểm 6 tuần	44
Hình 3.2.	Hình ảnh đại thể gan chuột tại thời điểm 8 tuần	44
Hình 3.3.	Hình ảnh đại thể gan chuột tại thời điểm 10 tuần	45

Hình 3.4.	Hình ảnh vi thể gan chuột (HE x 400) tại thời điểm 6 tuần	46
Hình 3.5.	Hình ảnh vi thể gan chuột (HE x 400) tại thời điểm 8 tuần	46
Hình 3.6.	Hình ảnh vi thể gan chuột (HE x 400) tại thời điểm 10 tuần	47
Hình 3.7.	Hình ảnh đại thể gan chuột:.....	55
Hình 3.8 .	Hình ảnh vi thể gan chuột nhuộm HEx400:.....	56
Hình 3.9.	Hình ảnh vi thể gan chuột nhuộm Masson HEx400:	56
Hình 4.1.	Hình ảnh vi thể gan chuột (HE x 400) tại thời điểm 10 tuần	60

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 1.1.	Nguyên nhân gây xơ gan.....	4
Biểu đồ 1.2.	Sự hoạt hóa tế bào sao và xơ hóa gan	6
Biểu đồ 2.1.	Mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng	33
Biểu đồ 2.2.	Mô hình đánh giá tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CTHePaB trên mô hình động vật thực nghiệm	34

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh gan mạn tính bao gồm một số các bệnh cảnh lâm sàng có bệnh nguyên khác nhau, trong đó, nguyên nhân do virus viêm gan B, virus viêm gan C và viêm gan do rượu đóng vai trò quan trọng. Viêm gan B và C mạn tính là nguyên nhân phổ biến nhất của ung thư gan, xơ gan và có thể gây tử vong [67]. Với hơn 1 triệu ca tử vong, xơ gan được xếp vào nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 11 trên thế giới [66].

Hiện nay, các nhà lâm sàng xem xét xơ hóa gan với cái nhìn mới. Trước đây, xơ hóa gan được cho là một quá trình không thể đảo ngược do các tế bào chủ mô gan bình thường được thay thế bởi các tổ chức mô giàu collagen. Trong hai thập niên qua, nhờ những tiến bộ trong hiểu biết về xơ hóa gan mức độ phân tử cho phép mở ra hướng điều trị kháng xơ hóa [29][65], tiến trình xơ hóa gan có khả năng ngừng hoặc hồi phục nếu được điều trị thích hợp [22]. Mặc dù vậy hiện tại vẫn chưa có thuốc nào được phê duyệt cho mục đích dự phòng và điều trị xơ hóa tiến triển [35]. Từ đó đặt ra vấn đề cấp thiết trong việc tìm kiếm và nghiên cứu nghiêm túc các loại thuốc có khả năng chống xơ hóa, phục hồi mô tổn thương.

Trong bối cảnh đó, nhiều mô hình gây xơ hóa gan trên động vật đã được xây dựng. Có nhiều mô hình đã được đề xuất và gây xơ hóa bằng carbon tetrachlorid (CCl_4) trên chuột thí nghiệm là một trong những mô hình được sử dụng phổ biến nhất [32]. Tuy nhiên, mô hình này vẫn còn tồn tại nhiều khác biệt giữa các nghiên cứu liên quan đến đường dùng, thời gian dùng và chế độ liều của tác nhân gây xơ hóa, cũng như các chủng động vật thí nghiệm. Thời gian gây xơ có thể đến hơn 12 tuần [34][26]. Để tạo ra một mô hình có gan xơ gan lại đảm bảo chuột an toàn, dựa theo mô hình mà tác giả Li C và cộng sự [26] đã mô tả phương pháp gây xơ bằng cả hóa chất, rượu và chế độ ăn, chúng tôi triển khai mô hình tương tự với chế độ ăn có thêm ion sắt và dầu mỡ chiên rán nhiều lần. Việc triển khai thành công mô hình xơ gan trên thực nghiệm sẽ tạo tiền đề thuận lợi để đánh giá một cách chính xác tác dụng của dược phẩm trong xơ hóa gan.

Viên nang cứng CTHePaB được xây dựng từ bài thuốc kinh nghiệm của Phó Giáo Sư Đẩu Xuân Cảnh, đã có hiệu quả nhất định trên lâm sàng, gồm tám vị thuốc: cà gai leo, cỏ sữa lá nhỏ, đông trùng hạ thảo, hà thủ ô đỏ, linh chi, đại hoàng, chi tử, rế đing lãng . Một số vị thuốc trong bài đã được khoa học chứng minh tốt cho xơ gan, đặc biệt cà gai leo. Các hoạt chất như glycoalkaloid trong cà gai leo được chứng minh là có tác dụng ngăn chặn xơ gan tiến triển, từ đó giúp người bệnh viêm gan B chặn đứng nguy cơ biến chứng sang xơ gan [12][16]. Tuy nhiên chưa có nghiên cứu khoa học nào về tác dụng của CTHePaB trên gan bị xơ hóa. Vì vậy kết hợp với mô hình gây xơ gan cho chuột ở trên và việc đánh giá tác dụng chống xơ hóa của viên nang cứng CTHePaB, chúng tôi thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CTHePaB trên động vật thực nghiệm”** với mục tiêu:

- 1. Nghiên cứu triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng.*
- 2. Đánh giá tác dụng điều trị xơ gan của viên nang cứng CTHePaB trên mô hình động vật thực nghiệm.*

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan bệnh học xơ gan

1.1.1. Định nghĩa

Bệnh gan mạn tính (Chronic liver disease) được định nghĩa là bệnh cảnh có bằng chứng rối loạn chức năng gan liên tục cả về lâm sàng và sinh hóa kéo dài hơn 6 tháng [49]. Bệnh gan mạn tính đưa đến quá trình phá hủy và thoái hóa không ngừng của mô gan, tiến triển thông qua các giai đoạn khác nhau từ xơ hóa gan (fibrosis) cuối cùng là xơ gan (cirrhosis) [23].

Người ta định nghĩa bệnh xơ gan dựa trên các tổn thương giải phẫu bệnh của gan [4]. Ở gan bình thường, sự tạo sợi (fibrogenesis) và phân hủy sợi (fibrolysis) của mô gan ở trạng thái cân bằng, xơ hóa chỉ xảy ra khi mô sẹo tích tụ quá mức và nhanh hơn quá trình bị phân hủy. Sự tạo thành mô sẹo là đáp ứng bình thường của cơ thể đối với tổn thương. Nhưng trong xơ gan, quá trình làm lành mô sẹo bị thất bại [18]. Tùy theo nguyên nhân mà bệnh cảnh xơ gan, ngoài các triệu chứng chung của nó, có thể kèm theo các biểu hiện lâm sàng khác đặc trưng cho nguyên nhân gây bệnh [4]. Tuy nhiên các thành phần của mô sẹo trong xơ gan tương tự nhau dù là bệnh nguyên gì, gồm: các thành phần chất nền ngoại bào, collagene type I và III, muối sulfate proteoglycan và glycoprotein [18].

Xơ hóa gan (fibrosis) thường khởi phát âm thầm, và hầu như các bệnh liên quan và tử vong đều xảy ra sau khi xơ gan (cirrhosis) đã phát triển. Phần lớn những bệnh nhân này thường tiến triển đến xơ gan sau một khoảng thời gian dài 15-20 năm [18].

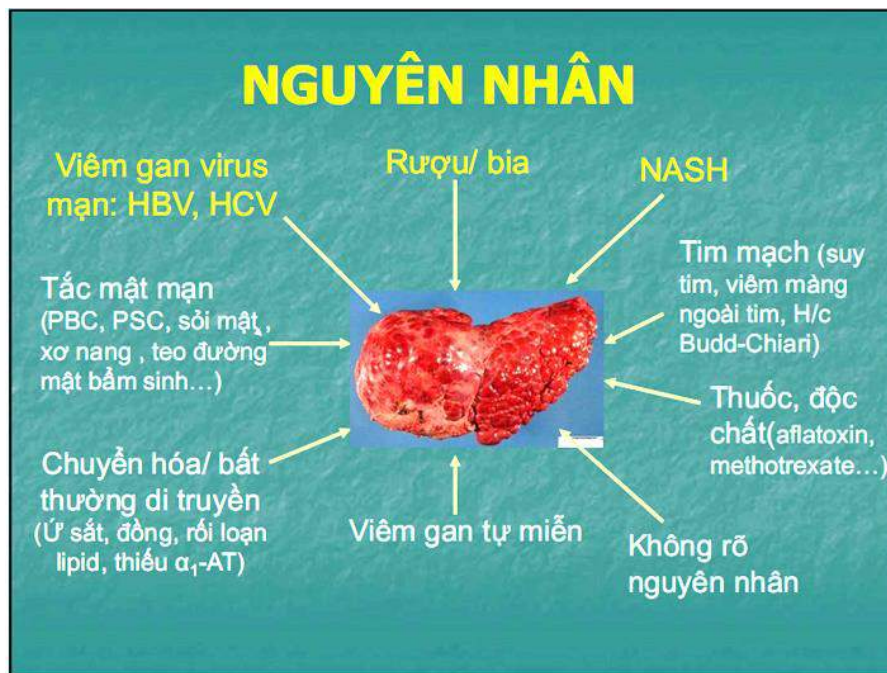
1.1.2. Dịch tễ học

Theo thống kê của tổ chức y tế thế giới (WHO), năm 2015, xơ gan là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 11 trên thế giới, gây ra hơn 1 triệu ca tử vong [66].

Trên toàn thế giới, có khoảng 400 triệu người nhiễm HBV. Đa số người nhiễm HBV mạn tính thuộc các nước Châu Á, Châu Phi và Địa Trung Hải [15]. Việt Nam là một nước thuộc châu Á, chịu gánh nặng bệnh viêm gan virus cao - cứ

11 người thì có 1 người bị viêm gan B và C mạn tính. Tại Việt Nam, viêm gan B và C là những nguyên nhân chính gây xơ gan, ung thư gan và tử vong do gan [28]. Năm 2012, ở Việt Nam, xơ gan là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 9, gây ra hơn 14 nghìn ca tử vong (chiếm 2,7% tổng số ca tử vong) [66]. WHO đã ước tính Việt Nam 2017 có 104.460 người viêm gan virus chuyển sang xơ gan mất bù, trong đó 86.8% trường hợp là do nhiễm virus viêm gan B [25].

1.1.3. Bệnh nguyên

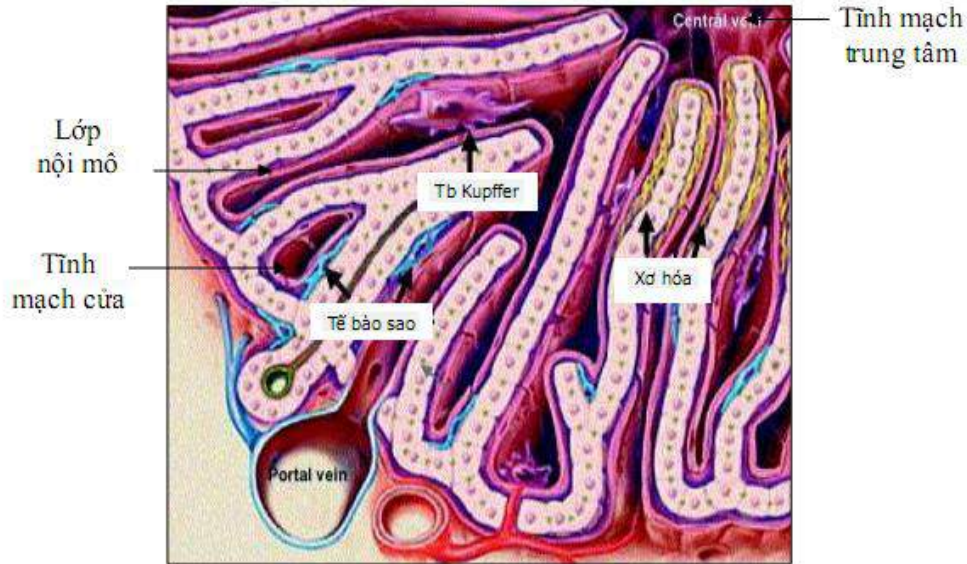


Biểu đồ 1.1. Nguyên nhân gây xơ gan

- Xơ gan do nhiễm virus: Đứng hàng đầu là viêm gan B, C và hay phối hợp D gây xơ gan nốt lớn (xơ gan sau hoại tử) [4].
- Xơ gan rượu.
- Xơ gan do biến dưỡng.
- Xơ gan do gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) [47].
- Xơ gan đồng huyết thanh tăng.
- Xơ gan do rối loạn miễn dịch.
- Xơ gan mật nguyên phát: Xơ gan cơ học.
- Xơ gan mật thứ phát: Xơ gan do thuốc.
- Các nguyên nhân khác chưa được chứng minh.

1.1.4. Sinh lý bệnh của xơ hóa gan và xơ gan

1.1.4.1. Cấu trúc gan bình thường



Hình 1.1. Cấu trúc xoang và vị trí tế bào sao ở gan bình thường [16]

Nguồn: Friedman S.L. (2003), *J. of Hepatology*

Gan bình thường gồm :

- Tế bào gan (thành phần biểu mô).
- Lớp nội mô hình sin.
- Tế bào Kupffer (đại thực bào mô).

- Tế bào sao: nằm trong khoảng Disse. Tế bào này trước đây còn gọi là tế bào Ito, tế bào mỡ, tế bào quanh xoang hay tế bào giàu vitamin A. Loại tế bào này chức năng chính của chúng là lưu trữ vitamin A và các retinoids. Chúng đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành xơ hóa gan [16][64].

Bình thường, các tế bào gan được bao phủ bởi lớp nội mô có các khe. Tế bào Kupffer nằm trong lòng xoang, sát thành lớp nội mô [Hình 1.1].

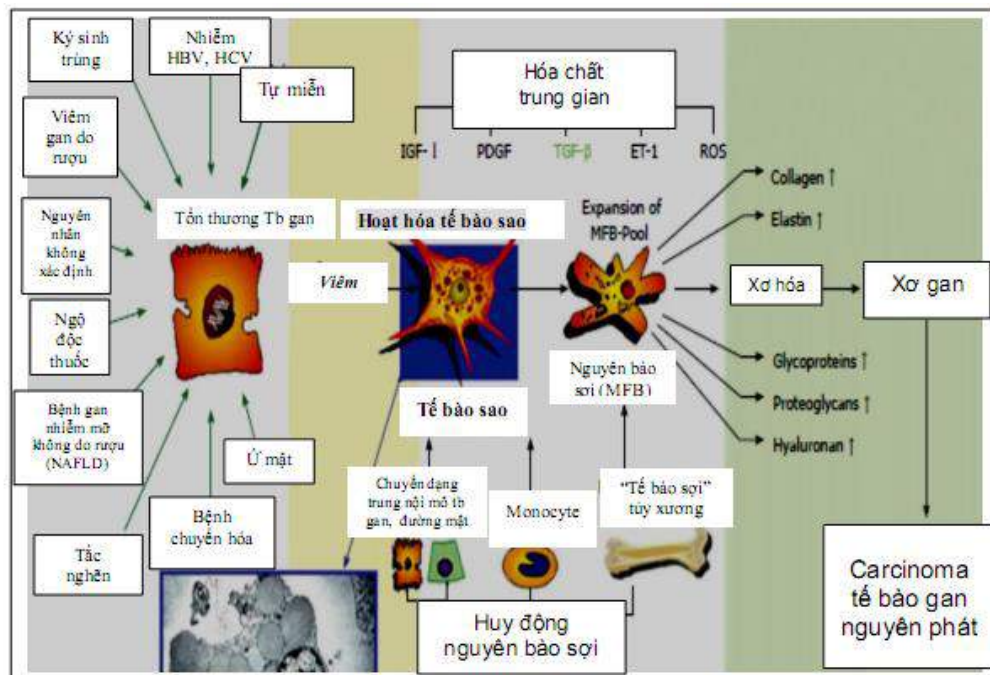
1.1.4.2. Thay đổi cấu trúc gan khi bị tổn thương

- Sau tổn thương gan cấp tính (như viêm gan virus), các tế bào nhu mô gan tăng sinh và thay thế cho các tế bào hoại tử hoặc bị chết theo chương trình. Quá trình này liên quan đến phản ứng viêm và tích tụ có giới hạn chất nền ngoại bào. Nếu tổn thương vẫn tiếp diễn, sự tái sinh của gan không đủ để phục hồi, các tế bào

gan sẽ bị thay thế bởi lượng lớn chất nền ngoại bào (ECM), bao gồm sợi collagen [32]. Quá trình xơ hóa gan tiến triển đặc trưng bởi 4 thay đổi cơ bản trong mô gan xơ hóa so với mô gan bình thường: (1) tái sắp xếp mô học; (2) thay đổi vi cấu trúc của ECM (3) tăng hàm lượng ECM; (4) thay đổi thành phần của ECM [9].

- Các quá trình ảnh hưởng đến phát triển và duy trì ECM :

* Hoạt hóa tế bào hình sao là sự kiện trung tâm trong xơ hóa gan [56]. Trong gan bình thường, tế bào sao ở trạng thái nghỉ, nó sản sinh ra một lượng nhỏ collagen type III và IV [64]. Sau tổn thương mạn tính, các tế bào hình sao chuyển từ trạng thái nghỉ sang trạng thái hoạt hóa và chuyển thành các nguyên bào sợi. Các tế bào đã hoạt hóa sẽ di chuyển và tích tụ ở những vùng mô cần sửa chữa, tiết ra một lượng lớn collagen và chất nền ngoại bào [52]. Chúng cũng kích thích các tế bào miễn dịch giải phóng ra các cytokine, các yếu tố tăng trưởng và các chất hóa học khác. Các chất hóa học này tiếp tục hỗ trợ trực tiếp các tế bào gan hoạt hóa và giải phóng ra collagen type I, III, IV, VI, acid hyaluronic, glycoprotein (fibronectine, proteoglycan và các chất khác). Các chất này ứ đọng trong gan càng làm gia tăng sự tích tụ các chất nền ở ngoại bào. Cùng lúc này quá trình phân hủy hoặc thoái hóa collagen bị suy giảm [64].



Biểu đồ 1.2. Sự hoạt hóa tế bào sao và xơ hóa gan [16]

* Ngoài tế bào hình sao, vai trò của các tế bào có nguồn gốc từ tủy xương trong quá trình hình thành và lắng đọng ECM ngày càng được hiểu rõ. Có thể gặp các kháng nguyên chống tế bào gan, chống hồng cầu, chống gamma- globulin được thành lập trong diễn tiến xơ gan, từ đó gây hủy hoại tế bào gan, hủy hồng cầu, gây thiếu máu và tăng nguy cơ nhiễm trùng [4].

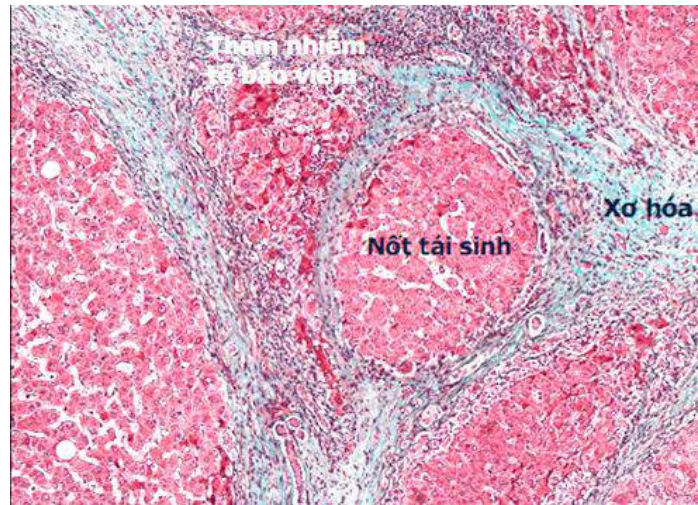
* Sự chết theo chương trình của tế bào gan là một sự kiện phổ biến trong tổn thương gan, góp phần gây viêm mô, xơ hóa, và sự phát triển của bệnh xơ gan. Cả nhiễm HCV và tiêu thụ ethanol gây ra tế bào gan chết theo chương trình ở mô hình động vật và con người [64].

* Hydroxyproline là một trong những axit amin có nhiều nhất có trong collagen sau quá trình hydroxyl hóa chất proline. Sự hiện diện của hydroxyproline trong ECM được sản xuất bởi các tế bào hình sao giúp bảo tồn tính toàn vẹn và chức năng của các tế bào gan. Mức độ của nó trong các mô gan, huyết thanh và nước tiểu vượt trội có thể biểu thị chính xác tốc độ và tiến triển của bệnh xơ gan. Định lượng hydroxyproline trong các nghiên cứu khác nhau như là dấu hiệu để chẩn đoán hoặc đo lường hoạt động chống xơ của các biện pháp can thiệp điều trị bằng thảo dược hoặc không dùng thảo dược. Test có tầm quan trọng trong phát hiện không xâm lấn sự xơ hóa của bệnh gan mạn tính [60].

1.1.5. Mô bệnh xơ gan sau hoại tử

Xơ gan sau hoại tử là hậu quả của quá trình hoại tử gan. Nguyên nhân thường gặp là: (1)Viêm gan virus B, viêm gan virus không A không B, (2) Các bệnh tự miễn, (3)Ngộ độc hoặc do thuốc như: oxyphenisat, methyldopa và isoniazid [5].

Đại thể: Gan nhỏ lại. Mật độ cứng. Mô sợi tăng sản chia cắt gan thành những cục to nhỏ không đều. *Vi thể:* Những tế bào gan thoái hoá mỡ. Hoại tử đến đâu xơ hóa đến đó, dần dần các dải xơ nối các khoảng cửa với nhau. Mô sợi tăng sản chia cắt gan thành nhiều các ổ tái tạo (tiểu thùy giả) và ổ hoại tử gan. Khoảng cửa cũng tăng sản sợi và thâm nhập nhiều tế bào viêm như lymphô bào, tương bào. Trong các dải xơ các tế bào viêm mạn tính thâm nhập và các ống mật cũng tăng sản [5].



Hình 1.2. Xơ gan - Mô sợi xơ tăng sản phân cắt gan thành các tiểu thùy giả và thâm nhập nhiều tế bào viêm mạn (HE x 500).

Nguồn: Cirrhosis_ Nephron, Wikimedia Commons

Có nhiều hệ thống điểm mô bệnh học để phân độ giai đoạn xơ hóa gan như Knodell IV (kết hợp cả điểm hoại tử, viêm và xơ hóa), Ishak (Knodell cải tiến), Scheuer, Batts-Ludwing (Scheuer cải tiến), và Metavir được sử dụng nhiều nhất... (bảng 1.1) [23].

Bảng 1.1. Bậc hoặc điểm số mô bệnh học tương đương để phân độ giai đoạn xơ hóa gan [23]

	Bậc hoặc điểm số tương đương		
	Knodell(IV)	Ishak-Knodell	METAVIR
Không xơ hóa	0	0	F0
Xơ hóa vài khoảng cửa	1	1	F1
Xơ hóa nhiều khoảng cửa	1	2	F1
Vài cầu nối xơ	3	3	F2
Nhiều cầu nối xơ	3	4	F3
Xơ gan không hoàn toàn	4	5	F4
Xơ gan thực sự	4	6	F4

Theo Metavir, có 5 giai đoạn xơ hóa gan bao gồm: F0: không xơ hóa, F1: xơ hóa khoảng cửa, F2: xơ hóa khoảng cửa và vài cầu nối, F3: xơ hóa với nhiều cầu

nổi hay xơ hóa bắc cầu, F4: xơ gan. Dựa vào các giai đoạn, xơ hóa gan được chia làm 3 mức độ là xơ hóa nhẹ khi F0, F1; xơ hóa đáng kể (significant fibrosis) khi \geq F2; xơ hóa nặng (advanced fibrosis) khi \geq F3 và xơ gan (F4) [23].

Hệ thống điểm Metavir còn được áp dụng trên các mô hình thực nghiệm với đối tượng là chuột bị xơ gan, và cho kết quả tương đối giống các giai đoạn trên người [33][38][32].

1.1.6. Lâm sàng

Bệnh cảnh lâm sàng của xơ gan rất biến thiên, thay đổi tùy giai đoạn [4]:

- Giai đoạn còn bù : gan to ra.
- Giai đoạn mất bù : gan nhỏ lại. Đây là giai đoạn có nhiều biến chứng.

Nổi bật là hội chứng suy gan, hội chứng tăng áp tĩnh mạch cửa.

Gan thường teo nhỏ đối với các nguyên nhân xơ gan sau hoại tử, gan to đối với các nguyên nhân xơ gan ứ đọng. Gan mật độ chắc, bờ sắc, có thể thấy mặt gan gồ ghề [2].

1.1.7. Cận lâm sàng

- Siêu âm bụng: Bờ gan không đồng đều. Gan to hay teo nhỏ, phần thùy dưới to [4].

- Sinh hóa: Protid máu giảm đặc biệt thành phần albumin máu giảm, gamma globulin tăng, tỷ lệ A/G nhỏ hơn 1. Các globulin miễn dịch IgG, IgM tăng cao. Ứ mật: bilirubin máu tăng cao cả liên hợp và bilirubin tự do, phosphatase kiềm tăng. Rối loạn đông máu: prothrombin giảm. Transaminase tăng do hoại tử tế bào gan: AST, ALT tăng [2]. Công thức máu: có thể có thiếu máu nếu có xuất huyết tiêu hóa thiếu máu nhược sắc mức độ nặng [4]. Đặc biệt, số lượng tiểu cầu giảm, số lượng bạch cầu có thể giảm.

1.1.8. Chẩn đoán xác định

- Tiền sử có bệnh gan mãn tính.

- Lâm sàng dựa vào 2 hội chứng tăng áp cửa, hội chứng suy gan.

- Cận lâm sàng: Các xét nghiệm máu, siêu âm, sinh thiết gan.

- Chẩn đoán giai đoạn: Child A: Điểm 5 hay 6; Child B: điểm từ 7- 9; Child C điểm từ 10-15.

Bảng 1.2. Thang điểm để đánh giá giai đoạn xơ gan theo chỉ số Child – Pugh

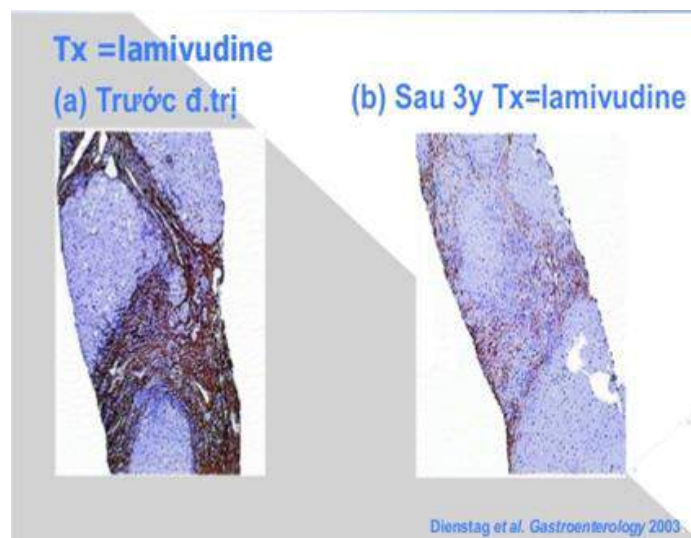
	1 điểm	2 điểm	3 điểm
Bệnh não gan	Không	lú lẫn	hôn mê
Báng	Không	kín đáo	vừa phải
Bilirubin	< 35 μ mol/l	35-50 μ mol/l	> 50 μ mol/l
Albumin	> 35 g/l	28-35 g/l	< 28 g/l
Thời gian Prothrombin (%)	> 50 %	40-50 %	< 40 %

1.1.9. Điều trị

Các điều trị bao gồm những nỗ lực để loại bỏ các tác nhân kích thích có hại, ngăn chặn tình trạng viêm gan, điều hòa ngược sự hoạt hóa tế bào hình sao và thúc đẩy thoái biến cơ chất [24].

1.1.9.1. Loại bỏ kích thích gây tổn thương gan

Loại bỏ đồng và sắt dư trong bệnh Willson và Hemochromatosis. Loại bỏ rượu trong xơ gan do rượu. Điều trị sỏi mật trong trường hợp xơ gan do sỏi mật. Loại trừ virus HBV, HCV trong viêm gan virus B,C bằng Tenofovir, Lamivudine [4]. Ngưng sử dụng thuốc độc cho gan trong xơ gan do thuốc. Giải phóng đường mật trong tắc nghẽn đường mật.



Hình 1.3. Cải thiện xơ hóa sau 3 năm điều trị lamivudine cho bệnh nhân viêm gan B mạn tính [24]

1.1.9.2. *Ức chế quá trình viêm gan*

Sử dụng thuốc: Corticosteroids, Ursodeoxycholic [2]. Caffeine, Interleukin 10 [24]. Colchicine [4].

1.1.9.3. *Tác động vào quá trình hoạt hóa tế bào sao và đặc tính của nó*

Sử dụng thuốc: Interferon, interferon gamma. Cannabinoids (cần sa), ức chế men chuyển Angiotensine II [24]. Chất chống oxi hóa: Silymarin [36].

1.1.10. *Theo y học cổ truyền*

1.1.10.1. *Bệnh danh* : Can ngạnh hoá. Ngoài ra còn được mô tả trong trong chứng cổ trướng, tích tụ, chứng hiệp thống, chứng hoàng đản [3].

1.1.10.2. *Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh* :

Y học cổ truyền cho rằng Can ngạnh hoá có liên quan đến 3 tạng là can, tỳ, thận là chính. Tình chí uất kết làm can uất khí trệ cảm nhiễm phải bệnh độc (virus). Ăn uống không điều độ (uống nhiều rượu), lao lực quá độ. Các nguyên nhân này ảnh hưởng đến chức năng của can, tỳ. Can thích điều đạt chủ về sơ tiết. Can không sơ tiết được dẫn đến can khí uất trệ và phạm vào tỳ, khiến can tỳ bất hoà. Tỳ vị hư yếu mà gây ra hông bụng căng đau, ăn ít, tiêu hoá kém, đầy hơi, ỉa lỏng.

Khí là soái của huyết, khí hành thì huyết hành, khí trệ thì huyết ứ. Do khí trệ lâu ngày hình thành huyết ứ mà thành chứng tích: bụng to căng trướng, đau ở điểm cố định, môi lưỡi thâm xám, gan lách to. Tỳ hư không phân bố được tân dịch, thủy thấp ngưng trệ ở trong bụng dần to mà thành cổ trướng. Can tỳ hư lâu ngày ảnh hưởng đến thận. Thận dương hư tổn, dương khí yếu, thủy thấp tràn lên làm cổ trướng ngày càng nặng. Thận âm hư tổn thì can âm cũng hư, hư hỏa bốc lên gây hao huyết, động huyết, nặng thì can thận âm kiệt dẫn đến hôn mê [3].

1.1.10.3. *Các thể lâm sàng*

Thể can uất tỳ hư, can tỳ bất hoà (thể khí trệ thấp ngưng)

- Triệu chứng: Giai đoạn xơ gan còn bù, ngực sườn đầy tức, ăn kém buồn nôn, ợ hơi ợ chua, sắc mặt sạm tối, đầu choáng mặt mũi, đại tiện lỏng nát, rêu lưỡi mỏng trắng nhớt, mạch huyền tế.

- Pháp: Sơ can lý khí kiện tỳ trừ thấp [3]:

- Phương: Tiêu dao tán gia giảm

Bạch truật 12g	Bạch thược 10g	Đại phúc bì 06g	Cam thảo 06g
Đại táo 06g	Bạch linh 10g	Sinh khương 06g	Sài hồ 10g
Ý dĩ 16g	Đan sâm 16g	Hoàng kỳ 10g	Ngũ gia bì 20g
Nhân trần 20g	Chi tử 08g		

Thể khí trệ huyết ứ

- Triệu chứng: Xơ gan có dấu hiệu tăng áp lực tĩnh mạch cửa. Đau mạn sườn nhiều. Sờ có khối u (lách to), bụng chướng, ăn kém, ợ hơi, sắc mặt tối, môi tím, người gầy, lưỡi đỏ có ứ huyết, mạch huyền tế, sáp.

- Pháp: Sơ can lý khí, hoạt huyết

- Phương: Cách hạ trục ứ thang gia giảm [3]

Đào nhân 12g	Hồng hoa 08g	Nga truật 08g
Đương quy 12g	Tam lăng 08g	Đan sâm 12g
Xích thược 12g	Hương phụ 08g	Chi xác 08g

Thể âm hư thấp nhiệt

- Xơ gan thường kèm cổ trướng, hay kèm theo chứng chảy máu sắc mặt vàng tối, chảy máu cam, chảy máu chân răng, phù chân, hâm hấp sốt, miệng họng khô, lợm giọng, tiểu tiện đỏ ít, đại tiện táo, lưỡi đỏ rêu ít, mạch huyền tế sáp [3].

- Pháp: Tư âm lợi thấp

- Phương : Lục vị địa hoàng thang gia giảm:

Thục địa 12g	Hoài Sơn	Sơn thù 08g	Đan bì 08g
Trạch tả 08g	Bạch linh 08g	Bạch truật 12g	Đương quy 20g
Địa cốt bì 12g	Bạch mao căn 20g		

Thể tỳ thận dương hư

- Triệu chứng: Xơ gan thường kèm cổ trướng, bụng chướng, chân phù, tiểu tiện ít, đại tiện lỏng lạnh, mệt mỏi, ăn kém, chất lưỡi nhạt bệu, rêu lưỡi trắng mỏng, mạch trầm tế [3].

- Pháp chữa : Ôn tỳ thận dương (ôn dương hành thủy)

- Phương: Bài Phụ tử lý trung thang gia giảm :

Phụ tử chế 12g Quế chi 06g Can khương 06g Xuyên tiêu 06g
 Phục linh 12g Hoàng kỳ 12g Trạch tả 12g Đại phúc bì 12g
 Hậu phác 06g

Trường hợp cổ trướng nhiều:

- Triệu chứng: cổ trướng tăng nhanh, tiểu tiện ít, đại tiện không thông, mạch huyền sắc. Cần công trục hạ thủy dùng [3].

- Phương: Bài Thập tảo thang

Nguyên hoa 04g Đại kích 04g Cam toại 04g Đại táo 10 quả
 3 vị đầu tán bột , ngày uống 2 g với nước Đại táo .

1.2. Các mô hình gây xơ gan trên động vật thí nghiệm

Các mô hình động vật đang được sử dụng trong nhiều thập kỷ để nghiên cứu về quá trình xơ hóa và để đánh giá tiềm năng chống xơ hóa của các liệu pháp và phác đồ. Mặc dù vô cùng quý giá đối với sự hiểu biết của chúng ta về các quá trình sinh lý bệnh, chúng vẫn là mô hình và không ai trong số chúng tái tạo một căn bệnh ở người. Mỗi mô hình (có nghĩa là tác nhân, thiết kế, chủng và loài) cho thấy các đặc điểm cụ thể trong bản chất của sinh bệnh học, định khu và sự tiến triển của xơ hóa [59]. Cho đến nay, nhiều mô hình xơ gan trên động vật đã được xây dựng trên chuột nhắt, chuột cống, thỏ, lợn ... nhằm mô phỏng quá trình xơ hóa và xơ gan trên người. Trong khuôn khổ cho phép, phần sau đây chỉ đề cập một số mô hình gây xơ hóa gan được áp dụng phổ biến trên động vật thực nghiệm [11].

1.2.1. Gây xơ gan bằng các tác nhân hóa học

Các tác nhân hóa học thường được sử dụng là những chất gây tổn thương trực tiếp tế bào gan, dẫn tới hoại tử, kích hoạt phản ứng viêm và một loạt các quá trình phức tạp khác dẫn tới xơ hóa và xơ gan. Các tác nhân thường được sử dụng bao gồm CCl₄, thioacetamid, dimethylnitrosamin, diethylnitrosamin, dioxin, natri asenat, và ethanol [34].

Nhóm mô hình này được sử dụng rất phổ biến bởi độ lặp lại cao, dễ thực hiện và có nhiều điểm tương đồng với cơ chế gây xơ hóa gan trên người. Tuy nhiên, rất khó kiểm soát nếu tác nhân gây xơ hóa được đưa vào một cách tự do (qua thức

ăn hoặc nước uống) hoặc quá trình hấp thu, chuyển hóa các tác nhân gây xơ bị ảnh hưởng. Việc sử dụng các tác nhân hóa học khác nhau cũng sẽ dẫn tới một số điểm khác nhau về thời gian gây xơ hóa, thời gian phát triển thành xơ gan, vị trí tổn thương điển hình của từng mô hình [34].

1.2.1.1. Gây xơ gan bằng carbon tetrachlorid

Carbon tetrachlorid (CCl_4) là chất gây xơ hóa được sử dụng rộng rãi nhất trong các nghiên cứu về xơ gan trên động vật gặm nhấm [34]. Mô hình gây xơ gan sử dụng carbon tetrachlorid mang nhiều điểm tương đồng với quá trình hình thành và phát triển xơ gan do tiếp xúc với các tác nhân độc hại trên người [32][46].

Nhìn chung, khi sử dụng CCl_4 , xơ hóa gan có tính chất tuyến tính, xơ hóa từ trung tâm tiểu thùy, đầu tiên là vách tĩnh mạch trung tâm, sau đó đến vách tĩnh mạch cửa [34], xơ hóa thường phát triển rõ rệt sau 2-4 tuần phơi nhiễm, xơ hóa bắt đầu nghiêm trọng sau 5-7 tuần và xơ gan thường xuất hiện sau 8-10 tuần phơi nhiễm. Xơ gan nốt nhỏ, tăng áp lực tĩnh mạch cửa, cổ trướng thường xuất hiện sau 10-20 tuần. Tuy nhiên, thời gian hình thành xơ hóa và tiến triển thành xơ gan khác nhau tùy thuộc vào liều lượng, đường dùng và động vật thí nghiệm [11]. Không chỉ vậy độ nhạy cảm với CCl_4 thay đổi theo chủng động vật và xuất hiện sự đảo ngược xơ hóa trong một thời gian ngắn sau khi rút CCl_4 [34].

Với mục đích tăng độc tính của CCl_4 , một số tác giả đã sử dụng CCl_4 cùng một chất cảm ứng enzym CYP2E1. Bằng cách thêm phenobarbital vào nước uống, enzyme CYP2E1 được cảm ứng giúp đẩy nhanh quá trình hình thành xơ hóa, từ đó có thể rút ngắn được thời gian gây mô hình. Tuy nhiên, phương pháp này cũng làm tăng tỉ lệ tử vong trên động vật. Mặc dù những tổn thương ngoài gan là tối thiểu (do CYP2E1 ít tồn tại ngoài gan), tình trạng viêm, hoại tử vẫn có thể xảy ra tại chỗ tiêm gây ảnh hưởng xấu đến thể trạng động vật thí nghiệm [32].

Khoảng thời gian sau liều CCl_4 cuối cùng cho đến khi giết động vật thí nghiệm để lấy mẫu nghiên cứu cũng là yếu tố quan trọng. Sau liều CCl_4 cuối cùng, nếu giết chuột quá sớm, viêm và hoại tử là quá trình nổi bật. Tuy nhiên, nếu giết chuột quá muộn (sau 3 ngày), quá trình phục hồi tổn thương chiếm ưu thế. Do vậy,

thời điểm 48 đến 72 giờ sau liều CCl_4 cuối cùng được cho là thời điểm tốt nhất để giết chuột và lấy mẫu xét nghiệm [11].

Tiêm màng bụng là đường dùng phổ biến do khá thuận tiện, tính lặp lại cao và dung nạp tốt, tuy nhiên, đường dùng này có thể gây viêm phúc mạc mạn tính, làm ảnh hưởng đến thể trạng động vật thí nghiệm và kết quả của nghiên cứu. Có nhiều tranh luận xoay quanh vấn đề sử dụng CCl_4 đường uống. Một số tác giả cho rằng đường uống là đường dùng có tỉ lệ lặp lại kết quả xơ hóa cao nhất với tỉ lệ động vật sống sót chấp nhận được. Trong khi một số tác giả khác không khuyến khích lựa chọn đường uống do tỉ lệ tử vong cao ở giai đoạn đầu. Tiêm dưới da là đường dùng giúp làm giảm tỉ lệ tử vong ở động vật, tuy nhiên, đường dùng này có thể phát triển u hạt tại chỗ tiêm, hoại tử da [32][34]. Bên cạnh các đường dùng trên, CCl_4 đường hít cũng đã được sử dụng để gây xơ hóa gan trên thực nghiệm. Đường dùng này có nhiều ưu điểm như: không xâm lấn, không gây các phản ứng viêm tại chỗ tiêm như đối với đường tiêm dưới da và tiêm màng bụng. Tuy nhiên, để tiến hành phương pháp này đòi hỏi cần có dụng cụ chuyên biệt và kinh nghiệm nhất định [11].

1.2.1.2. Gây xơ gan bằng thioacetamid

Ngoài carbon tetrachlorid, thioacetamid (TAA) là một tác nhân sinh ung thư thường được sử dụng để gây xơ hóa gan trên động vật thực nghiệm [34]. Trong cơ thể, TAA được chuyển hóa bởi CYP450 tạo thành chất chuyển hóa có độc tính (thioacetamid sulphur dioxyd). Sử dụng TAA với liều thấp, kéo dài dẫn tới hình thành các khối u trong gan; tuy nhiên khi sử dụng liều cao, tế bào gan bị hoại tử và hình thành xơ hóa. Khác với các tác nhân khác, tổn thương điển hình gây ra bởi TAA là khu vực quanh tĩnh mạch cửa. Hạn chế khi sử dụng mô hình TAA là cần một thời gian khá dài để phát triển xơ hóa (12-20 tuần) [34]. Bên cạnh đó, ung thư đường mật và ung thư biểu mô tế bào gan cũng được mô tả trên chuột thí nghiệm sau một thời gian dài tiếp xúc với TAA [32].

1.2.1.3. Gây xơ gan bằng dimethylnitrosamin và diethylnitrosamin

Dimethylnitrosamin (DMN) và diethylnitrosamin (DEN) là những hợp chất gây ung thư thường được sử dụng để gây xơ hóa gan trên động vật thí nghiệm. Cơ chế gây xơ hóa gan của DMN và DEN tương tự như CCl₄. Khác với các mô hình trên, xơ hóa gan gây ra bởi DEN và DMN vẫn được duy trì và thậm chí phát triển trong nhiều tuần hoặc nhiều tháng sau khi ngừng tác nhân gây xơ hóa. Ung thư sẽ phát triển sau một thời gian tiếp xúc với DEN (dù tiếp tục dùng DEN hoặc đã ngừng sử dụng). Do đó, mô hình này không phải là lựa chọn hàng đầu khi nghiên cứu xơ hóa đơn thuần, nhưng có thể được lựa chọn khi nghiên cứu mối quan hệ giữa xơ hóa gan và ung thư biểu mô tế bào gan [11].

1.2.2. Gây xơ gan bằng phương pháp thắt ống dẫn mật

Mô hình gây xơ hóa gan và xơ gan sử dụng phương pháp thắt ống dẫn mật lần đầu tiên được tiến hành trên chuột cống trắng bởi Rodríguez-Garay và cộng sự vào năm 1996, sau đó được áp dụng cho chuột nhắt trắng bởi Miyoshi H. và cộng sự vào năm 1999 [32]. Chuột cống trắng được đánh giá là đối tượng phù hợp với mô hình này do cơ thể chúng thiếu túi mật [34]. Khi thắt ống dẫn mật, một loạt các biến cố xuất hiện bao gồm: tắc nghẽn ống mật gây tăng áp lực đường mật, viêm, tăng tiết cytokin và ứ mật. Các tế bào biểu mô đường mật tăng sinh, dẫn đến sự tăng sinh tiểu quản mật, kèm theo viêm và xơ hóa ở khoảng cửa. Ngoài tế bào hình sao, các nghiên cứu đã chứng minh rằng các nguyên bào sợi ở khoảng cửa cũng là những tế bào góp phần quan trọng vào quá trình gây xơ hóa trên mô hình này.

Với mô hình thắt ống dẫn mật, xơ hóa phát triển sau vài tuần, rối loạn huyết động, cổ trướng thường xuất hiện sau 6-8 tuần. Nguyên nhân tử vong trong những tuần đầu tiên thường do rò rỉ mật, vỡ u nang ống mật hoặc túi mật (trên chuột nhắt trắng). Hạn chế lớn nhất khi sử dụng mô hình này trong nghiên cứu là tỉ lệ tử vong cao (>20% và thường xảy ra sau tuần thứ 4). Tuy nhiên mô hình này vẫn có thể sử dụng cho các nghiên cứu ngắn hạn về xơ gan do ứ mật [34].

1.3. Viên nang cứng CTHePaB

1.3.1. Cơ sở xây dựng của chế phẩm thuốc nghiên cứu CTHePaB

- Là bài thuốc kinh nghiệm của PGS. Đậu Xuân Cảnh đã đúc rút trong quá trình làm lâm sàng, có hiệu quả nhất định trên bệnh nhân.

- Thành phần bài thuốc CTHePaB gồm 8 vị (2 ngày/thang):

Cà gai leo 30g	Cỏ sữa lá nhỏ 20g	Chi tử 10g
Đại hoàng 5g	Đình lăng 10g	Đông trùng hạ thảo 5g
Linh chi 10g	Hà thủ ô 10g	

- Dựa vào lý luận của y học cổ truyền, các triệu chứng biểu hiện của bệnh [3].

- Dựa vào tính năng các vị thuốc phù hợp để điều trị triệu chứng bệnh xơ gan. Bài thuốc có tác dụng: Thanh nhiệt giải độc, lợi thấp thoái hoàng, bổ khí ích tinh, tư dưỡng can thận. Gồm 8 vị thuốc đã trình bày ở trên. Với:

+ Quân: Cà gai leo: tác dụng thanh nhiệt giải độc, lợi thủy thấp

+ Thần: Cỏ sữa nhỏ lá; Chi tử giúp cà gai leo thanh nhiệt độc ở can, lợi thấp thoái hoàng.

+ Tá: Đình lăng, Đông trùng hạ thảo, Linh chi, Hà thủ ô bổ khí, ích tinh, tư dưỡng can thận, giúp nâng cao chính khí đẩy lùi thấp nhiệt độc.

+ Sứ: Đại hoàng, lương huyết hoạt huyết, dẫn thấp nhiệt qua đường đại tiện.

- Dựa vào tác dụng dược lý và thành phần hóa học của các vị thuốc đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ tế bào gan, ức chế hoạt động của virus, giúp gan hoạt động hiệu quả hơn, hỗ trợ sức đề kháng.

- Một số công trình nghiên cứu trên thực nghiệm, trên lâm sàng của các vị thuốc trong bài thuốc như Cà gai leo [12] [16] [13] [1] Đông trùng hạ thảo [40] [53] [62]; Nấm linh chi [63], Đại hoàng [42] đã chứng minh các tác dụng: ức chế sự nhân lên và diệt phần nào HBV, ức chế sự phát triển của xơ gan.

1.3.2. Viên nang cứng CTHePaB

Các vị thuốc trong CTHePaB đều đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam V. Cả bài thuốc được sấy ở nhiệt độ 60 độ C trong 2h, sau đó cô cao, loại tạp rồi phun sấy để được bột cao khô. Cuối cùng đóng thành viên nang cứng.

Viên nang cứng CTHepaB được xây dựng và thẩm định tiêu chuẩn cơ sở theo quy định của Bộ Y Tế và hướng dẫn của ICH theo điều kiện khí hậu vùng nóng ẩm (vùng IVb) từ đó xác định được độ ổn định cũng như hạn sử dụng của sản phẩm.

Viên nang cứng CTHepaB đã thử độc tính cấp và bán trường diễn (3 tháng) trên chuột và cho kết quả an toàn, không gây ảnh hưởng chung của chuột.



Hình 1.4. Dạng thô của các vị thuốc trong bài thuốc CTHepaB

1.3.3. Tác dụng các vị trong bài thuốc.

Cà gai leo

- Tên khác: Cà gai dây, cà vạnh, cà quỳnh, cà lù, gai cườm.

- Tên khoa học: *Solanum*

hainanense Hance *Solanaceae*

- Bộ phận dùng: Rễ, cành lá, thu hái quanh năm, phơi hay sấy khô. Có khi dùng cả tươi.

- Thành phần hóa học: Rễ cây có chứa tinh bột và nhiều chất hóa học khác nhau, đặc biệt là glycoancoloid.



Hình 1.5. Cà gai leo

- Tác dụng dược lý: có tác dụng bảo vệ tế bào gan, hỗ trợ điều trị bệnh viêm gan virus, ngăn chặn sự phát triển của xơ gan nên dùng điều trị các bệnh lý gan mật.

- Tính vị quy kinh: Vị hơi the, đắng, có tính âm

- Tác dụng tiêu độc, trừ ho, tán phong thấp, giảm đau, cầm máu [17].

Cỏ sữa nhỏ lá

- Tên khoa học: *Euphorbia thymifolia*, thuộc họ thầu dầu (*Euphorbiaceae*), Tên khác: vú sữa đất hay thiên căn thảo.

- Bộ phận dùng: Toàn cây có sữa lá nhỏ được dùng làm thuốc, thu hái quanh năm, tốt nhất vào mùa hè – thu, rửa sạch dùng tươi hay phơi khô.



Hình 1.6. Cỏ sữa lá nhỏ

- Thành phần hóa học: Thân và lá cây có hoạt chất cosmoslin. Rễ cây có taraxerol, tirucallol, myrixylalcohol. Các flavonoid và các hợp chất phenol đã được phân lập, xác định là các thành phần chính trong cây cỏ sữa.

- Tác dụng dược lý: tác dụng kháng khuẩn kháng nấm, chống dị ứng, chống viêm; ức chế miễn dịch, ức chế khối u, chống virus; tác dụng an thần, giảm đau, bảo vệ gan.

- Tính vị quy kinh: Cỏ sữa lá nhỏ có vị ngọt đắng nhạt, hơi chua, tính lạnh.

- Tác dụng: thông huyết, tiêu viêm, tiêu độc, lợi tiểu, kháng khuẩn, thông sữa [17].

Chi tử

- Tên khoa học: *Gardenia jasminoidis* Ellis, thuộc họ cà phê (*Rubiaceae*). Tên khác: Dành Dành, Sơn chi, Sơn chi tử

- Bộ phận dùng: Quả chín dành dành.



Hình 1.7. Chi tử

Phoi khô: Có tác dụng thanh nhiệt, giải độc. Sao vàng: Có tác dụng hạ hỏa, cầm máu.

- Tính vị quy kinh: Vị đắng tính hàn. Quy tâm, phế, tam tiêu.

- Thành phần hóa học: Gardenoside, Geniposide, Genipin, Crocin, Cocetin D-mannitol, Sitostreol.

- Tác dụng: Thuốc có tác dụng tả hỏa trừ phiền, thanh nhiệt lợi thấp, lương huyết giải độc, chủ trị chứng nhiệt, bệnh tâm phiền, sốt cao, bứt rứt, thấp nhiệt vàng da, tiểu tiện ít, đỏ. Nhiệt lâm, huyết lâm, huyết nhiệt xuất huyết, ung thũng sang độc, đắp ngoài trị chấn thương phần mềm [7].

Đại Hoàng

- Tên khoa học: *Rheum palmatum* Baill. Họ Rau Răm (*Polygonaceae*).

- Bộ phận dùng: Thân, rễ (*Radix et Rhizoma Rhei*).

- Thành phần hóa học: Emodin và Rhein.



Hình 1.8. Đại Hoàng

- Tác dụng dược lý: Nước sắc Đại hoàng có tác dụng lợi tiêu, bảo vệ gan và giảm Cholesterol máu đối với thỏ bị gây cao Cholesterol và cho uống thuốc.

- Tính vị quy kinh: vị đắng, tính hàn, qui kinh Tỳ, Vị, Đại tràng, Can, Tâm.

- Tác dụng: nhuận tràng; hạ hỏa và giải độc; hoạt huyết hóa ứ, lợi thủy, thanh nhiệt hóa thấp [7].

Đinh lăng

- Tên khoa học: *Polyscias fruticosa* (L.) Harms

- Tên khác: Cây gỏi cá.

- Bộ phận dùng: Rễ, thân, cành, lá (*Radix, Caulis et Folium Polysciatis*).

- Tính vị quy kinh: Rễ Đinh lăng có vị ngọt, tính bình; lá vị nhạt, hơi đắng, tính bình.



Hình 1.9. Đinh lăng

- Thành phần hóa học: Thành phần hoá học chính là Saponin triterpenic. Bột rễ đinh lăng lá nhỏ có chứa 20 acid amin, vitamin nhóm B, các nguyên tố vi lượng, trong đó có một số acid amin mà cơ thể người không thể tổng hợp được.

- Tác dụng dược lý: Tác dụng của dịch chiết đinh lăng lá nhỏ có nhiều điểm tương tự sâm Triều Tiên. Về độc tính, người ta thấy đinh lăng lá nhỏ của Việt Nam ít độc hơn so với nhân sâm Triều Tiên và sâm Liên Xô *Eleutherococcus*.

- Tác dụng : có tác dụng bổ năm tạng, giải độc, bổ huyết, tăng sữa, tiêu thực, tiêu sưng viêm. Đinh lăng là thuốc tăng lực [17].

Đông trùng hạ thảo

- Tên khoa học: *Cordyceps militaris*.

- Tính vị quy kinh: Vị ngọt, tính bình. Vào hai kinh Phế Thận.

- Tác dụng: Bổ thận tráng dương, ích tinh khí, tư dưỡng phế âm, hóa đàm, chỉ huyết, bổ hư tổn.



Hình 1.10. Nấm trùng thảo

- Thành phần hóa học: Cordycepin, Adenosin.

- Tác dụng dược lý: *Cordyceps militaris* có sẵn để canh tác nhân tạo với sản lượng cordycepin cao hơn. Hàm lượng của hoạt chất sinh học trong *C. militaris* cao như chất hoạt tính sinh học trong *C. sinensis*, loài mà tạo ra nhiều thành phần hoạt tính sinh học có giá trị, với tác dụng chống ung thư, chống huyết khối, chống viêm xơ [50].

- Kiêng kỵ : Người ho khạc ra máu do phế thực nhiệt hay người có biểu chứng không dùng [7].

Linh chi đỏ

- Tên khoa học: *Ganoderma lucidum*, thuộc họ nấm lim (*Ganodermataceae*).

- Tên khác: Tiên thảo, Nấm trường thọ, Vạn niên nhung.

- Bộ phận dùng: Hay dùng linh chi đỏ

- Tính vị quy kinh: Hồng chi có vị đắng, tính bình, không độc

- Thành phần hóa học: 7 Acid amin, protein, lipid, saponin, sterol và một số chất khác.

- Tác dụng dược lý: Lượng polysaccarit cao có trong Linh chi, tăng cường sự miễn dịch của cơ thể, làm mạnh gan, có tác dụng chống tế bào ung thư. Germanium giúp khí huyết lưu thông, các tế bào hấp thu oxy tốt hơn. Acid ganoderic có tác dụng chống dị ứng và chống viêm.

- Tác dụng: An thần cường chí, lợi tiểu thông lâm, bổ can khí ích phế khí, mạnh gân xương, bổ huyết nhẹ người tăng tuổi thọ [7].

Hà thủ ô đỏ

- Tên khoa học: *Fallopia multiflora* (Thunb.) thuộc họ Rau răm (*Polygonaceae*).

- Bộ phận dùng: Rễ củ phơi hay sấy khô của cây Hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson).

- Tính vị quy kinh: đắng, ngọt, sáp, hơi ôn, qui kinh Can thận.



Hình 1.11. Nấm linh chi đỏ



Hình 1.12. Hà thủ ô đỏ

- Thành phần hóa học: Chrysophanic acid, emodin, rhein, chrysophanic acid, anthrone, lecithin.

- Tác dụng dược lý: hạ Cholesterol huyết thanh, phòng chống và giảm nhẹ xơ cứng động mạch. Làm chậm nhịp tim. Làm tăng nhẹ lưu lượng máu động

mạch vành và bảo vệ được cơ tim. Có tác dụng nhuận tràng do dẫn chất oxymethylantraquinone làm tăng nhu động ruột. Tác dụng kháng một số vi khuẩn và virus.

- Tác dụng: Bổ huyết giữ tinh, hoà khí huyết, bổ can thận, mạnh gân xương, nhuận tràng [7].

1.4. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước về xơ gan – viêm gan virus B

1.4.1. Nghiên cứu ngoài nước

Li CX và cộng sự nghiên cứu tác dụng của viên Hán Đan Can Lạc (1998), bao gồm Đan Sâm, Bạch Thược, Hoàng Kỳ, Phòng Kỳ và Ngân Hạnh Diệp trên mô hình chuột gây xơ gan bằng CCl₄. Thuốc làm thay đổi hình thái của gan chuột bị xơ, làm giảm hơn 50% sự tích tụ collagen ở gan do CCl₄ gây ra, và làm tăng đáng kể hydroxyproline qua nước tiểu. Đưa đến kết luận, Hán Đan Can Lạc là hiệu quả trong việc bảo vệ chống xơ hóa gan. Các cơ chế bảo vệ dường như là do đặc tính chống oxy hóa và điều chế chuyển hóa collagen của gan [45].

Shimizu I và cộng sự (2000) đã chứng minh rõ ràng tác dụng phòng ngừa và điều trị của Tiểu Sài Hồ đối với bệnh xơ gan thực nghiệm, cũng như tác dụng ức chế của nó đối với việc kích hoạt các tế bào hình sao. Trong số các thành phần hoạt động của Tiểu Sài Hồ, baicalin, baicalein và saikosaponin-a có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào. Cần lưu ý rằng baicalin và baicalein là flavonoid có cấu trúc hóa học rất giống với silybinin, cho thấy các hoạt động chống xơ hóa. Điều này có thể cung cấp thông tin có giá trị về việc tìm kiếm các tác nhân chống u xơ mới [57].

Gong HY và cộng sự nghiên cứu trên 25 bệnh nhân: Tác dụng của Đông Trùng Hạ Thảo (*cordyceps sinensis*) đối với tập hợp tế bào lympho T và tổ chức xơ ở bệnh nhân viêm gan B mãn tính, đã thấy rằng. sau 3 tháng điều trị, tỷ lệ CD4 và CD4 / CD8 tăng đáng kể, trong khi acid hyaluronic và procollagen III (hai chất tăng trong xơ gan) giảm đáng kể so với đối chứng [37].

Zhang Q (2003) đã quan sát các đặc điểm của xơ gan theo hội chứng Trung Y trên 223 trường hợp xơ gan cho thấy có 3 loại hội chứng chính. (1) Thấp Nhiệt, Huyết Ứ, Can Tỳ Khí Hư ;(2) Khí Âm Lưỡng Hư với Khí Hư nghiêm trọng, Thấp nghiêm trọng kèm Nhiệt, Huyết Ứ;(3) Khí Âm Lưỡng Hư với Âm Hư nghiêm trọng, Thấp hoặc Nhiệt Uất. Thấp Nhiệt là cơ sở bệnh lý cho xơ gan sau viêm gan

virus, và mức độ rối loạn chức năng gan, tổn thương gan có thể là cơ sở bệnh lý cho Can Thận Âm Hư [54].

Q.Zhang và cộng sự (2006) đã tìm công thức phân biệt các mô hình hội chứng Trung Y ở 900 bệnh nhân xơ gan sau viêm gan virus. Nghiên cứu cho thấy các chứng có thể được phân thành hai loại: một là các yếu tố liên quan đến đặc điểm chung, phản ánh bệnh lý cơ bản của xơ gan là Khí Hư và Huyết Ứ, hai là các yếu tố để phân biệt riêng 5 loại hội chứng (Can Thận Hư, Thấp Nhiệt Tích Tụ, Nhiệt Huyết Ứ Tích Tụ, Can Khí Uất Tỳ Hư và Tỳ Thận Khí Hư). Các chứng đa dạng cho thấy sự phức tạp và đa hình của việc xây dựng hội chứng [55].

Cheng ML và cộng sự (2006) đã nghiên cứu “Viên nang Đan Thược Hóa Xơ trong điều trị xơ gan mất bù do viêm gan B” trên 30 bệnh nhân. Cho thấy, thuốc ức chế sự nhân lên của virus dẫn đến giảm nhanh chóng virus viêm gan B (HBV-DNA) trong huyết thanh đến mức không thể phát hiện, giúp cải thiện đáng kể chức năng gan ở bệnh nhân xơ gan mất bù, nhưng kết quả lâu dài vẫn không chắc chắn [30].

Han J và cộng sự (2009) đã chia 80 bệnh nhân xơ gan sau viêm gan B thành 2 nhóm tải lượng virus cao và nhóm tải lượng virus thấp theo xét nghiệm HBV-DNA. Tiếp tục chia nhỏ hơn thành 4 nhóm: Nhóm A được điều trị bằng châm cứu và thuốc sắc Trung Dược kết hợp với viên Heptodin; nhóm B với viên uống Glucuro lactone kết hợp với viên Heptodin; nhóm C được điều trị bằng châm cứu và thuốc sắc Trung Dược; nhóm D với chỉ uống viên Glucuro lactone. Kết quả cho thấy sau 1 tháng châm cứu kết hợp với Trung Dược và thuốc tây có thể cải thiện đáng kể các triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân bị xơ gan còn bù hơn so với liệu pháp tây y đơn giản [39].

Zhao XK và cộng sự (2014) đã nghiên cứu ảnh hưởng của viên nang Đan Thược Hóa Xơ trên biểu hiện của protein tạo hình xương-7 (BMP-7) và chất đối kháng của nó Gremlin trong gan của chuột bị xơ hóa gan bằng CCl₄. Nghiên cứu đã kết luận cơ chế điều trị của thuốc đối với bệnh xơ gan ở chuột có thể liên quan đến điều chỉnh sự ức chế sản xuất của Gremlin và sự tăng sản xuất của BMP-7 [71].

Chen H, Yang BW và các cộng sự (2016) nghiên cứu: Tác dụng phòng ngừa và điều trị của viên nang Phù Chính Hóa Ứ (chiết suất từ Đan Sâm, Đông Trùng Hạ Thảo, Đào Nhân, Giảo Cổ Lam, Phấn Hoa Thông, Ngũ Vị Tử [69]) đối với xơ gan

và biểu hiện yếu tố tăng trưởng mô liên kết ở chuột. Trên mô hình thực nghiệm 40 con chuột được gây xơ gan bằng CCl_4 và rượu, thuốc cho thấy tác dụng phòng ngừa và điều trị đối với bệnh xơ gan. Thuốc có thể ức chế biểu hiện yếu tố tăng trưởng mô liên kết trong mô gan, đây có thể là một trong những cơ chế phân tử của những tác động này [31].

Xiaoning Wang và các cộng sự (2015) đã nghiên cứu sự thay đổi sinh học nước tiểu của bệnh xơ gan sau viêm gan B trong hội chứng Trung Y: Can Thận Âm Hư và Thấp Nhiệt Nội Uẩn. Kết luận rằng sự thay đổi các chất trong nước tiểu tạo thành một nhóm bằng chứng sinh học đáng tin cậy cho sự khác biệt hội chứng Trung Y ở bệnh nhân xơ gan sau viêm gan B và có tiềm năng sử dụng các dấu ấn sinh học cho phân loại hội chứng Trung Y [68].

Ping Yi Hung and Chun-Lin Lee (2017) đã nghiên cứu “Hiệu quả chống xơ gan cao hơn của Đông Trùng Hạ Thảo loài *Cordyceps militaris* - Sản phẩm lên men được nuôi cấy với nước biển sâu thông qua việc ức chế các yếu tố tiền viêm và các biểu hiện liên quan đến xơ hóa. Nhóm đã nuôi nấm trong môi trường nước biển sâu, nước siêu tinh khiết, nước tổng hợp rồi cho chuột bị xơ gan do TAA dùng. Và nhận thấy, các các nhóm được dùng *Cordyceps militaris* đều có giảm chỉ số hủy hoại tế bào gan và hình ảnh vi thể gan ít dải sợi xơ hơn nhóm được không được dùng. Đặc biệt nhóm nuôi bằng nước biển sâu thể hiện rõ nhất sự ức chế xơ gan. Chỉ nhóm này có TGF- β (chất kích hoạt tế bào hình sao thành nguyên bào sợi) giảm có ý nghĩa thống kê [53].

1.4.2. Nghiên cứu trong nước

Trịnh Thị Xuân Hoà; Nguyễn Văn Mùi và cộng sự (2004) nghiên cứu trên 240 bệnh nhân viêm gan mạn tính virus B, được chia làm 2 nhóm, nhóm 1: gồm 90 bệnh nhân điều trị Haina và 90 bệnh nhân nhóm chứng, nhóm 2 gồm 30 bệnh nhân điều trị Dihacharin và 30 bệnh nhân nhóm chứng. Kết quả thấy: sau điều trị các thuốc Haina, Dihacharin có tác dụng làm thay đổi các Marker của virus viêm gan B rõ rệt [14].

Nguyễn Thượng Dong và cộng sự (2005) làm đề tài: Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và ức chế xơ gan của thuốc Cugama bào chế từ hỗn hợp Silymarin từ quả cúc gai di thực và cao tinh chế từ mã đề. Trên mô hình gây viêm gan mạn,

Cugama có tác dụng ức chế hình thành và tích tụ collagen. Hình ảnh gan chuột cho thấy hầu hết tế bào gan bình thường, không có tăng sinh liên kết xơ như ở lô bệnh lý [10].

Tác giả Hoàng Trọng Thăng (2006) nghiên cứu nhóm bệnh nhân xơ gan do rượu cho thấy về lâm sàng có 59% bệnh nhân có gan to, về xét nghiệm có giá trị trung bình của AST là 216 UI/l, của GGT là 531.23 UI/L [21].

Tác giả Đặng Thị Kim Oanh (2007) nghiên cứu về sự thay đổi sắt và ferritin huyết thanh ở bệnh nhân xơ gan cho thấy những bệnh nhân xơ gan có thiếu máu mạn, cần định lượng sắt và ferritin huyết thanh trước khi bổ xung thêm sắt [19].

Nguyễn Thị Minh Hồng, Nguyễn Nhược Kim (2015) sau một tháng dùng viên XG1 cho bệnh nhân xơ gan giai đoạn Child - Pugh B thấy: viên hoàn XG1 có tác dụng hỗ trợ bảo vệ tế bào gan, giảm men gan. Bệnh nhân chuyển từ xơ gan giai đoạn Child - Pugh B sang A và không thấy các tác dụng không mong muốn [14].

Nhóm nghiên cứu do cơ quan chủ quản Viện Hóa Học Các Hợp Chất Thiên Nhiên cùng phối hợp ThS. Trần Thu Hương (2016) thực hiện đề tài “Nghiên cứu chiết xuất hoạt chất và bào chế thuốc điều trị viêm gan virus từ rễ cây Nhỏ đông”. Kết quả chung cho thấy bột molongosit và viên nang NHODONGANA có tác dụng ức chế nhân lên của virus viêm gan B gần tương đương với lamivudine. Đồng thời có tác dụng bảo vệ gan , ngăn ngừa xơ hóa [27].

Tào Thị Giang (2017), nghiên cứu đề tài “Triển khai mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng carbon tetrachlorid đường uống và áp dụng đánh giá tác dụng của chế phẩm Vượng Can “, đã kết luận chế phẩm Vượng Can: cao cỏ nhọ nồi, cao bại tượng thảo, cao hoàng bá, methionin, immune gama, vitamin K2 có tác dụng chống xơ hóa gan [11].

Nguyễn Xuân Phùng và các cộng sự (2018) đã thực hiện: “Nghiên cứu đánh giá tác dụng của bài thuốc VG1 trong điều trị viêm gan B mạn tính” trên 60 bệnh nhân. VG1 gồm: Diệp hạ châu, Nhân trần, Kim ngân hoa, Chóc gai, Bạch truật, Uất kim, Sài hồ, Cam thảo. Kết quả theo dõi trong thời gian 2 năm, qua đó thấy các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng cải thiện rất rõ rệt [20].

CHƯƠNG 2

CHẤT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu nghiên cứu

2.1.1. Chế phẩm nghiên cứu

Viên nang cứng CTHePaB bào chế từ bài thuốc của Phó giáo sư Đậu Xuân Cảnh. Các thành phần trong bài thuốc là dược liệu khô đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Phương pháp bào chế: Bài thuốc được bào chế dưới dạng viên nang cứng CTHePaB 400mg dùng đường uống, do Viện Đào Tạo Dược – Học Viện Quân Y sản xuất, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Thành phần bài thuốc gốc (liều 2 ngày/ thang) có:

Cà gai leo (<i>Solanum hainanense</i> Hance <i>Solanaceae</i>)	30g
Cỏ sữa lá nhỏ (<i>Euphorbia thymifolia</i> <i>Euphorbiaceae</i>)	20g
Chi tử (<i>Gardenia jasminoidis</i> Ellis <i>Rubiaceae</i>)	10g
Đại hoàng (<i>Fallopia multiflora</i> (Thunb.) <i>Polygonaceae</i>)	5g
Đình lăng (<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms)	10g
Đông trùng hạ thảo (<i>Cordyceps militaris</i>)	5g
Linh chi đỏ (<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Ganodermataceae</i>)	10g
Hà thủ ô 10g (<i>Fallopia multiflora</i> (Thunb.) Haraldson)	10g



Hình 2.1. Viên nang cứng CTHePaB dùng để thử trên chuột cống trắng

Như vậy quy ra liều 1 ngày 1 thang: Cà gai leo 15g. Cỏ sữa lá nhỏ 10g. Chi tử 5g. Đại hoàng 2,5g. Đinh lăng 5g. Đông trùng hạ thảo 2,5g. Linh chi đỏ 5g. Hà thủ ô 5g. Liều dùng được tính theo gam bột cao khô trong viên nang/kg/ngày. Liều dự kiến sử dụng trên người là 4g/người/ngày (tương ứng 50g dược liệu khô/người/ngày). Tính quân bình một người 50kg thì liều dùng dự kiến trên người sẽ là 0,08g/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 0,56g /kg/ngày [8].

2.1.2. Thuốc đối chứng

Silymarin (biệt dược Legalon) của hãng Madaus (Pháp). Thành phần là cao khô của quả cây Silybum marianum. Loại viên nang 140mg Silymarin, được hòa tan trong nước cất cho uống.



Hình 2.2. Thuốc đối chứng Silymarin, biệt dược Legalon.

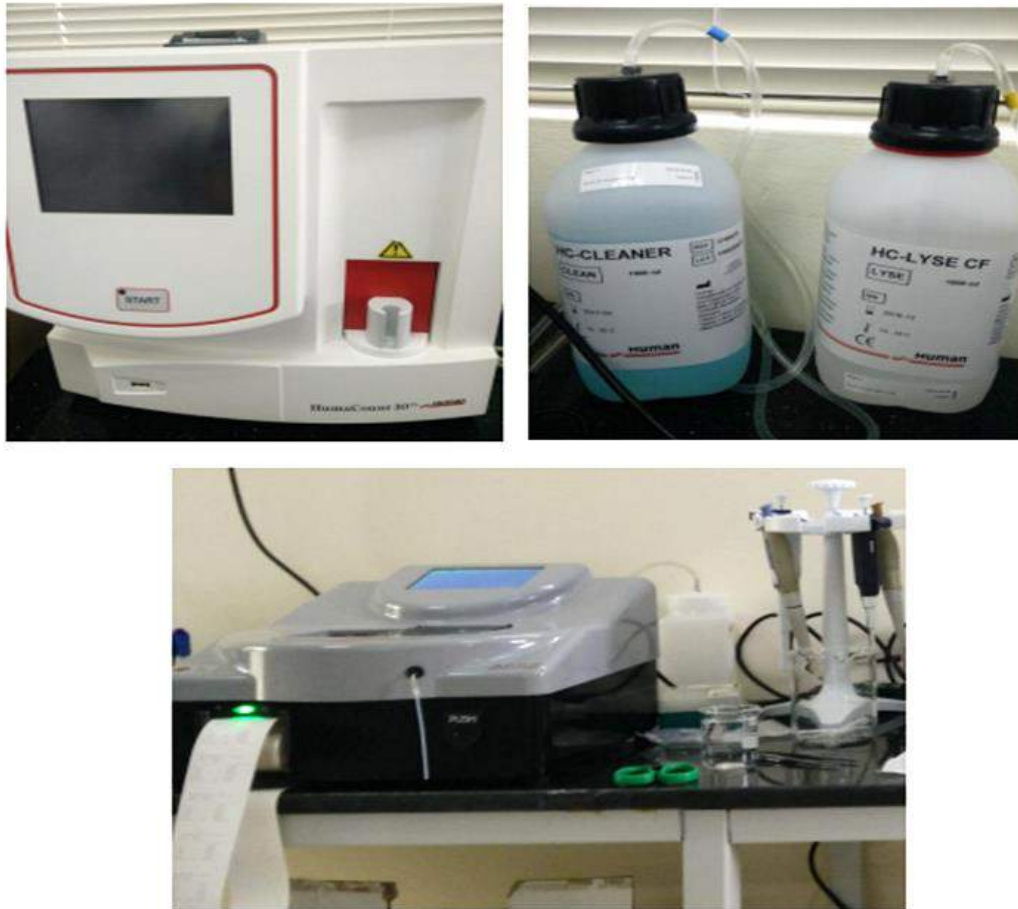
2.1.3. Thuốc gây mô hình xơ gan trên chuột cống trắng

Dung dịch cacbon tetraclorea CCl_4 gây hoại tử tế bào gan tại trung tâm tiêu thụ, từ đó kích hoạt hóa một loạt các phản ứng làm lành vết thương của cơ thể để phục hồi sự toàn vẹn của tế bào gan. Nếu tổn thương gan vẫn tiếp diễn, cuối cùng, sự tái sinh của gan không đủ để phục hồi, các tế bào gan sẽ bị thay thế bởi lượng lớn chất nền ngoại bào, bao gồm sợi collagen, dẫn tới tích tụ xơ hóa [11].

Mô hình gây xơ gan sử dụng carbon tetraclorid mang nhiều điểm tương đồng với với quá trình hình thành và phát triển xơ gan do tiếp xúc với các tác nhân độc hại trên người [32][46].

2.1.4. Phương tiện – Hóa chất nghiên cứu khác

- Máy xét nghiệm sinh hoá tự động Chemix 180 hãng Sysmex.
- Máy xét nghiệm huyết học tự động XE2100, hãng Sysmex .
- Cân phân tích 10-4, model CP224S (Sartorius - Đức)
- Bộ dụng cụ mô động vật cỡ nhỏ, kim cong đầu tù cho chuột uống thuốc được nhập từ Nhật và các dụng cụ thí nghiệm khác: lam kính, giấy lọc whatmann.



Hình 2.3. Máy xét nghiệm huyết học và sinh hóa

- Nước cất.
- Hóa chất làm xét nghiệm và gây xơ gan trên động vật thực nghiệm:
 - + DD CCl_4
 - + Dầu olive
 - + DD Ethanol 30%
 - + DD Formalin 10%

- + DD Nacl 0,9 %
- + DD Toluen
- + DD acid sulfosalic ngậm 3% nước
- + Thuốc nhuộm HE
- + Thuốc nhuộm Masson

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng

68 con chuột cống trắng chủng Wistar, cả 2 giống.



Hình 2.4. Chuột cống trắng chủng Wistar

2.2.2. Tiêu chuẩn chọn mẫu

2.1.2.1. Triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng

Chuột cống trắng trưởng thành cân nặng 180 - 200g, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, 18 con chia thành 2 lô mỗi lô 9 con.

2.1.2.2. Nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CT_{HepaB} trên mô hình động vật thực nghiệm

Chuột cống trắng trưởng thành cân nặng 180 - 200g, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, 50 con chia thành 5 lô mỗi lô 10 con.

2.2.3. Động vật sử dụng trong nghiên cứu

- Động vật do Ban chăn nuôi động vật thí nghiệm – Học viện Quân Y cung cấp, được nuôi trong phòng nuôi động vật thí nghiệm một tuần trước khi nghiên cứu bằng thức ăn chuẩn dành cho động vật nghiên cứu, nước sạch uống tự do, đảm bảo tiêu chuẩn nghiên cứu. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thí nghiệm.

- Điều kiện thử trong môi trường vi khí hậu , nhiệt độ 25⁰C độ ẩm 80%

2.3. Địa điểm nghiên cứu

Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

Bộ môn Dược lý - Học viện Quân y

2.4. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 3/ 2019 đến 12/2019.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Thiết kế nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu thực nghiệm trên động vật (chuột cống trắng), phân nhóm ngẫu nhiên có đối chứng.

2.5.2. Các bước nghiên cứu

2.5.2.1. Triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng

Để triển khai mô hình, chúng tôi thực hiện tóm tắt qua 2 bước:

Bước 1: Gây tổn thương huỷ hoại tế bào gan dẫn đến xơ gan bằng dung dịch CCl₄.

Bước 2: Đánh giá hiệu quả của mô hình gây xơ gan tại các thời điểm nhất định qua một số chỉ số xét nghiệm

2.5.2.2. Đánh giá tác dụng điều trị xơ gan của viên nang cứng CT_{HepaB} trên thực nghiệm.

Để đánh giá, chúng tôi thực hiện tóm tắt qua các bước:

Bước 1: Gây tổn thương huỷ hoại tế bào gan dẫn đến xơ gan bằng dung dịch CCl₄.

Bước 2: Cho chuột đã bị xơ gan uống CT_{HepaB}, thuốc đối chứng.

Bước 3: Đánh giá tác dụng điều trị mô hình gây xơ gan sau khi chuột uống CT_{HepaB}, thuốc đối chứng qua một số chỉ số xét nghiệm .

2.5.3. Cách tiến hành nghiên cứu

2.5.3.1. Triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng

Mô hình gây xơ gan thường được tiến hành trên chuột cống trắng với tác nhân gây xơ là hóa chất CCl_4 hoặc rượu kết hợp chế độ ăn nhiều mỡ. Các mô hình này thường tiến hành trong thời gian dài (trên 10 tuần).

Tác giả Li C. và cộng sự [26] đã mô tả phương pháp gây xơ bằng cả hóa chất, rượu và chế độ ăn, cho phép rút ngắn thời gian gây xơ gan xuống 8 tuần. Dựa theo phương pháp mô tả của Li C. và cộng sự, có cải tiến bổ sung thêm ion sắt trong thức ăn của chuột, chế độ ăn thêm dầu mỡ đã chiên rán 8 giờ, nhóm nghiên cứu tiến hành triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng.

Chuột cống trắng 18 con, chia ngẫu nhiên thành 2 lô:

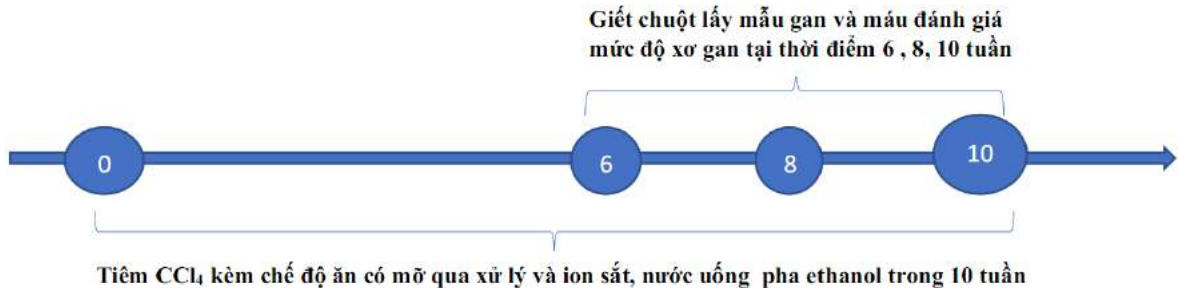
- Lô 1 (lô chứng): không gây xơ gan. Các chuột không gây xơ, hàng ngày nuôi bằng thức ăn, nước uống thông thường.



Hình 2.5. Cho chuột ăn

- Lô 2 (lô mô hình): gây xơ gan

Mô hình gây xơ gan được thực hiện như sau:



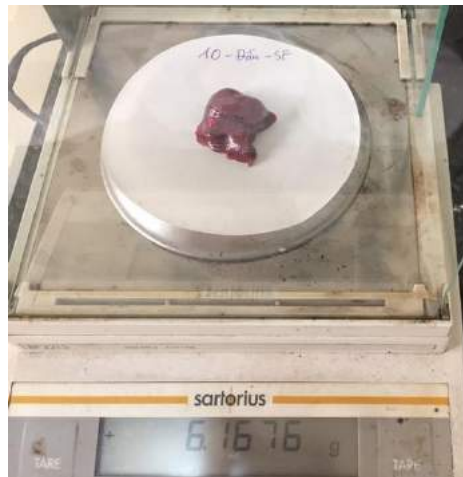
Biểu đồ 2.1. Mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng

Bước 1: Cả 9 con chuột đều được gây xơ gan bằng cách:

- Tiêm dưới da CCl₄ liều lần đầu là 5,0ml/kg chuột.
- Sau đó, mỗi tuần tiêm 2 lần với liều 1,2ml/kg chuột, liên tục trong suốt thời gian nghiên cứu.
- Song song với tiêm CCl₄ cho chuột:
 - + Ăn bằng thức ăn tổng hợp, có thêm 20% mỡ được chiên rán 8 giờ và 0,05% cholesterol và sắt oxalat.
 - + Uống nước: cứ 1 ngày cho uống nước thường, lại 1 ngày cho uống nước có pha thêm 30% ethanol.

Bước 2: Đánh giá hiệu quả của mô hình gây xơ gan 3 thời điểm sau 6 tuần, 8 tuần và 10 tuần (mỗi thời điểm 3 con) từ thời điểm bắt đầu gây xơ, qua các chỉ số sau:

- Quan sát thể trạng chung của chuột
- Cân nặng gan chuột
- Lấy máu để đo hoạt độ enzym AST và ALT
- Giết chuột lấy gan để quan sát mô bệnh học của gan (đại thể và vi thể)



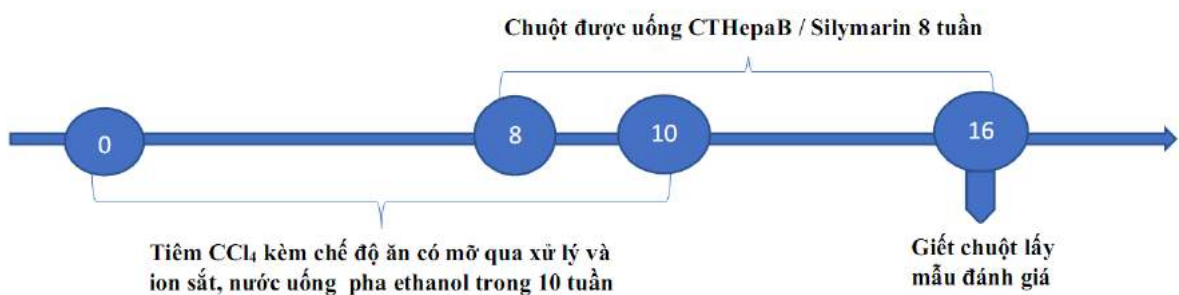
Hình 2.6. Cân gan chuột

2.5.3.2. Nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CT_{HepaB} trên mô hình động vật thực nghiệm

Theo phương pháp nghiên cứu của Li C. và cộng sự, 2003 [26], có sửa đổi.

Chuột cống trắng 50 con chia thành 5 lô mỗi lô 10 con.

- Lô 1 (chứng sinh học): không gây xơ + uống nước cất.
- Lô 2 (chứng gây xơ): gây xơ + uống nước cất.
- Lô 3 (trị 1): gây xơ + uống CT_{HepaB} liều 0,56 g/kg/ngày
- Lô 4 (trị 2): gây xơ + uống CT_{HepaB} liều 1,12 g/kg/ngày (gấp đôi liều 1)
- Lô 5 (Tham chiếu): gây xơ + uống Silymarin 70 mg/kg/ngày.



Biểu đồ 2.2. Mô hình đánh giá tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CT_{HepaB} trên mô hình động vật thực nghiệm

Bước 1 : Các chuột được gây xơ như mục tiêu 1, cụ thể như sau:

Cả 4 lô, từ lô 2 đến lô 5 (50 con chuột) đều được gây xơ gan bằng cách:

- Tiêm dưới da CCl₄ liều lần đầu là 5,0ml/kg chuột.

- Sau đó, mỗi tuần tiêm 2 lần với liều 1,2ml/kg chuột, liên tục trong suốt thời gian nghiên cứu.

- Song song với tiêm CCl₄ cho chuột:

+ Ăn bằng thức ăn tổng hợp, có thêm 20% mỡ được chiên rán 8h và 0,05% cholesterol và sắt oxalat.

+ Uống nước: cứ 1 ngày cho uống nước thường, lại 1 ngày cho uống nước có pha thêm 30% ethanol.

Lô 1 không gây xơ gan, vẫn cho ăn uống bình thường.

Bước 2 : Cho chuột đã bị xơ gan uống CTHepaB, thuốc đối chứng

Sau khi tiêm CCl₄ được 8 tuần cho chuột, bắt đầu cho chuột uống:

- Từ lô 1 đến lô 2 (20 con chuột) đều được uống nước cất
- Từ lô 3 (10 con chuột) đều được uống CTHepaB liều 0,56g/kg/ngày
- Từ lô 4 (10 con chuột) đều được uống CTHepaB liều 1,12g/kg/ngày
- Từ lô 5 (10 con chuột) đều được uống Silymarin 70 mg/kg/ngày

Cách uống: Bột cao khô CTHepaB và Silymarin pha cùng nước uống hàng ngày.

Thời gian uống: các thuốc trên uống liên tục trong thời gian 8 tuần.

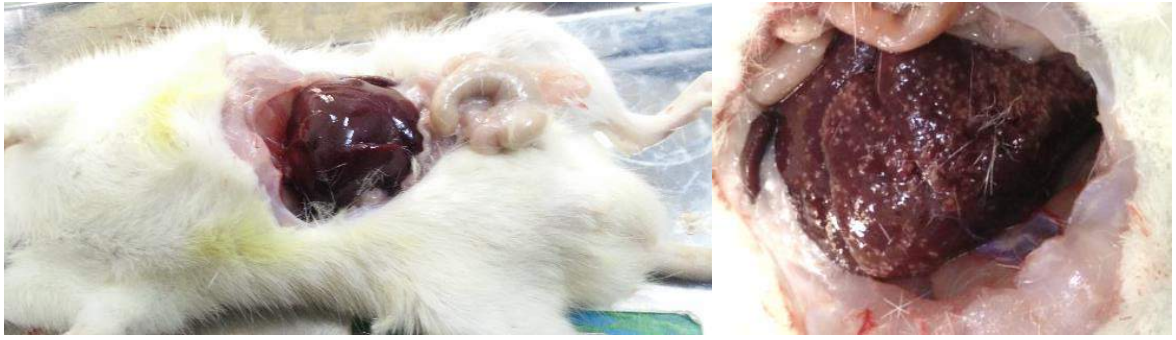
Như vậy chuột được uống thuốc ở 2 tuần cuối của thời gian tiêm CCl₄, và tiếp tục được uống thuốc trong thời gian 6 tuần tiếp theo sau khi kết thúc 10 tuần tiêm CCl₄.

Bước 3: Đánh giá tác dụng điều trị mô hình gây xơ gan sau khi chuột uống CTHepaB, thuốc đối chứng qua một số chỉ số xét nghiệm :

Sau 8 tuần kể từ khi uống thuốc CTHepaB và thuốc tham chiếu Silymarin tiến hành đánh giá các chỉ số sau giữa các lô nghiên cứu về:

- Lấy máu: đo hoạt độ enzym AST, ALT, albumin huyết tương, thời gian prothrombin để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan.

- Lấy gan: cân trọng lượng, định lượng hàm lượng hydroxyproline và quan sát mô bệnh học (đại thể, vi thể).



Hình 2.7. Phân tích lấy gan, lách thận quan sát đại thể và làm mô bệnh học

2.5.3.3. Một số kỹ thuật thực hiện trên thực nghiệm

- Kỹ thuật cho chuột uống cưỡng bức
 - Cố định chuột bằng một tay.
 - Tay còn lại dùng bơm tiêm có gắn kim đầu tù cho vào miệng chuột, bơm nước cất hoặc thuốc nghiên cứu vào thẳng dạ dày chuột theo liều đã xác định .



Hình 2.8. Chuột uống thuốc bằng kim đầu tù

- Kỹ thuật lấy máu và huyết tương làm xét nghiệm

Máu toàn phần gồm huyết tương và tế bào máu. Do đó, để thu nhận huyết tương ta phải loại bỏ tế bào máu ra bằng phương pháp ly tâm.

** Cách tiến hành:*

 - Thu máu hốc mắt chuột: Kỹ thuật lấy tại hốc mắt chuột theo Janet Hoff [40].
 - + Cố định chuột bằng một tay. Sát trùng vùng xung quanh mắt chuột.
 - + Dùng micro pipet đâm vào mạch vành gần hốc mắt chuột, thu nhận máu bằng ống eppendoff



Hình 2.9. Lấy máu hốc mắt chuột làm xét nghiệm

- Thu huyết tương:

Ly tâm máu toàn phần 2500 rpm/phút trong 10 phút, sau đó ly tâm 4000 rpm/phút trong 5 phút, thu dịch nổi là huyết tương .

- Kỹ thuật định lượng hydroxyprolin

Theo phương pháp của Santh Rani Thaacur và cộng sự (2006) [58]: Đánh giá lượng collagen trong gan (collagen trong gan thủy phân giải phóng ra hydroxyprolin) thông qua chất chỉ thị màu và đo quang ở bước sóng 520 nm, gan xơ hơn thì kết quả đo quang sẽ cao hơn. Từ kết quả đo quang so với chất chuẩn suy ra nồng độ hydroxyprolin trong gan chuột nghiên cứu.



Hình 2.10. Máy đo quang Biochrom

** Các bước tiến hành:*

- Chuột ở các lô sau khi uống thuốc 2 ngày phẫu thuật, lấy gan quan sát hình ảnh đại thể và cân 500 mg gan chuột ở thùy phải mỗi chuột, nghiền đồng thể trong 10ml acid sulfosalicylic ngâm 3% nước.

- Dịch đồng thể được lọc qua giấy lọc Whatmann số 2.

- Lấy 2ml dịch lọc (hoặc chất chuẩn) cho vào ống nghiệm, thêm 2ml acid ninhydrin, đun cách thủy trong 1 giờ.

- Thêm 4ml toluene vào hỗn hợp phản ứng và khuấy đều trong 2 phút.

- Phân lớp toluene được tách riêng ra và được làm ấm ở nhiệt độ phòng.

- Cường độ của chất màu đỏ được đo ở 520nm. So sánh với đồ thị chuẩn, từ đó suy ra nồng độ hydroxyprolin gan .

- Kỹ thuật làm tiêu bản mô học

Làm mô bệnh học phải cố định cấu trúc mô và nhuộm màu để quan sát so sánh sự biến đổi cấu trúc vi thể của gan chuột trong từng lô.

** Cách tiến hành nhuộm :*

- Mẫu gan chuột được đưa ngay vào cố định trong dung dịch formalin đậm trung tính 10% trong 24h, sau đó được đúc khối paraffin và cắt lát dày 5 μ m làm tiêu bản nhuộm HE và nhuộm Masson.

- Nhuộm HE (Hematoxylin - Eosin) là phương pháp nhuộm hai màu liên tiếp, nhuộm cho biết cấu trúc tổng quan của tế bào và mô. Nhuộm nhân theo nguyên tắc tăng dần, nhuộm bào tương theo nguyên tắc giảm dần. Các phiên đồ bảo quản được lâu dài, nhưng không tốt bằng nhuộm Papanicolaou. Sau nhuộm : nhân tế bào có màu xanh đến xanh đen, bào tương tế bào có màu hồng đến đỏ, hồng cầu có màu hồng đậm, sợi tạo keo có màu hồng nhạt [6].

- Nhuộm Masson là phương pháp nhuộm rất thích hợp cho việc phát hiện thành phần của mô liên kết và được xếp vào nhóm “nhuộm 3 màu”. Thuật ngữ “nhuộm 3 màu” là tên gọi chung cho nhiều kỹ thuật nhằm phát hiện một cách chọn lọc thành phần cơ, sợi tạo keo, sợi tơ huyết và hồng cầu. Sau nhuộm: nhân có xanh da trời- đen, bào tương, sợi cơ và hồng cầu có màu đỏ, sợi tạo keo có màu xanh da trời [6].

- Soi tiêu bản trên kính hiển vi đánh giá các thay đổi mô bệnh học của gan chuột ở các lô nghiên cứu.

2.6. Chỉ tiêu nghiên cứu

2.6.1. Triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng

- Quan sát thể trạng chung của chuột.
- Cân nặng chuột.
- Lấy máu để đo hoạt độ enzym AST và ALT.
- Giết chuột lấy gan để quan sát mô bệnh học của gan (đại thể và vi thể).

2.6.2. Nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CT_{HepaB} trên mô hình động vật thực nghiệm

- Cân nặng chuột
- Gan:
 - + Cân và ghi nhận trọng lượng.
 - + Quan sát đại thể: về màu sắc, tình trạng bề mặt, tổn thương.
 - + Nhuộm HE và nhuộm Masson, để đánh giá mức độ tổn thương và xơ gan qua hình ảnh mô bệnh học gan chuột vi thể.
- + Định lượng hàm lượng Hydroxyprolin.
- Máu:
 - + Hoạt độ enzym AST
 - + Hoạt độ enzym ALT
 - + Albumin huyết tương
 - + Thời gian Prothrombin

2.7. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học, so sánh bằng anova, hậu kiểm Turkey test, sử dụng phần mềm SPSS 16.0. Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.8. Sai số và cách không chế sai số

Để hạn chế các sai số trong quá trình nghiên cứu, nghiên cứu này thực hiện một số quy định yêu cầu: cho chuột nhịn ăn trước 12h, trọng lượng của chuột đồng đều.

2.9. Đạo đức nghiên cứu

- Thuốc cũng đã được thực hiện xác định độc tính cấp, độc tính bán trường diễn.
- Nghiên cứu được Hội đồng khoa học của Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam thông qua.
- Các số liệu thu thập trong nghiên cứu là hoàn toàn trung thực, có độ tin cậy và chính xác cao.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng.

3.1.1. Kết quả đánh giá về thể trạng chuột

Các chuột gây xơ gan có biểu hiện xù lông, rụng lông, mệt mỏi giảm hoạt động, giảm cân nặng hơn so với các chuột không gây xơ gan.

Bảng 3.1. Kết quả đánh giá cân nặng của chuột nghiên cứu ($n = 3$)

Thời điểm xét nghiệm	Cân nặng của chuột (g; $\bar{X} \pm SD$)		Giá trị p
	Lô 1 (lô chứng) (1)	Lô 2 (mô hình) (2)	
6 tuần (a)	196,67 \pm 4,51	184,33 \pm 4,04	$p_{2-1} < 0,05$
8 tuần (b)	206,67 \pm 4,16	188,33 \pm 6,03	$p_{2-1} < 0,05$
10 tuần (c)	217,33 \pm 4,73	192,00 \pm 6,00	$p_{2-1} < 0,01$
Giá trị p	$p_{b-a} < 0,05$; $p_{c-b} < 0,05$; $p_{c-a} < 0,01$	$p_{b-a} > 0,05$; $p_{b-a} > 0,05$; $p_{c-b} > 0,05$	-

Kết quả bảng 3.1 cho thấy:

Các chuột ở lô chứng có cân nặng trung bình khi đánh giá ở thời điểm 8, 10 tuần cao hơn có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 6 tuần ($p_{b-a} < 0,05$; $p_{c-b} < 0,05$; $p_{c-a} < 0,01$). Theo thứ tự (206,67; 217,33) g so với 196,67g.

Trong khi đó, các chuột ở lô mô hình, gây xơ gan có cân nặng trung bình khi đánh giá ở thời điểm sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với thời điểm trước ($p_{b-a} > 0,05$; $p_{b-a} > 0,05$; $p_{c-b} > 0,05$). Theo thứ tự (188,33; 192)g so với 184,33g.

So với lô chứng (không gây xơ) giá (196,67; 206,67; 217,33 g), tại cả 3 thời điểm đánh, cân nặng của chuột ở lô mô hình (gây xơ gan) (184,33; 188,33; 192,00 g) đều giảm có ý nghĩa thống kê ($p_{2-1} < 0,05$, $p_{2-1} < 0,01$).

Các tác nhân hóa chất CCl_4 , chế độ ăn giàu chất béo và rượu tác động làm chuột gần như không có sự phát triển đáng kể về cân nặng, do đó cân nặng của chuột ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng.

3.1.2. Kết quả biến đổi enzym AST và ALT của gan chuột

Bảng 3.2. Hoạt độ enzym AST trung bình trong máu chuột tăng tại các thời điểm nghiên cứu (n =3) (U/L)

Thời điểm xét nghiệm	Kết quả (U/l; $\bar{X} \pm SD$)		P(2-1)
	Lô chứng (1)	Lô mô hình (2)	
6 tuần (a)	106,26 \pm 14,79	450,24 \pm 56,59	< 0,01
8 tuần (b)	112,65 \pm 16,92	531,27 \pm 62,98	< 0,01
10 tuần (c)	119,71 \pm 19,42	546,64 \pm 69,54	< 0,01
Giá trị p	$p_{b,c-a} > 0,05$; $p_{c-b} > 0,05$	$p_{b,c-a} > 0,05$; $p_{c-b} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.2 cho thấy:

Lô chứng, nghĩa là không gây xơ gan, tại thời điểm 8, 10 tuần so với 6 tuần, hoạt độ enzym AST trung bình trong máu chuột có sự khác nhau, nhưng không có ý nghĩa thống kê $p_{b,c-a} > 0,05$; $p_{c-b} > 0,05$, theo thứ tự (112,65; 119,71) U/l so với 106,26 U/l).

Lô mô hình, gây xơ gan, tại thời điểm 8, 10 tuần so với 6 tuần, hoạt độ enzym AST trung bình trong máu chuột có sự khác nhau, nhưng không có ý nghĩa thống kê, theo thứ tự (531,27; 546,64) U/l so với 450,24 U/l.

So với lô chứng không gây xơ (106,26 ; 112,65 và 119,71 U/l), tại tất cả các thời điểm xét nghiệm, hoạt độ enzym AST ở lô mô hình gây xơ gan (giá trị tương ứng 450,24 ; 531,27 U/l và 546,64 U/l) đều tăng cao rõ rệt có ý nghĩa thống kê ($P_{2-1} < 0,01$).

Các tác nhân hóa chất CCl_4 , chế độ ăn giàu chất béo và rượu làm tăng sự hủy hoại tế bào gan, tổn thương nhu mô gan. Do đó làm tăng AST trong máu chuột. Thời gian nhiễm độc càng dài mức độ tổn thương nhu mô gan càng tăng.

Bảng 3.3. Hoạt độ enzym ALT trung bình trong máu chuột tăng tại các thời điểm nghiên cứu (n=3) (U/L)

Thời điểm xét nghiệm	Kết quả (U/l; $\bar{X} \pm SD$)		P ₍₂₋₁₎
	Lô chứng (1)	Lô mô hình (2)	
6 tuần (a)	98,68 ± 14,15	403,81 ± 54,16	< 0,01
8 tuần (b)	104,53 ± 18,61	453,81 ± 61,41	< 0,01
10 tuần (c)	112,65 ± 19,92	531,27 ± 64,98	< 0,01
Giá trị p	p _{b,c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05	p _{b,c-a} > 0,05; p _{c-b} > 0,05	

Kết quả bảng 3.3 cho thấy:

Lô chứng, nghĩa là không gây xơ gan, tại thời điểm 8, 10 tuần so với 6 tuần, hoạt độ enzym ALT trung bình trong máu chuột có sự khác nhau, nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$, theo thứ tự (104,53; 112,65) U/l so với 98,68 U/l.

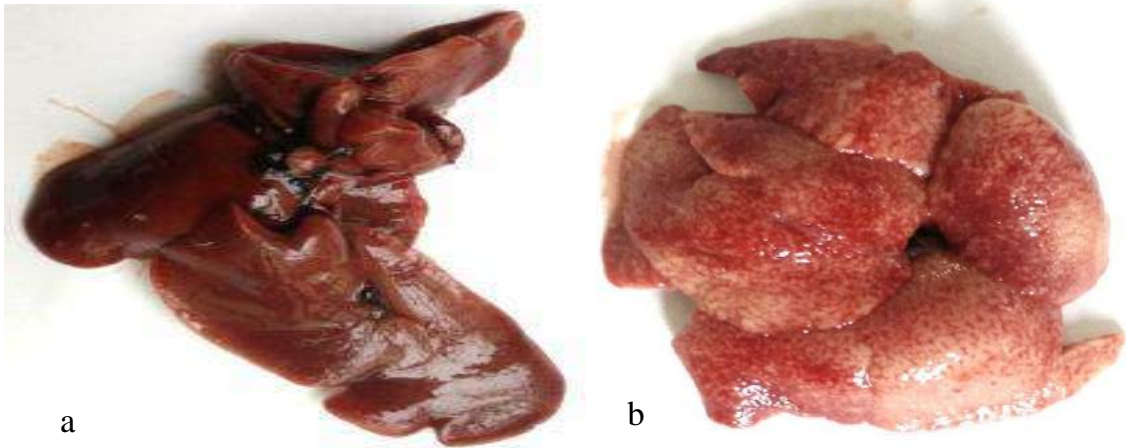
Lô mô hình, gây xơ gan, tại thời điểm 8, 10 tuần so với 6 tuần, hoạt độ enzym ALT trung bình trong máu chuột có sự khác nhau, nhưng không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$, theo thứ tự (531,27; 453,81) U/l so với 403,81 U/l.

So với lô chứng không gây xơ (98,68; 104,53 U/l và 112,65 U/l), tại tất cả các thời điểm xét nghiệm. hoạt độ enzym ALT ở lô mô hình gây xơ gan (trương ứng với 403,81; 453,81 và 531,27 U/l) đều tăng cao rõ rệt có ý nghĩa thống kê ($P_{1-2} < 0,01$).

Các tác nhân hóa chất CCl₄, chế độ ăn giàu chất béo và rượu làm tăng sự hủy hoại tế bào gan, tổn thương nhu mô gan. Do đó làm tăng ALT trong máu chuột. Thời gian nhiễm độc càng dài mức độ tổn thương nhu mô gan càng tăng .

3.1.3. Kết quả thay đổi đại thể gan chuột

* Tại thời điểm 6 tuần



Hình 3.1. Hình ảnh đại thể gan chuột tại thời điểm 6 tuần

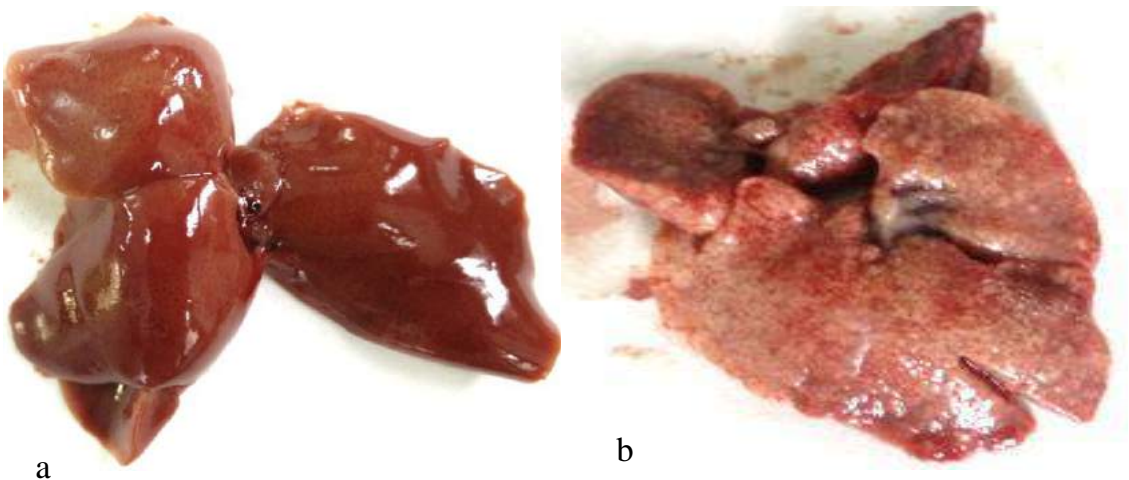
a. Lô chứng, b. Lô gây xơ

Nhận xét hình ảnh đại thể:

- Lô chứng (Hình 3.1a): hình ảnh gan chuột bình thường. Bề mặt gan hồng, nhẵn mịn, mật độ gan mềm.

- Lô mô hình (Hình 3.1b): Hình ảnh xơ hóa gan chuột. Gan chuột có bề mặt nhợt nhạt, xù xì, mật độ gan cứng chắc hơn so với gan chuột ở lô chứng.

* Tại thời điểm 8 tuần



Hình 3.2. Hình ảnh đại thể gan chuột tại thời điểm 8 tuần

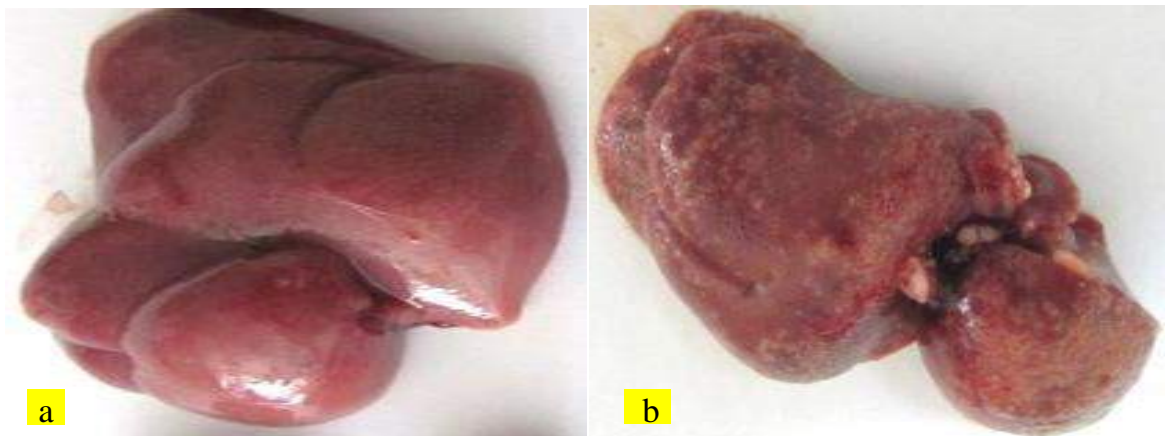
a. Lô chứng, b. Lô gây xơ

Nhận xét hình ảnh đại thể:

- Lô chứng (Hình 3.2a): hình ảnh gan chuột bình thường. Bề mặt gan hồng, nhẵn mịn, mật độ gan mềm, không khác biệt với lô chứng tại thời điểm 6 tuần.

- Lô mô hình (Hình 3.2b): Hình ảnh xơ hóa gan chuột. Gan chuột có bề mặt nhợt màu, xù xì, mật độ gan cứng chắc hơn so với gan chuột ở lô chứng và so với gan chuột lô mô hình tại thời điểm 6 tuần. Có những nốt tân tạo đường kính nhỏ hơn 1mm.

** Tại thời điểm 10 tuần*



Hình 3.3. Hình ảnh đại thể gan chuột tại thời điểm 10 tuần

a. Lô chứng, b. Lô gây xơ

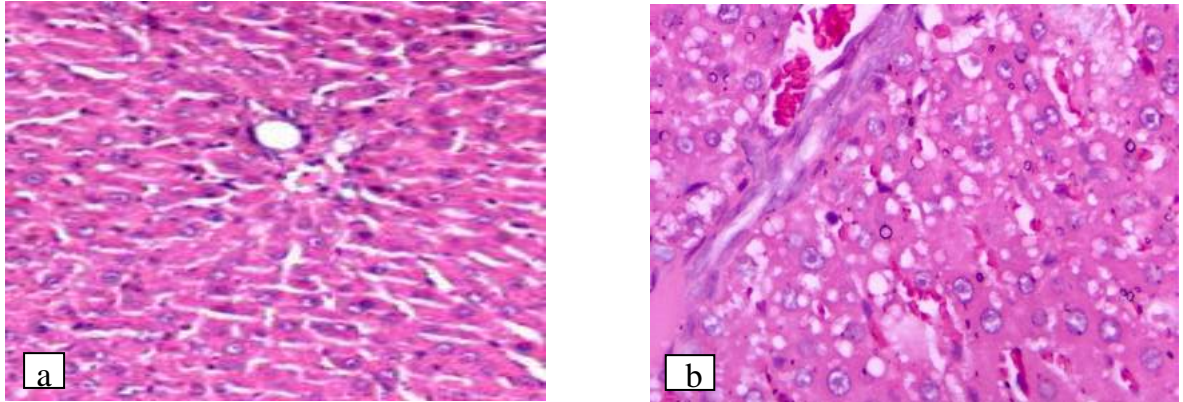
Nhận xét hình ảnh đại thể:

- Lô chứng (Hình 3.3a): hình ảnh gan chuột bình thường. Bề mặt gan hồng, nhẵn mịn, mật độ gan mềm, không khác biệt với lô chứng tại thời điểm 6 tuần và 8 tuần.

- Lô mô hình (Hình 3.3b): Hình ảnh xơ hóa gan chuột. Gan chuột có bề mặt nhợt màu, xù xì, có các nốt tân tạo, mật độ gan cứng chắc hơn so với gan chuột ở lô chứng và so với gan chuột lô mô hình tại thời điểm 6 tuần, 8 tuần. Có những nốt tân tạo to nhỏ không đều, có nốt đường kính 2mm, nổi gồ lên trên bề mặt gan. Có những vùng gan ứ máu, tím đen.

3.1.4. Kết quả thay đổi vi thể gan chuột

* Tại thời điểm 6 tuần



Hình 3.4: Hình ảnh vi thể gan chuột (HE x 400) tại thời điểm 6 tuần

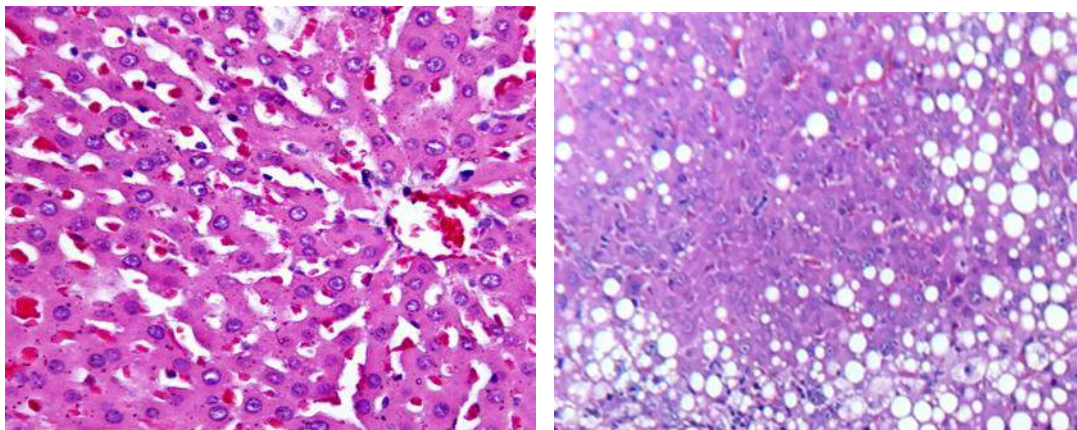
a. Lô chứng, b. Lô gây xơ

Nhận xét hình ảnh vi thể:

- Lô chứng (Hình 3.4a): hình ảnh vi thể gan chuột bình thường. Các tế bào gan bình thường. Cấu trúc tiểu thụỳ gan bình thường. Không có hình ảnh viêm, thoái hoá tế bào gan, không có hình ảnh xơ hoá gan.

- Lô mô hình (Hình 3.4b): Hình ảnh thoái hoá mỡ tế bào gan. Có các tế bào gan thoái hoá mỡ. Hình ảnh xơ hoá gan có những chưa rõ rệt, vẫn còn các bè Remak, mao mạch nan hoa.

* Tại thời điểm 8 tuần



Hình 3.5. Hình ảnh vi thể gan chuột (HE x 400) tại thời điểm 8 tuần

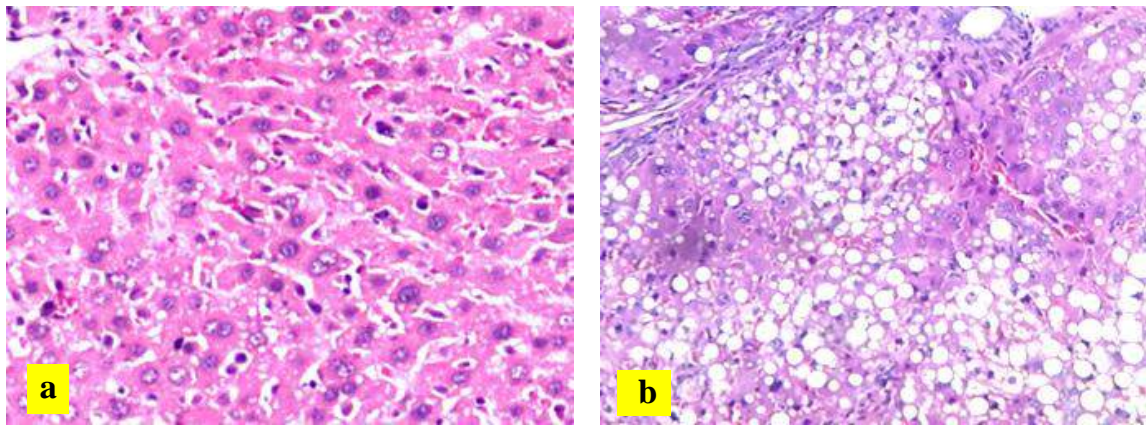
a.Lô chứng, b.Lô gây xơ

Nhận xét hình ảnh vi thể:

- Lô chứng (Hình ảnh 3.5a): hình ảnh vi thể gan chuột bình thường. Các tế bào gan bình thường. Cấu trúc tiểu thụ gan bình thường. Không có hình ảnh viêm, thoái hoá tế bào gan, không có hình ảnh xơ hoá gan.

- Lô mô hình (Hình ảnh 3.5b): Hình ảnh thoái hoá mỡ tế bào gan mật độ dày hơn so với thời điểm 6 tuần. Hình ảnh dải xơ hoá gan có, mỏng, rõ rệt hơn so với thời điểm 6 tuần. Vẫn còn hình ảnh các bè Remak, mao mạch nan hoa nhưng phân tán và ít hơn ở thời điểm 6 tuần.

** Tại thời điểm 10 tuần*



Hình 3.6. Hình ảnh vi thể gan chuột (HE x 400) tại thời điểm 10 tuần

a.Lô chứng, b.Lô gây xơ

Nhận xét hình ảnh vi thể:

Lô chứng (Hình 3.6a): hình ảnh vi thể gan chuột bình thường. Các tế bào gan bình thường. Cấu trúc tiểu thụ gan bình thường. Không có hình ảnh viêm, thoái hoá tế bào gan, không có hình ảnh xơ hoá gan.

- Lô mô hình (Hình 3.6b): Hình ảnh thoái hoá mỡ tế bào gan. Có nhiều các tế bào gan thoái hoá mỡ nhiều, mật độ dày hơn so với thời điểm 6 tuần và 8 tuần. Hình ảnh cấu trúc tiểu thụ gan bị phá vỡ, có dải xơ hoá gan nhiều và rộng, rõ rệt hơn so với thời điểm 6 tuần và 8 tuần, thâm nhiễm nhiều tế bào viêm trong dải xơ. Dải xơ chia cắt làm đảo lộn cấu trúc tiểu thụ gan.

3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CTHePaB trên mô hình động vật thực nghiệm.

3.2.1. Kết quả đánh giá về thể trạng chuột.

Các chuột gây xơ gan có biểu hiện xù lông, rụng lông, mệt mỏi giảm hoạt động, giảm cân nặng so với các chuột không gây xơ gan. Chuột ở các lô dùng thuốc cải thiện rõ rệt các triệu chứng trên so với ở lô chứng gây xơ gan không dùng thuốc.

Bảng 3.4. Tác dụng của CTHePaB lên cân nặng của chuột nghiên cứu (n = 10)

Lô nghiên cứu	Cân nặng của chuột (g)	
	$\bar{X} \pm SD$	% tăng, giảm
Chứng sinh học (1)	221,43 ± 19,41	-
Chứng gây xơ (2)	195,23 ± 21,95	Giảm 11,83% so với (1)
Silymarin (3)	215,94 ± 18,48	Tăng 10,61% so với (2)
CTHePaB liều 1 (4)	213,44 ± 15,53	Tăng 9,33% so với (2)
CTHePaB liều 2 (5)	218,58 ± 17,95	Tăng 11,93% so với (2)
p	$p_{2-1} < 0,05; p_{3,4,5-2} < 0,05; p_{4,5-3} > 0,05; p_{4-5} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.4 cho thấy:

- So với lô chứng sinh học, cân nặng của chuột ở lô chứng gây xơ gan giảm 11,83%. Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- So với lô chứng gây xơ gan, các lô dùng CTHePaB có cân nặng lớn hơn. Mức độ tăng cân nặng của chuột ở các lô dùng Silymarin, CTHePaB liều 1 và CTHePaB liều 2 so với lô chứng gây xơ gan lần lượt là 10,61%, 9,33% và 11,93%, tương ứng. Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- So sánh giữa 2 lô dùng CTHePaB với lô dùng Silymarin, cân nặng chuột ở các lô khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). So sánh giữa 2 lô dùng CTHePaB với nhau thấy ở lô dùng thuốc liều cao có cân nặng chuột cao hơn so với ở lô dùng liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.2. Kết quả đánh giá về một số chỉ tiêu trong máu chuột .

3.2.2.1. Kết quả đánh giá về enzym AST của chuột nghiên cứu

Bảng 3.5. Tác dụng CTHePaB lên AST của chuột nghiên cứu (n=10) (U/L)

Lô nghiên cứu	Hoạt độ AST trong máu (U/L)	
	$\bar{X} \pm SD$	% giảm so với (2)
Chứng sinh học (1)	116,92±19,29	-
Chứng gây xơ (2)	517,49±68,44	-
Silymarin (3)	290,17±33,38	43,93 %
CTHePaB liều 1 (4)	297,14±35,97	42,58 %
CTHePaB liều 2 (5)	261,51±34,34	49,46 %
p	$P_{2-1} < 0,01$; $p_{3,4,5-2} < 0,01$; $p_{4-5} < 0,05$; $p_{4-3} > 0,05$; $0,1 > p_{5-3} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.5 cho thấy:

- So với lô chứng sinh học, hoạt độ enzym AST ở tất cả các lô có gây xơ gan đều tăng cao rõ rệt và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (116,92 U/l so 517,49±68,44; 290,17±33,38; 297,14±35,97 và 261,51±34,34 U/l) với $p < 0,01$.

- So với lô chứng gây xơ gan, các lô dùng CTHePaB thể hiện tác dụng làm giảm mức độ tổn thương nhu mô gan: giảm hoạt độ enzym AST (42,58%; 49,46%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

- So sánh giữa 2 lô dùng CTHePaB với nhau thấy ở lô dùng thuốc liều cao (49,46%) hoạt độ các enzym AST giảm hơn ở lô dùng liều thấp (42,58 %) (có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$). Hoạt độ các enzym AST ở lô dùng CTHePaB liều thấp khác biệt không ý nghĩa thống kê so với ở lô dùng Silymarin (43,93 %) ($p > 0,05$), tuy nhiên ở lô dùng liều cao có xu hướng có tác dụng tốt hơn so với ở lô dùng Silymarin ($0,05 < p < 0,1$).

3.2.2.2. Kết quả đánh giá về enzym ALT của chuột nghiên cứu

Bảng 3.6. Tác dụng CTHePaB lên ALT của chuột nghiên cứu (n=10) (U/L)

Lô nghiên cứu	Hoạt độ ALT trong máu (U/L)	
	$\bar{X} \pm SD$	% giảm so với (2)
Chứng sinh học (1)	103,59± 17,11	-
Chứng gây xơ (2)	495,20± 58,60	-
Silymarin (3)	280,19± 34,41	43,42 %
CTHEPAB liều 1 (4)	282,03 ±26,52	43,05 %
CTHEPAB liều 2 (5)	251,29± 34,41	49,25 %
p	p ₁ < 0,01; p _{3,4,5,2} < 0,01; p _{4,5} < 0,05; p _{4,3} > 0,05; 0,1 > p _{5,3} > 0,05	

Kết quả bảng 3.6 cho thấy:

- So với lô chứng sinh học, hoạt độ enzym ALT ở tất cả các lô có gây xơ gan đều tăng cao rõ rệt (103,59± 17,11 U/l so với 495,20± 58,60; 280,19± 34,41; 282,03 ±26,52; 251,29± 34,41 U/l) có ý nghĩa thống kê $p < 0,01$.

- So với lô chứng gây xơ gan, các lô dùng CTHePaB thể hiện tác dụng làm giảm mức độ tổn thương nhu mô gan: giảm hoạt độ enzym ALT (43,05%; 49,25%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

- So sánh giữa 2 lô dùng CTHePaB với nhau thấy ở lô dùng thuốc liều cao (49,25%) hoạt độ các enzym AST giảm hơn ở lô dùng liều thấp (43,05 %) ($p < 0,05$). Hoạt độ các enzym ALT ở lô dùng CTHePaB liều thấp khác biệt không ý nghĩa thống kê so với ở lô dùng Silymarin (43,42 %) ($p > 0,05$), tuy nhiên ở lô dùng liều cao có xu hướng có tác dụng tốt hơn so với ở lô dùng Silymarin ($0,05 < p < 0,1$).

3.2.2.3. Kết quả đánh giá về albumin huyết tương của chuột nghiên cứu

Bảng 3.7. Tác dụng CTHePaB lên nồng độ albumin huyết tương trong máu chuột nghiên cứu (n =10) (g/L)

Lô nghiên cứu	Nồng độ albumin huyết tương (g/L)	
	$\bar{X} \pm SD$	% tăng so với (2)
Chứng sinh học (1)	32,01 ± 1,81	-
Chứng gây xơ (2)	28,86 ± 1,96	-
Silymarin (3)	31,15 ± 1,27	7,94 %
CTHePaB liều 1 (4)	31,10 ± 1,83	7,76 %
CTHePaB liều 2 (5)	31,53 ± 2,04	9,23 %
Giá trị p	$p_{2-1} < 0,01; p_{3,4-1} > 0,05; p_{3,4,5-2} < 0,05; p_{3,4,5} > 0,05; p_{4,3} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.7 cho thấy:

- So với lô chứng sinh học, ở lô chứng gây xơ gan có nồng độ albumin huyết tương giảm có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ (32,01 ± 1,81 U/l so với 28,86 ± 1,96; 31,15 ± 1,27; 31,10 ± 1,83; 31,53 ± 2,04 U/l).

- So với lô chứng gây xơ gan, CTHePaB liều 0,56 g/kg/ngày và 1,12 g/kg/ngày thể hiện tác dụng hồi phục chức năng gan thông qua làm tăng nồng độ albumin huyết tương (7,76 %; 9,23 %). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- Lô dùng CTHePaB liều cao (9,23 %) có tác dụng làm tăng nồng độ albumin huyết tương tốt hơn so với ở lô dùng CTHePaB liều thấp (7,76 %) và lô dùng Silymarin (7,94 %) thông qua đánh giá chỉ số giá trị trung bình, tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.2.4. Kết quả đánh giá về thời gian prothrombin của chuột nghiên cứu

Bảng 3.8. Tác dụng CTHepaB lên thời gian prothrombin của máu chuột nghiên cứu (n =10) (s)

Lô nghiên cứu	Thời gian prothrombin (s)	
	$\bar{X} \pm SD$	% giảm so với (2)
Chứng sinh học (1)	7,77 ± 0,76	-
Chứng gây xơ (2)	9,38 ± 0,81	-
Silymarin (3)	8,38 ± 0,76	10,61%
CTHepaB liều 1 (4)	8,43 ± 0,73	10,13%
CTHepaB liều 2 (5)	8,13 ± 0,79	13,28%
Giá trị p	$p_{2-1} < 0,01; p_{3,4,5-1} > 0,05; p_{3,4,5,2} < 0,05; p_{3,4,5} > 0,05; p_{4,3} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.8 cho thấy:

- So với lô chứng sinh học, ở lô chứng gây xơ gan có thời gian prothrombin kéo dài hơn có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ (7,77 ± 0,76 so với 9,38 ± 0,81; 8,38 ± 0,76; 8,43 ± 0,73; 8,13 ± 0,79 s).

- So với lô chứng gây xơ gan, CTHepaB liều 0,56 g/kg/ngày và 1,12 g/kg/ngày thể hiện tác dụng làm hồi phục chức năng gan thông qua làm giảm thời gian prothrombin (10,13 %, 13,28 %). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- Lô dùng CTHepaB liều cao (13,28%) có tác dụng làm giảm thời gian prothrombin tốt hơn so với ở lô dùng CTHepaB liều thấp (10,13%) và lô dùng Silymarin (10,61%) thông qua đánh giá chỉ số giá trị trung bình, tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.3. Kết quả đánh giá về một số chỉ tiêu trong gan chuột .

3.2.3.1. Kết quả đánh giá hàm lượng hydroxyprolin

Bảng 3.9. Tác dụng CTHePaB lên hàm lượng hydroxyprolin trong gan chuột nghiên cứu (n=10) ($\mu\text{g/g}$)

Lô nghiên cứu	Hàm lượng hydroxyprolin trong gan ($\mu\text{g/g}$)	
	$\bar{X} \pm \text{SD}$	% giảm so với (2)
Chứng sinh học (1)	49,29 \pm 9,05	-
Chứng gây xơ (2)	281,68 \pm 45,36	-
Silymarin (3)	169,41 \pm 14,72	39,86 %
CTHePaB liều 1 (4)	170,70 \pm 12,71	39,40 %
CTHePaB liều 2 (5)	156,07 \pm 14,92	44,59 %
Giá trị p	$p_{1-1} < 0,01$; $p_{3,4,5-2} < 0,01$; $p_{4-5} < 0,05$; $p_{4-3} > 0,05$; $0,1 > p_{5-3} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.9 cho thấy:

- So với lô chứng sinh học, hàm lượng hydroxyprolin ở tất cả các lô có gây xơ gan đều tăng cao rõ rệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,01$ (49,29 \pm 9,05 $\mu\text{g/g}$ so với 281,68 \pm 45,36; 169,41 \pm 14,72; 170,70 \pm 12,71; 156,07 \pm 14,92 $\mu\text{g/g}$).

- So với lô chứng gây xơ gan, các lô dùng CTHePaB thể hiện tác dụng làm giảm mức độ tổn thương nhu mô gan: giảm mức độ xơ hóa gan thông qua làm giảm hàm lượng hydroxyprolin trong gan (39,40% và 44,59%) so với lô chứng gây xơ gan. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

- So sánh giữa 2 lô dùng CTHePaB với nhau, thấy ở lô dùng thuốc liều cao (44,59%) hàm lượng hydroxyprolin giảm hơn ở lô dùng liều thấp (39,40 %) ($p < 0,05$). Hàm lượng hydroxyprolin ở lô dùng CTHePaB liều thấp khác biệt không ý nghĩa thống kê so với ở lô dùng Silymarin (39,86 %) ($p > 0,05$), tuy nhiên ở lô dùng liều cao có xu hướng có tác dụng tốt hơn so với ở lô dùng Silymarin ($0,05 < p < 0,1$).

3.2.3.2. Kết quả đánh giá cân nặng gan chuột

Bảng 3.10. Tác dụng CTHepaB lên cân nặng gan chuột nghiên cứu (n=10) (mg/100g)

Lô nghiên cứu	Cân nặng gan (mg/100g)	
	$\bar{X} \pm SD$	% giảm so với (2)
Chứng sinh học (1)	2,53 ± 0,29	-
Chứng gây xơ (2)	3,03 ± 0,36	-
Silymarin (3)	2,66 ± 0,31	12,15%
CTHepaB liều 1 (4)	2,69 ± 0,26	11,13%
CTHepaB liều 2 (5)	2,64 ± 0,32	12,88%
Giá trị p	p ₂₋₁ < 0,01; p _{3,4,5-1} > 0,05; p _{3,4,5-2} < 0,05; p _{3,4,5} > 0,05; p ₄₋₃ > 0,05	

Kết quả bảng 3.10 cho thấy:

- So với lô chứng sinh học, ở lô chứng gây xơ gan có cân nặng của gan chuột lớn hơn có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ (2,53 ± 0,29 mg/100g so với 3,03 ± 0,36; 2,66 ± 0,31; 2,69 ± 0,26; 2,64 ± 0,32 mg/100g).

- So với lô chứng gây xơ gan, CTHepaB liều 0,56 g/kg/ngày và 1,12 g/kg/ngày thể hiện tác dụng làm giảm mức độ viêm xơ gan ở chỉ số đánh giá về cân nặng gan (11,13%, 12,88%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- Lô dùng CTHepaB liều cao (12,88%) có tác dụng làm giảm cân nặng của gan hơn so với ở lô dùng CTHepaB liều thấp (11,13%) và lô dùng Silymarin (12,15%) thông qua đánh giá chỉ số giá trị trung bình, tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.4. Kết quả đánh giá về hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột

3.2.4.1. Hình ảnh đại thể gan ở các lô chuột nghiên cứu



Hình 3.7. Hình ảnh đại thể gan chuột:

a. Lô chứng sinh học; b. Lô chứng gây xơ; c. Lô uống Silymarin 70g/kg/24 giờ;

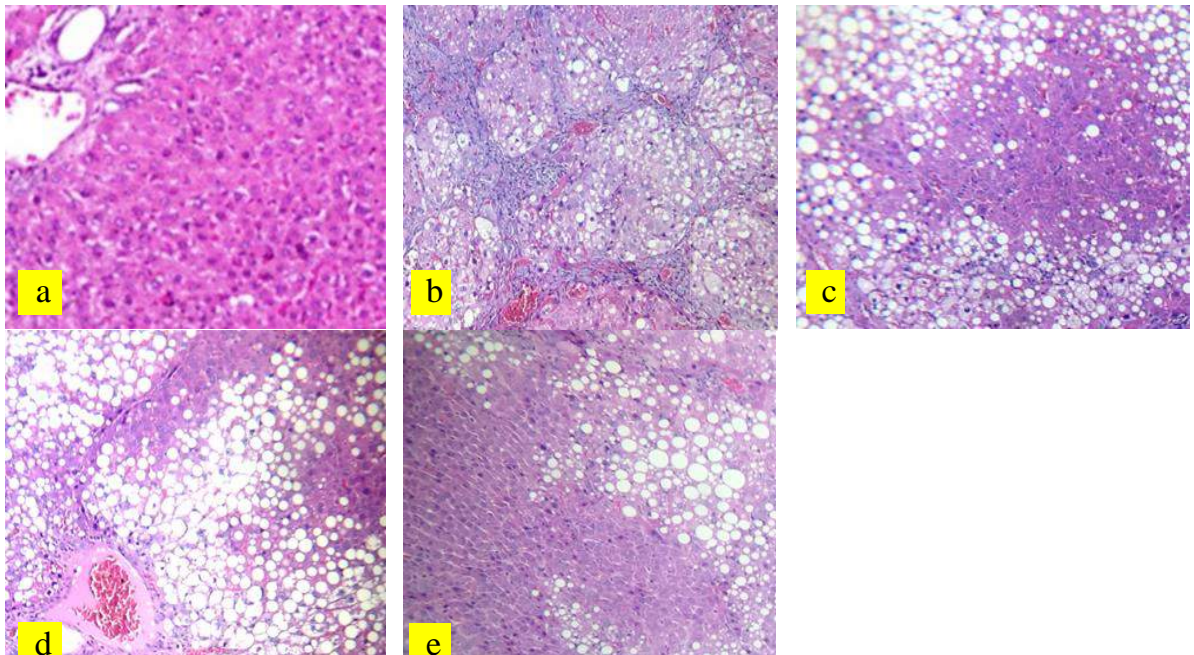
d. Lô uống CTHePaB 0,56 g/kg/24 giờ; e. Lô uống CTHePaB 1,12 g/kg/24 giờ.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của Viên nang CTHePaB lên hình ảnh đại thể gan chuột

Lô nghiên cứu	Hình ảnh gan chuột đại thể
Chứng sinh học (a)	Bề mặt gan hồng, nhẵn mịn, mật độ gan mềm, màu gan nâu thẫm bóng (ảnh 3.7a)
Chứng gây xơ (b)	Bề mặt gan xù xì, nổi rõ nhiều hình ảnh các nốt tân tạo, mật độ gan chắc, kích thước nhỏ nhất trong 5 lô (ảnh 3.7b)
Silymarin (c)	Bề mặt gan xù xì, nổi rõ nhiều hình ảnh các nốt tân tạo, mật độ gan chắc, màu gan nâu nhạt gần giống như lô (b) (ảnh 3.7c)
CTHePaB liều 1 (d)	Bề mặt gan xù xì, nổi rõ nhiều hình ảnh các nốt tân tạo, mật độ gan chắc, màu gan nâu nhạt gần giống như lô (c), (b) bạc màu hơn lô (a) (ảnh 3.7d)
CTHePaB liều 2 (e)	Bề mặt gan xù xì, nổi rõ nhiều hình ảnh các nốt tân tạo, mật độ gan chắc, màu gan nâu thẫm, không bạc màu như lô (d), (c), (b) (ảnh 3.7e)

3.2.4.2. Hình ảnh vi thể gan ở các lô chuột nghiên cứu

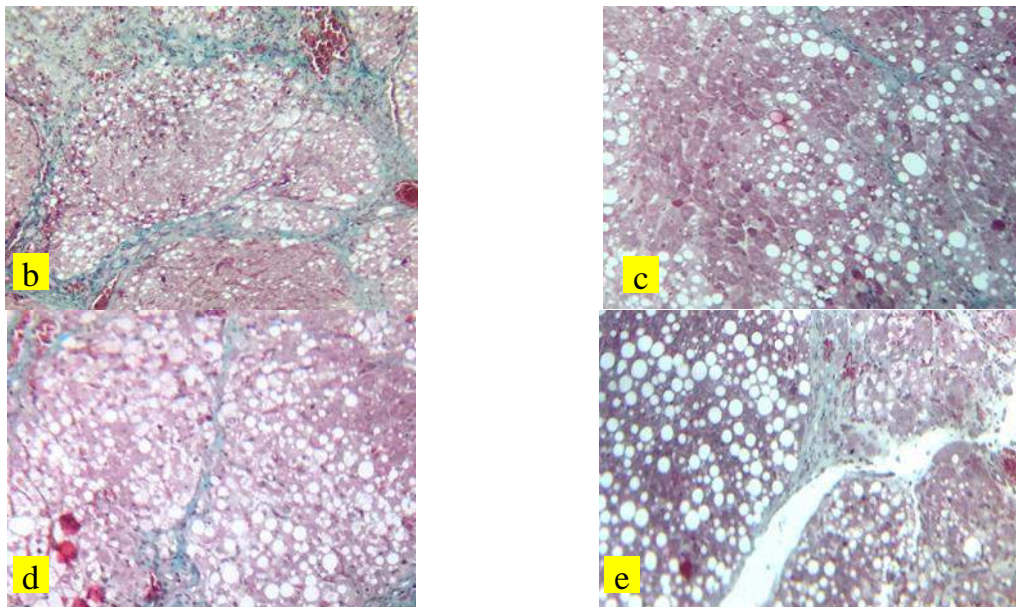
Hình ảnh vi thể gan nhuộm HE ở các lô chuột nghiên cứu



Hình 3.8 . Hình ảnh vi thể gan chuột nhuộm HEx400:

- a. Lô chứng sinh học; b. Lô chứng gây xơ; c. Lô uống Silymarin 70g/kg/24 giờ;
d. Lô uống CT HepaB 0,56 g/kg/24 giờ; e. Lô uống CT HepaB 1,12 g/kg/24 giờ.

Hình ảnh vi thể gan nhuộm Masson ở các lô chuột nghiên cứu



Hình 3.9. Hình ảnh vi thể gan chuột nhuộm Masson x400:

- b. Lô chứng gây xơ; c. Lô uống Silymarin 70g/kg/24 giờ;
d. Lô uống CT HepaB 0,56 g/kg/24 giờ; e. Lô uống CT HepaB 1,12 g/kg/24 giờ.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của Viên nang CT_{HepaB} lên hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột

Lô nghiên cứu	Hình ảnh gan chuột vi thể	
	Nhuộm HE	Nhuộm Mason
Chứng sinh học (a)	Các tế bào gan bình thường, tĩnh mạch trung tâm rõ, các bè gan và tiểu thùy gan không thay đổi về cấu trúc (ảnh 3.8a).	Không có dải xơ
Chứng gây xơ (b)	Các dải xơ từ khoảng cửa phát triển vào và bao vây chia cắt tiểu thùy gan thành các tiểu thùy gan giả. Các tế bào gan bị thoái hóa mỡ. Hình thành các ổ tái tạo tế bào gan. Khoảng cửa tăng sinh ống mật và mao mạch máu. (ảnh 3.8b)	hình ảnh các dải xơ trong khoảng cửa tăng sinh bao vây chia cắt các tiểu thùy gan bắt màu xanh rõ (ảnh 3.9 b)
Silymarin (c)	Các dải xơ mảnh, không rõ rệt, không gây chia cắt tiểu thùy gan thành các tiểu thùy gan giả, hình ảnh tổn thương chủ yếu là thoái hóa mỡ của tế bào gan (ảnh 3.8 c)	các dải xơ mảnh, bắt màu nhẹ (ảnh 3.9 c)
CT _{HepaB} liều 1 (d)	Các dải xơ mảnh, không rõ rệt, không gây chia cắt tiểu thùy gan thành các tiểu thùy gan giả, hình ảnh tổn thương chủ yếu là thoái hóa mỡ của tế bào gan (ảnh 3.8d)	các dải xơ mảnh, bắt màu nhẹ (ảnh 3.9d)
CT _{HepaB} liều 2 (e)	Các dải xơ mảnh, không rõ rệt, không gây chia cắt tiểu thùy gan thành các tiểu thùy gan giả, hình ảnh tổn thương chủ yếu là thoái hóa mỡ của tế bào gan (ảnh 3.8e)	Các dải xơ mảnh, bắt màu không rõ rệt (ảnh 3.9 e).

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Nghiên cứu triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng.

Mô hình gây xơ gan có thể được tiến hành trên chuột cống. Các tác nhân gây xơ là hóa chất (CCl_4) hoặc còn kết hợp chế độ ăn nhiều mỡ [26]. Chuột cống thường được sử dụng nhiều hơn [32], có thể do khả năng chịu đựng với việc sử dụng hóa chất gây tổn thương gan kéo dài, và cũng do chuột cống to hơn nên các mẫu nghiên cứu (gan, máu...) cho phép đánh giá được nhiều chỉ tiêu hơn .

Khi tiến hành gây tổn thương gan do CCl_4 , tế bào gan bị tổn thương do tác động gây độc của CCl_4 , đặc biệt tác dụng gây peroxide hóa lipid màng tế bào. Quá trình tổn thương lặp đi lặp lại gây ra biến đổi cấu trúc mô học gan, các tổ chức liên kết phát triển gây ra tình trạng xơ hóa gan [32]. Độc ở gan do CCl_4 càng mạnh khi có những yếu tố đi kèm như kết hợp với chất uống có cồn (như ethanol), gan nhiễm mỡ, gan nhiễm sắt...

Để gây nhiễm mỡ gan, cũng như làm tăng các gốc tự do trong cơ thể gây tổn thương gan, chế độ ăn giàu chất béo được nhiều tác giả tiến hành. Chuột cống là loài động vật phàm ăn nên việc triển khai chế độ ăn giàu chất béo cho chuột được tiến hành tương đối thuận lợi. Đặc biệt khi sử dụng loại dầu mỡ chiên rán kéo dài (8h) cho chuột, lượng mỡ xấu hình thành cũng như tác động gây tổn thương oxy hóa cho chuột cao. Sắt đóng vai trò đáng kể làm khuếch đại phản ứng oxy hóa ở mô cơ thể, đặc biệt là mô gan [51]. Tổn thương gan tăng lên đáng kể khi gan bị nhiễm sắt. Chất uống có cồn như ethanol bản thân nó cũng gây tổn thương gan [32], khi dùng cùng CCl_4 thì tổn thương gan mang tính chất cộng hưởng, tăng lên rất mạnh.

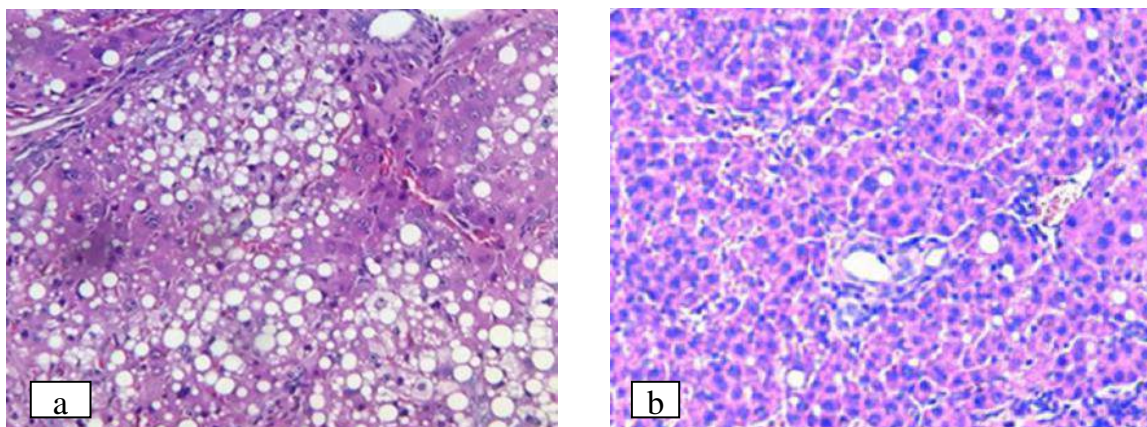
Do khả năng hồi phục tổn thương gan ở chuột khá tốt, các mô hình gây xơ gan trên chuột thường tiến hành trong thời gian dài, và phải kết hợp nhiều yếu tố gây tổn thương gan. Với việc chỉ tiêm dưới da hóa chất (CCl_4), kết hợp với chế độ ăn giàu chất béo hoặc không, thường chỉ tạo ra được mức độ xơ hóa ở gan, chưa có

sự đảo lộn cấu trúc tiểu thùy gan, mặc dù thời gian dùng khá dài (trên 12 tuần) [34]. Tác giả Li C. và cộng sự đã mô tả phương pháp gây xơ bằng cả CCl_4 , rượu và chế độ ăn, cho phép rút ngắn thời gian gây xơ gan xuống 8 tuần [26]. Tuy nhiên, tại labo dược lý thực nghiệm, Học Viện Quân Y, khi tiến hành theo phương pháp này, dải xơ ở gan thể hiện rõ, nhưng hình ảnh đảo lộn cấu trúc tiểu thùy gan chưa rõ.

Để đẩy mạnh quá trình tổn thương gan, nghiên cứu này được tiến hành dựa trên phương pháp của Li C. và cộng sự, cải tiến thêm bằng chế độ ăn bổ sung 20% mỡ rán cháy trong 8 giờ, sắt oxalate và 0,05% cholesterol. Việc lắng đọng mỡ và sắt ở gan có vai trò rất quan trọng làm tăng mạnh quá trình oxi hóa tại gan, gây tổn thương nặng nề, liên tục, không có khả năng hồi phục tại gan làm cho quá trình xơ hóa gan nhanh chóng diễn ra. Kết quả nghiên cứu mặc dù mới chỉ tiến hành với cỡ mẫu nhỏ (03 chuột ở mỗi lô) nhưng đã thấy rõ tổn thương tế bào gan, viêm gan (dựa trên các chỉ số sinh hóa máu AST, ALT), tổn thương viêm và xơ gan (cân nặng tương đối của gan tăng, hình ảnh đại thể và vi thể cho thấy sự xơ hóa gan và hình xơ gan). Tại tuần thứ 8 hình ảnh xơ gan với các dải xơ rõ rệt. Tại tuần thứ 10 hình ảnh xơ gan càng rõ hơn, các dải xơ chia cắt rõ các tiểu thùy gan.

Zhu K, Pang P và các cộng sự cũng đã triển khai mô hình xơ gan thực nghiệm trên chuột cống trắng có cân nặng 150g -160g, liều 0,33 ml CCl_4 / kg chuột được tiêm trong màng bụng hai lần một tuần. Xơ hóa gan (liver fibrosis) đã được chứng minh bằng phân tích mô học sau 10 tuần [70]. Hình ảnh vi thể (HE x 400) gan chuột tuần thứ 10 của nghiên cứu có dải xơ rõ rệt, xơ hóa trung tâm tiểu thùy và khoảng cửa tuy nhiên vẫn nhận rõ được cấu trúc tiểu thùy gan, mật độ tế bào gan thoái hóa mỡ thưa thớt. So với cấu trúc vi thể gan 10 tuần của nghiên cứu này, sự xâm lấn của mô liên kết và sự thoái hóa tế bào gan trong nghiên cứu của Zhu K ít hơn. Trong mô hình của chúng tôi, chuột cống cân nặng có mức tương đương (150g -200g) được dùng liều đầu 5ml/kg chuột, sau đó mỗi tuần tiêm 2 lần liều 1,2ml/kg chuột, lại kết hợp thêm chế độ ăn có chất béo và sắt, nước uống có rượu. Do chuột bị nhiễm độc với liều CCl_4 cao hơn, kết hợp sự ảnh hưởng của chất béo, sắt và rượu trên gan nên dù thời gian như nhau 10 tuần, hình ảnh vi thể của hai nghiên cứu vẫn

có sự khác nhau. Áp dụng phân độ giai đoạn xơ hóa gan tương ứng theo phân loại của Metavir [32][33][38][23], gan chuột trong nghiên cứu của Zhu K, Pang P và cộng sự thuộc giai đoạn xơ hóa F3 - xơ hóa bắt đầu, gan chuột trong nghiên cứu của chúng tôi thuộc giai đoạn xơ hóa F4 - xơ gan.



Hình 4.1. Hình ảnh vi thể gan chuột (HE x 400) tại thời điểm 10 tuần

a. Nghiên Cứu của chúng tôi, b. Nghiên Cứu của Zhu K, Pang P và các cộng sự [70]

Đây có thể xem là một bước tiến quan trọng trong việc triển khai mô hình gây xơ gan thực nghiệm trên chuột cống trắng bằng cách tiêm dưới da CCl_4 .

4.2. Nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CTHePaB trên mô hình động vật thực nghiệm (chuột cống trắng)

Quá trình xơ hóa gan bao gồm một số cơ chế và phản ứng sinh học độc lập, nhưng cũng phụ thuộc vào nguyên nhân gây bệnh gan. Cho đến nay, vẫn chưa có đủ liệu pháp sinh học hoặc hóa học được phê duyệt trực tiếp nhằm mục tiêu đảo ngược sự tiến triển của xơ hóa. Điều quan trọng là một khi xơ hóa gan được kích hoạt, cơ thể hình thành một mô hình kiểm soát tạo xơ rất phức tạp với việc kích hoạt tế bào hình sao làm cốt lõi, dẫn đến hiệu quả điều trị kém trong giai đoạn này. Y học cổ truyền có những ưu điểm độc đáo trong điều trị xơ gan vì sự khác biệt trong chẩn đoán hội chứng bệnh và điều trị toàn diện vào đa kênh, đa cấp và đa mục tiêu. Tuy nhiên, ưu điểm của y học cổ truyền hiếm khi được thảo luận theo hướng nghiên cứu khoa học hiện đại [48].

Các đề tài nghiên cứu công bố quốc tế cho thấy, nghiên cứu về xơ gan theo hướng y học cổ truyền chủ yếu được thực hiện ở Trung Quốc. Q.Zhang, P.Liu,

H.W.Zhang đã nghiên cứu trên 900 bệnh nhân xơ gan sau viêm gan virus và nhận thấy rằng đặc điểm chung nhất ở bệnh nhân bị xơ gan là Khí Hư và Huyết Ứ, có 5 loại hội chứng xuất hiện ở bệnh nhân xơ gan là Can Thận Hư, Thấp Nhiệt Tích Tụ, Nhiệt Huyết Ứ Tích Tụ, Can Khí Uất Tỳ Hư và Tỳ Thận Khí Hư [55]. Kết quả này gần tương ứng với cách chia thể bệnh Can Ngạnh Hóa trong giáo trình Bệnh học Nội khoa y học cổ truyền của Học viện Y Dược Học Cổ Truyền Việt Nam [3]. Trong một nghiên cứu khác, trên 223 bệnh nhân xơ gan sau viêm gan virus, Zhang Q nhận thấy Thấp Nhiệt là cơ sở bệnh lý của xơ gan sau viêm gan virus, bệnh nhân xơ gan xuất hiện 3 hội chứng chính: (1) Thấp Nhiệt, Huyết Ứ, Can Tỳ Khí Hư (60%); (2) Khí Âm Lưỡng Hư với Khí Hư nghiêm trọng, Thấp nghiêm trọng kèm Nhiệt (27,8%); (3) Huyết Ứ, Khí Âm Lưỡng Hư với Âm Hư nghiêm trọng, Thấp hoặc Nhiệt Uất (12,2%) [54]. Thành phần của CTHePaB có Cà Gai Leo, Chi tử, Cỏ Sữa Lá Nhỏ thông thấp nhiệt uất, giải nhiệt độc, Đại Hoàng hành huyết ứ; có Đông Trùng Hạ Thảo, Nấm Linh Chi, Hà Thủ Ô, Rễ Đinh Lăng có tác dụng bổ khí ích tinh, tư dưỡng can thận. Pháp trị chung của CTHePaB: Thanh nhiệt giải độc, lợi thấp thoái hoàng, bổ khí ích tinh, tư dưỡng can thận phù hợp với hội chứng Can Thận Hư, Thấp Nhiệt Tích Tụ, Can Uất Tỳ Hư, Tỳ Thận Khí Hư của kết luận nghiên cứu [55]; phù hợp với hội chứng Khí Âm Lưỡng Hư với Khí Hư nghiêm trọng, Thấp nghiêm trọng kèm Nhiệt của kết luận nghiên cứu [54]. Theo tác giả bài thuốc có tác dụng hoạt huyết không mạnh vì trong thành phần bài thuốc chỉ có vị Đại Hoàng là vị thuốc hành huyết hóa ứ [7] nhưng lượng không nhiều (2,5g) nên không phù hợp để điều trị 2 hội chứng có kèm triệu chứng Huyết Ứ theo nghiên cứu [54] và 1 hội chứng có kèm triệu chứng Huyết Ứ theo nghiên cứu [55].

Sự thay đổi dấu ấn sinh học trong máu và nước tiểu cũng đang được nghiên cứu, để tìm ra sự liên kết của rối loạn chuyển hóa tế bào với các hội chứng Y Học Cổ Truyền. Zhang Q thấy rằng trong xơ gan thể Can Tỳ Khí Hư có AST, ALT, GGT tăng cao rõ rệt so với 2 loại còn lại, Thể Âm Hư nghiêm trọng chất lượng máu kém với fibronectin, albumin, yếu tố V, yếu tố VII, tiểu cầu, procalcitonin bị suy giảm nghiêm trọng [54]. Xiaoning Wang cùng cộng sự đã phân tích nước tiểu của

bệnh nhân xơ gan sau viêm gan B mắc 2 hội chứng Can Thận Âm Hư và Thấp Nhiệt Nội Uẩn. Kết quả cho thấy: Ba chất chuyển hóa: aconit, citrate và 2-pentendioate, chỉ thay đổi đáng kể trong Hội chứng Can Thận Âm Hư, đại diện cho sự chuyển hóa năng lượng bất thường. Ngược lại, hippurat và 4-pyridinecarboxylate chỉ thay đổi đáng kể ở Hội chứng Thấp Nhiệt Nội Uẩn, đại diện cho những bất thường của chuyển hóa hệ vi sinh vật ruột. Hơn nữa, trong số tất cả các chất chuyển hóa khác nhau, có sự khác biệt đáng kể giữa hai hội chứng trong ba chất chuyển hóa nước tiểu, glyoursodeoxycholate, cortolone-3-glucuronide và L-aspartyl-4-phosphate. Sự thay đổi các chất trong nước tiểu tạo thành một nhóm bằng chứng sinh học đáng tin cậy cho sự khác biệt hội chứng Trung Y ở bệnh nhân xơ gan sau viêm gan B và có tiềm năng sử dụng các dấu ấn sinh học cho phân loại hội chứng Trung Y [68]. Những nghiên cứu này chỉ ra rằng tứ chẩn rồi quy nạp hội chứng Y Học Cổ Truyền trong chẩn đoán Xơ gan là minh bạch có căn cứ khoa học. Tuy nhiên, đề tài nghiên cứu về chủ đề này còn nghèo nàn. Những khác biệt cận lâm sàng trong các hội chứng Y Học Cổ Truyền cần được nghiên cứu sâu hơn để chẩn đoán xơ gan theo Y Học Cổ Truyền thêm chính xác và dễ áp dụng. Căn cứ vào đó, việc chỉ định phương thang Y Học Cổ Truyền (ví dụ như CTHepaB) cho từng hội chứng bệnh ở người xơ gan cũng rõ ràng và chính xác hơn.

Trong các nghiên cứu sâu về vai trò dược lý và cơ chế tác động của những phương thang Y Học Cổ Truyền điều trị xơ gan được công bố quốc tế. Ở một mức độ nào đó, các cổ phương hoặc tân phương bao gồm Nhân Trần Cao Thang, Hạ Ú Huyết Thang, Tiểu Sài Hồ Thang, Nhất Quán Tiễn Thang, Hoàng Kỳ Thang, Đại Hoàng Giá Trùng Hoàn, Phù Chính Hóa Ú Phương, Viên Phục Phương Miết Giáp Nhuyễn Can, Viên An Lạc Hóa Xơ và Hợp Chất 861 được công nhận có tác dụng chống xơ gan cả trên bệnh nhân bị xơ gan và mô hình động vật bị xơ gan [48]. Phần lớn các phương thang này thành phần có Đại Hoàng (Nhân Trần Cao Thang, Hạ Ú Huyết Thang, Đại Hoàng Giá Trùng Hoàn, An Lạc Hóa Xơ), cho thấy độ ứng dụng cao của vị thuốc này trong các phương thang Y Học Cổ Truyền điều trị xơ gan. Jin H và cộng sự nghiên cứu: xem liệu thuốc thảo dược Đại Hoàng (*Rhei rhizome*),

chiết xuất bột từ thảo dược, có ảnh hưởng đến sự phát triển của bệnh xơ gan hay không? Các nghiên cứu in vivo, chỉ ra rằng thuốc làm giảm đáng kể tình trạng xơ hóa gan bằng cách ức chế trực tiếp hoạt hóa tế bào hình sao mà không làm giảm sự chết của tế bào gan [42]. Còn theo Y Học Cổ Truyền, Can Ngạnh Hóa làm chức năng của can tỳ bị rối loạn gây thấp nhiệt độc uất, con đường vận hóa thủy thấp đình trệ [3], Đại Hoàng có tác dụng tả hạ công tích, thanh nhiệt hóa thấp lại còn có thể hoạt huyết hóa ứ, tống cũ sinh mới [7] giúp cho con đường vận hóa thủy dịch được thông lợi, mở con đường dẫn thấp nhiệt ra ngoài. Có lẽ đây là nguyên nhân làm vị thuốc này có độ ứng dụng cao. CTHepaB cũng ứng dụng vị Đại Hoàng với vai trò là Sứ dược, thông qua con đường đại tiện đưa thấp nhiệt độc ra khỏi cơ thể. Đại Hoàng góp phần giúp CTHepaB điều trị xơ gan hiệu quả.

Không chỉ Đại Hoàng, một số vị thuốc khác trong thành phần viên nang CTHepaB cũng được có tác dụng chống xơ hóa, ức chế xơ gan. Như Nguyễn Thị Minh Khai và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng chống viêm gan và ức chế xơ gan của Cà Gai Leo, và đưa đến kết luận : Cà Gai Leo có tác dụng trên men collagenase, làm giảm hàm lượng collagen gan trên mô hình xơ gan thực nghiệm (27.6%) [16]. Wang GJ và cộng sự nghiên cứu các tác dụng của chiết xuất giàu triterpenoid của Nấm Linh Chi (*G. lucidum*) trong chống tăng sinh một dòng tế bào hình sao của chuột (dòng T6) được kích thích với yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu BB. Trên in vivo, *G. lucidum* ức chế sự tăng sinh tế bào hình sao được kích hoạt yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu BB thông qua việc ngăn chặn sự phosphoryl hóa PDGFbetaR, do đó cho thấy hiệu quả của nó trong việc ngăn ngừa và điều trị xơ hóa gan [63]. J X Nan và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng chống xơ hóa của Đông Trùng Hạ Thảo loài *Cordyceps militaris* và bằng cách cấy lỏng sợi nấm *Cordyceps militaris* rồi chiết xuất thành sản phẩm chiết nước nóng, các polymer sinh học nội bào, các polyme sinh học ngoại bào. Cho chuột bị thắt và cắt ống mật 4 tuần với biểu hiện xơ hóa gan uống sản phẩm chiết, chỉ có nhóm chuột sử dụng sản phẩm polyme sinh học ngoại bào giảm hàm lượng hydroxyprolin gan và α -SMA. Chứng tỏ chỉ có polyme sinh học ngoại bào trong *Cordyceps militaris* có tác dụng chống

xơ hóa [40]. Ping Yi Hung and Chun-Lin Lee (2017) đã nghiên cứu “Hiệu quả chống xơ gan cao hơn của Đông Trùng Hạ Thảo loài *Cordyceps militaris* - Sản phẩm lên men được nuôi cấy với nước biển sâu thông qua việc ức chế các yếu tố tiền viêm và các biểu hiện liên quan đến xơ hóa. Nhóm đã nuôi nấm trong môi trường nước biển sâu, nước siêu tinh khiết, nước tổng hợp rồi cho chuột bị xơ gan do TAA dùng. Và nhận thấy, các các nhóm được dùng *Cordyceps militaris* đều có giảm chỉ số hủy hoại tế bào gan và hình ảnh vi thể gan ít dải sợi xơ hơn nhóm được không được dùng. Đặc biệt nhóm nuôi bằng nước biển sâu thể hiện rõ nhất sự ức chế xơ gan. Chỉ nhóm này có TGF- β (chất kích hoạt tế bào hình sao thành nguyên bào sợi) giảm có ý nghĩa thống kê [53]. Các bằng chứng trên cùng kinh nghiệm trên lâm sàng của Phó Giáo Sư Đậu Xuân Cảnh cho thấy tính khả thi khi thực hiện đề tài nghiên cứu về tác dụng “điều trị” xơ gan của CT_{HepaB} trên mô hình động vật thực nghiệm .

Theo các tài liệu mới nhất, xơ gan với những nốt tân tạo kèm tăng áp lực tĩnh mạch cửa và suy chức năng gan sớm được cho là không thể thoái lui. Tuy nhiên những sang thương xơ hóa (fibrosis) ít nghiêm trọng hơn có thể đảo ngược một cách đáng kể khi kiểm soát nguyên nhân gây tổn thương gan và điều trị một số phương pháp khác [24]. Do đó trong mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng bằng CCl₄, cần phân biệt rõ mục tiêu “điều trị” xơ gan (gan đã xơ) khác mục tiêu “phòng ngừa” xơ gan (gan chưa xơ). Với mục tiêu khác nhau, các mô hình được dựng sẽ khác nhau về cách chia nhóm, thời gian tiêm và thời điểm bắt đầu dùng thuốc như :

- Trên mô hình dùng để đánh giá hiệu quả của thuốc trong “phòng ngừa” sự xơ hóa gan, chuột được dùng CCl₄ kết hợp uống thuốc ngay từ đầu. Li CX và các cộng sự đã cho chuột Wistar đực uống CCl₄ (1,2 ml/kg, 2 lần/tuần), chế độ ăn 20% chất béo và 30% cồn trong nước uống (mỗi ngày) trong 6 tuần. Đồng thời, chuột được dùng Hán Đan Can Lạc kèm, uống hàng ngày trong 6 tuần [45]. Còn ThS. Trần Thu Hường và cộng sự đã cho chuột cho uống bột Molongosit và

NHODONGANA trong 16 tuần, và không phát hiện dấu hiệu xơ hóa khi vừa uống hoạt chất bảo vệ, vừa gây xơ hóa gan thực nghiệm bằng CCl_4 [27].

- Trên mô hình vừa dùng để đánh giá hiệu quả “phòng ngừa” xơ gan, vừa đánh giá hiệu quả “điều trị” xơ gan của thuốc, tất cả chuột được tiêm CCl_4 nhưng chỉ có một nhóm nhỏ kết hợp uống thuốc ngay từ đầu, còn lại được uống sau khi gan đã hình thành xơ hóa. Như Chen H và cộng sự đã chia 40 con chuột Wistar thành 5 nhóm: nhóm bình thường, 2 nhóm phòng ngừa (nhóm thử nghiệm phòng ngừa, nhóm đối chứng phòng ngừa) và 2 nhóm điều trị (nhóm thử nghiệm điều trị, nhóm đối chứng điều trị). Những con chuột trong nhóm bình thường được tiêm dầu ô liu dưới da và uống nước, những con chuột trong nhóm còn lại được tiêm CCl_4 dưới da và uống rượu để thiết lập mô hình xơ hóa gan. Nhóm thử nghiệm phòng ngừa và nhóm đối chứng tương ứng được điều trị bằng thuốc thô Phù Chính Hóa Ú 1 lần/1 ngày /4 tuần trong quá trình xây dựng mô hình xơ hóa. Nhóm thử nghiệm điều trị và nhóm đối chứng tương ứng được điều trị bằng thuốc thô Phù Chính Hóa Ú 1 lần/1 ngày/4 tuần sau khi dừng quá trình xây dựng mô hình xơ hóa [31]. K.F. Cheunga và cộng sự lại chia 34 con chuột Sprague Dawley trưởng thành thành năm nhóm: nhóm 1 đánh giá phòng ngừa khi gan chưa bị tổn thương nên chuột được dùng CCl_4 và phương thang 319 đồng thời trong 8 tuần; nhóm 2 đánh giá điều trị trên gan đã xơ hóa- nên chuột được dùng CCl_4 trong 8 tuần nhưng phương thang 319 chỉ được dùng trong 4 tuần cuối, nhóm 3 là nhóm chứng gây xơ nên chuột chỉ dùng CCl_4 trong 8 tuần; nhóm 4 là nhóm chứng chỉ dùng thuốc – chuột chỉ dùng phương thang 319 trong 8 tuần; nhóm 5 là nhóm chứng không gây xơ [44].

Trong mô hình dùng để đánh giá tác dụng “điều trị” xơ gan của thuốc, tất cả các con chuột trong nhóm nghiên cứu được dùng thuốc sau khi gan đã xuất hiện xơ hóa. Với mục tiêu này, cần phải mất khá nhiều thời gian để gây dựng mô hình có gan bị xơ (cirrhosis) rõ rệt. Như Tao Q và cộng sự đã chia Chuột Wistar ngẫu nhiên thành 5 nhóm: nhóm chuột thường, nhóm chuột đối chứng xơ và ba nhóm dùng thuốc. Tất cả những con chuột, ngoại trừ nhóm chuột thường, đã được đưa vào mô hình tổn thương gan mạn tính bằng cách tiêm CCl_4 dưới da trong 12 tuần. Ba nhóm

điều trị bắt đầu dùng thuốc từ tuần thứ 9, với thuốc uống là Nhất Quán Tiễn, Lục Vị Địa Hoàng và Nhân Trần Cao Thang tương ứng, trong 4 tuần cuối [61]. Còn Du JX đã gây xơ gan bằng cách tiêm trong dung dịch 50% CCl_4 trộn dầu oliu với liều 1 ml / kg trọng lượng cơ thể, 2 lần/ tuần trong 9 tuần liên tiếp. Sau khi tiêm 3 và 6 tuần, 6 con chuột trong nhóm bình thường và 6 con chuột trong nhóm gây xơ bị giết ngẫu nhiên để quan sát sự thay đổi của gan chuột. Những con chuột sống sót của nhóm gây xơ được chia ngẫu nhiên thành nhóm đối chứng xơ ($n = 15$) và nhóm dùng Hạ Ú huyết Thang ($n = 11$). Sáu con chuột bình thường được đưa vào nhóm đối chứng sinh học. Chuột được uống Hạ Ú huyết Thang bắt đầu từ tuần thứ 7, tức trong 3 tuần cuối [43]. Nhìn chung, khi sử dụng CCl_4 , xơ hóa (fibrosis) thường phát triển rõ rệt sau 2-4 tuần phơi nhiễm, xơ hóa bắt đầu nghiêm trọng sau 5-7 tuần và xơ gan (cirrhosis) thường xuất hiện sau 8-10 tuần phơi nhiễm. Xơ gan nốt nhỏ, tăng áp lực tĩnh mạch cửa, cổ trướng thường xuất hiện sau 10-20 tuần. Tuy nhiên, thời gian hình thành xơ hóa và tiến triển thành xơ gan khác nhau còn tùy thuộc vào liều lượng, đường dùng và động vật thí nghiệm [11]. Do đó chúng tôi đã triển khai mục tiêu một để xác định chính xác thời điểm gan xơ rõ.

Trong mô hình đánh giá tác dụng “điều trị” xơ gan của CT_{HepaB}, dựa vào kết quả mục tiêu một, thời điểm quyết định cho chuột uống thuốc là tuần thứ 8. Lúc đó đại thể gan chuột có bề mặt nhạt màu, xù xì, mật độ gan cứng chắc có những nốt tân tạo đường kính nhỏ hơn 1mm, vi thể gan đã xuất hiện dải xơ mỏng rõ rệt, tế bào gan thoái hóa mỡ, bè Remak phân tán. Sau tuần thứ 8 chuột vẫn tiếp tục tiêm CCl_4 thêm 2 tuần nữa để ngăn sự phục hồi của gan chuột do gan chuột có đặc điểm phục hồi sau khi dùng CCl_4 [34]. Như vậy CT_{HepaB} được dùng tại thời điểm gan đã xơ rõ. Không chỉ vậy với mức phá hủy tế bào gan mạnh mẽ. Đến tuần thứ 10, trong lô chứng gây xơ, đại thể gan chuột teo nhỏ, cứng chắc, nốt tân tạo nhiều hơn ở tuần thứ 8, to nhỏ không đều nhau còn vi thể đã thấy rõ các dải xơ dày chia cắt cấu trúc tiểu thùy gan, xuất hiện các tiểu thùy giả. Hàm lượng hydroxyprolin trong lô chứng gây xơ 10 tuần ($281,68 \pm 45,36$) cao hơn 48,25% so với lô chứng gây xơ 4 tuần trong nghiên cứu của Santh Rani Thakur và cs (2007) ($135,91 \pm 0,710$) [58].

Mô hình chuột có gan xơ nhìn rõ trên đại thể và vi thể như vậy là một thành công, góp phần đánh giá đúng tác dụng của CTHepaB trong điều trị xơ gan.

Theo kết quả thu được, viên nang CTHepaB đã cải thiện rõ rệt tình trạng tổn thương tế bào gan và tình trạng xơ gan ở cả trên hình thể gan và các chỉ số hóa sinh trên chuột gây xơ gan.

* Thời gian prothrombin chủ yếu biểu hiện hoạt tính đông máu của các yếu tố tham gia trong con đường đông máu ngoại sinh và con đường đông máu chung (yếu tố II, V, VII, X, fibrinogen...). Gan là nơi tổng hợp tất cả những yếu tố đông máu trừ yếu tố VIII. Sự suy giảm chức năng gan, các tế bào bị hoại tử, thoái hóa mỡ làm cho thời gian prothrombin kéo dài. Tình trạng viêm và xơ gan đã làm tăng cân nặng của gan. Sự suy giảm chức năng gan làm cho nồng độ albumin huyết tương giảm. Và CTHepaB giúp một số chỉ số được cải thiện về tương đương so với lô chứng sinh học là hàm lượng albumin huyết tương ($32,01 \pm 1,81$ so với $31,53 \pm 2,04$), thời gian prothrombin ($7,77 \pm 0,76$ so với $8,13 \pm 0,79$) và cân nặng của gan ($2,53 \pm 0,29$ so với $2,64 \pm 0,32$).

* Một số chỉ số khác chưa hồi phục về mức tương đương so với lô chứng sinh học, gồm hoạt độ AST, ALT trong máu và hàm lượng hydroxyprolin trong gan, tuy nhiên mức độ cải thiện so với lô chứng gây xơ là đáng kể ($p < 0,01$). Hydroxyproline là một trong những axit amin có nhiều nhất có trong collagen sau quá trình hydroxyl hóa chất proline. Sự hiện diện của hydroxyproline trong ECM được sản xuất bởi các tế bào hình sao giúp bảo tồn tính toàn vẹn và chức năng của các tế bào gan. Mức độ của nó trong các mô gan, huyết thanh và nước tiểu vượt trội có thể biểu thị chính xác tốc độ và tiến triển của bệnh xơ gan [60]. Mức hydroxyprolin giảm (39,40 % ; 44,59 %) cho thấy CTHepaB không chỉ có tác động chống viêm gan mà còn có tác dụng làm giảm tình trạng xơ hóa ở gan đã bị xơ rõ.

* Hình ảnh mô bệnh học cũng cho thấy tình trạng tổn thương tế bào gan và xơ gan được cải thiện rõ so với lô chứng gây xơ. Đặc biệt lô (e) uống CTHepaB 1,12 g/kg/24 giờ, chuột có gan ít bạc màu, mật độ mềm, bề mặt có các nốt tân tạo

nhưng nhạy mẫn nhất trong 4 lô bị tiêm CCl_4 . Điều đó chứng tỏ, CTHepaB liều cao có cải thiện hình thái của gan đã xơ rõ rệt.

* Tác dụng của CTHepaB tăng theo mức liều. Ở liều cao (1,12 g/kg/24 giờ), tác dụng làm giảm hoạt độ các enzym AST, ALT và hàm lượng hydroxyprolin nhiều hơn có ý nghĩa thống kê so với ở liều thấp (0,56 g/kg/24 giờ). Nghiên cứu sử dụng Silymarin làm thuốc tham chiếu. Silymarrin là một hoạt chất chiết xuất từ cây kế sữa (Milk Thistle), đã được chứng minh có tác dụng trong điều trị viêm, xơ gan [36]. Ở liều 70 mg/kg/24 giờ, silymarin có tác dụng làm giảm hoạt độ các enzym AST, ALT và hàm lượng hydroxyprolin tương đương với dịch chiết CTHepaB liều 0,56 g/kg/24 giờ ($p > 0,05$), có xu hướng kém hơn so với dịch chiết CTHepaB liều 1,12 g/kg/24 giờ ($0,05 < p < 0,1$). Tác dụng mạnh yếu có lẽ do liều lượng dùng, và cần được khảo sát đánh giá thêm.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu trên thực nghiệm chúng tôi kết luận:

1. Nghiên cứu triển khai mô hình gây xơ gan trên chuột cống trắng bằng CCl₄

Đã triển khai thành công mô hình thực nghiệm gây xơ gan trên chuột cống trắng bằng CCl₄, ethanol, chế độ ăn giàu chất béo và sắt oxalate, cụ thể:

- Các chuột gây xơ gan có biểu hiện xù lông, rụng lông, mệt mỏi giảm hoạt động, gầy so với các chuột không gây xơ gan.

- Hoạt độ enzym AST và ALT của gan chuột đều tăng cao rõ rệt.

- Gan chuột có bề mặt nhạt màu, xù xì, mật độ gan cứng chắc hơn so với gan chuột ở lô chứng.

- Hình ảnh xơ hoá gan rõ, có nhiều các tế bào gan thoái hoá mỡ. Hình ảnh xơ gan với các dải xơ chia cắt rõ bắt đầu từ tuần thứ 8. Sau 10 tuần, hình ảnh dải xơ chia cắt tiểu thùy gan rõ rệt.

2. Nghiên cứu tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CT_{HepaB} trên mô hình động vật thực nghiệm (chuột cống trắng)

Viên nang CT_{HepaB} liều 0,56 g/kg/24h và 1,12 g/kg/24h có hiệu quả điều trị xơ gan khi đánh giá trên mô hình gây xơ gan ở chuột cống trắng bằng CCl₄, ethanol, chế độ ăn giàu chất béo và sắt oxalate. Cụ thể:

- Cải thiện thể trạng của chuột xơ gan, giảm các biểu hiện xù lông, rụng lông, mệt mỏi, hạn chế giảm cân nặng so với lô mô hình gây xơ gan không điều trị ($p < 0,05$).

- Giảm viêm gan, tổn thương tế bào gan thông qua làm giảm hoạt độ enzym AST, ALT trong máu, giảm trọng lượng gan so với lô mô hình ($p < 0,01$).

- Giảm xơ gan thông qua làm giảm hàm lượng hydroxyprolin trong gan ($p < 0,05$), cải thiện hình ảnh đại thể và vi thể gan xơ (tiêu bản gan chuột nhuộm HE và nhuộm Masson) so với lô mô hình.

- Cải thiện chức năng của gan xơ thông qua làm tăng albumin huyết tương, giảm thời gian prothrombin so với lô mô hình ($p < 0,05$).

Các tác dụng này của viên nang CT_{HepaB} có xu hướng tăng theo mức liều, và tương đương với khi dùng silymarin liều 70 mg/kg.

KHUYẾN NGHỊ

Viên nang CTHePaB đã thể hiện tác dụng tốt trên mô hình gây xơ gan ở chuột cống trắng, là những cơ sở ban đầu cho các nghiên cứu sâu hơn và phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị xơ gan. Do đó, chúng tôi kiến nghị:

- Đánh giá sâu hơn về tác dụng và cơ chế tác dụng của viên nang CTHePaB trong điều trị xơ gan trên các mô hình thực nghiệm.

- Đánh giá tính an toàn và tác dụng điều trị xơ gan của viên nang CTHePaB trên lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hữu Thuận Anh (2016). *Nghiên cứu ảnh hưởng của một số elicitor lên khả năng tích lũy solasodine ở tế bào in vitro của cây cà gai leo (solanum hainanense hance)*, luận án tiến sĩ sinh lý học thực vật, Đại học Huế Trường Đại Học Y Dược.
2. Nguyễn Quốc Anh, Ngô Quý Châu chủ biên (2011). *Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh nội khoa – Cẩm nang nghiệp vụ của bác sĩ lâm sàng*, Bệnh viện Bạch Mai - Nhà xuất bản Y Học, 494-498.
3. Bộ môn nội Y học cổ truyền Học Viện Y Dược Học Cổ Truyền (2015). *Bài giảng bệnh học nội khoa y học cổ truyền*, Học Viện Y Dược Học Cổ Truyền Việt Nam, 101-105.
4. Bộ môn Nội đại học Y Hà Nội (2009). *Bệnh học nội khoa*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 138- 146.
5. Bộ Y Tế (2013). *Giải phẫu bệnh học*, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam, 362-365.
6. Bộ Y Tế (2016). *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành giải phẫu - tế bào học*, Nhà xuất bản Y Học, 245-247, 262-264.
7. Hoàng Bảo Châu, Nguyễn Đức Đoàn (2007). *Danh từ thuật ngữ Y-Dược học cổ truyền*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
8. Đỗ Trung Đàm (2001). Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. *Tạp chí dược học*, 2, 7-9.
9. Trần Hồng Diễm (2010). *Xây dựng mô hình và thử nghiệm điều trị bệnh xơ hóa gan bằng liệu pháp tế bào gốc trên chuột nhắt trắng (Mus musculus var. Albino)*, Luận văn Thạc sĩ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên- Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
10. Nguyễn Thượng Dong và cộng sự (2005). *Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và ức chế xơ gan của thuốc cugama - đề tài nhánh KC10.07.04*, Viện dược liệu, Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học và công nghệ 2001 – 2005, 65-66.
11. Tào Thị Giang (2017). *Triển khai mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng carbon tetrachlorid đường uống và áp dụng đánh giá tác dụng của chế phẩm Vượng Can*, Luận án tốt nghiệp dược sĩ, Đại học Dược Hà Nội.

12. Trịnh Thị Xuân Hòa (1999). *Một số đặc điểm lâm sàng, siêu cấu trúc gan và hiệu quả bước đầu điều trị bệnh nhân viêm gan virus B mạn hoạt động bằng thuốc Haina*, Luận án tiến sĩ, Học Viện Quân Y.
13. Trịnh Thị Xuân Hoà; Nguyễn Văn Mùi và CS (2004). Thay đổi các marker virus viêm gan B ở bệnh nhân viêm gan B mạn hoạt động được điều trị bằng các thuốc haina, diacharin. *Tạp chí y dược học quân sự - Học viện Quân y*, Tập 30 ĐS/2005, 115-12.
14. Nguyễn Thị Minh Hồng, Nguyễn Nhược Kim (2015). Đánh giá tác dụng của viên XG1 điều trị xơ gan do rượu giai đoạn Child – Pugh B. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 94(2), tr 110-118.
15. Trần Văn Huy, Lê Viết Nho (2010). Đánh giá hiệu quả điều trị entecavir trên các bệnh nhân viêm gan B mạn HBeAg(+). *Tạp chí Khoa học Tiêu Hóa Việt Nam*, V(18), 1221- 1227.
16. Nguyễn Thị Minh Khai (2002). *Nghiên cứu cây cà gai leo (Solanum procumbens Lour, Solanaceae) làm thuốc chống viêm gan và ức chế xơ gan*, Luận Án Tiến Sĩ Dược Học, Viện Dược Liệu.
17. Đỗ Tất Lợi (2006). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Thời Đại.
18. Trần Bảo Nghi (2016). *Nghiên Cứu Xơ Hóa Gan Ở Bệnh Nhân Bệnh Gan Mạn Bằng Đo Đàn Hồi Gan Thoáng Qua Đối Chiếu Với Mô Bệnh Học*, Luận Án Tiến Sĩ Y Học, Đại Học Huế Trường Đại Học Y Dược.
19. Đặng Thị Kim Oanh (2007). Nhận xét sự thay đổi của sắt và Ferritin huyết thanh ở bệnh nhân xơ gan. *Tạp chí Khoa học tiêu hóa Việt Nam*, tập II, số 5, tr 291 – 295.
20. Nguyễn Xuân Phùng (2018). *Nghiên cứu đánh giá tác dụng của bài thuốc VG1 trong điều trị viêm gan B mạn tính*, đề tài nghiên cứu cấp cơ sở, Bệnh viện y học cổ truyền Hải Phòng.
21. Hoàng Trọng Thăng (2006). Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, sự biến đổi men transaminase và gamma glutamyl transpeptidase ở bệnh gan do rượu. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 160-167 .

22. Hoàng Trọng Thăng (2009). Mức độ và giai đoạn tổn thương mô bệnh học gan ở bệnh viêm gan mạn. *Tạp chí khoa học Tiêu Hóa Việt Nam*, IV(16), 1086-1089.
23. Trần Thị Khánh Tường (2015). *Nghiên Cứu Giá Trị Chẩn Đoán Xơ Hóa Gan Bằng Phối Hợp Kỹ Thuật Arfi Với Apri Ở Các Bệnh Nhân Viêm Gan Mạn*, Luận Án Tiến Sĩ Y Học, Đại Học Huế Trường Đại Học Y Dược.
24. Trịnh Thị Khánh Tường (2019). *Đánh giá xơ hóa gan từ lý thuyết đến thực hành*, Nhà xuất bản Y Học, 163-187.
25. Nguyễn Thị Thúy Vân (2017). *Gánh nặng viêm gan B, C ở Việt Nam và ứng phó của quốc gia*, Tổ chức Y tế Thế giới tại Việt Nam.
26. Viện Dược Liệu (2006). *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*, Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật, 183-184.
27. Viện hóa học các hợp chất thiên nhiên cùng phối hợp ThS. Trần Thu Hương (2016). *Nghiên cứu chiết xuất hoạt chất và bào chế thuốc điều trị viêm gan virus từ rễ cây Nhỏ đông*, Cục Thông tin KH&CN quốc gia, mã số 12981/2016.
28. World Health Organization (2017). *Cần quyết tâm để loại trừ viêm gan vi rút tại Việt Nam*.

B. TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU NƯỚC NGOÀI

29. Benita L. McVicker¹, and Robert G. Bennett (2017). Novel Anti-fibrotic Therapies. *Frontiers in Pharmacology journal*, vol 8 (318).
30. Cheng ML, Lu T, Yao YM, Geng XX (2006). Danshao huaxian capsule in treatment of decompensated cirrhosis resulting from chronic hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 5(1):48-51.
31. Chen H, Yang BW et al (2016). Prevention and Therapeutic Effects of Fuzheng Huayu Capsule on Liver Fibrosis and Expression of Connective Tissue Growth Factor in Rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 47(2):197-202.
32. Crespo Yanguas S, Cogliati B et al. (2016). Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol*, 90(5), 1025-1048.
33. Chen Jie Li, Zhi Hui Yang, et al (2017). Effects of aspirin and enoxaparin in a rat model of liver fibrosis. *World J Gastroenterol*. 23(35): 6412-6419.

34. Delire B, Stärkel P et al. (2015). Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol*, 3(1), 53-66.
35. European Association for the Study of the Liver (2018). *EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis*. *J Hepatol*, 69, 406-460.
36. Féher J, Lengyel G (2012). Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Curr Pharm Biotechnol*;13(1):210-7.
37. Gong HY, Wang KQ, Tang SG (2000). Effects of cordyceps sinensis on T lymphocyte subsets and hepatofibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Hunan Yike Daxue Xuebao*, 25:248-50.
38. Genwen Hu, Wen Liang, et al (2018). Staging of rat liver fibrosis using monoexponential, stretched exponential and diffusion kurtosis models with diffusion weighted imaging- magnetic resonance. *Oncotarget*, Vol. 9, (No. 2), 2357-2366.
39. Han J, Gu YJ, Zhongguo Zhen Jiu (2009). Observation on therapeutic effect of acupuncture combined with Chinese herbal decoction on compensated liver cirrhosis. *Zhongguo Zhen Jiu*, 29(12):970-2.
40. Janet Hoff, LVT, RLATG (2000). Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal* 29(10):47-53.
41. Ji-Xing Nan, Eun-Jeon Park, et al (2001). Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver Fibrosis induced by Bile duct ligation and scission in rats. *Archives of Pharmacal Research*, volume 24, Article number: 327 (2001).
42. Jin H, Sakaida I, Tsuchiya M, Okita K (2005). Herbal medicine Rhei rhizome prevents liver fibrosis in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Life Sci* ;76(24):2805-16.
43. Jin-Xing Du (2011). Chinese herbal medicine Xiayuxue Decoction inhibits liver angiogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Journal of Chinese Integrative Medicine* , 9(8):878-87. .

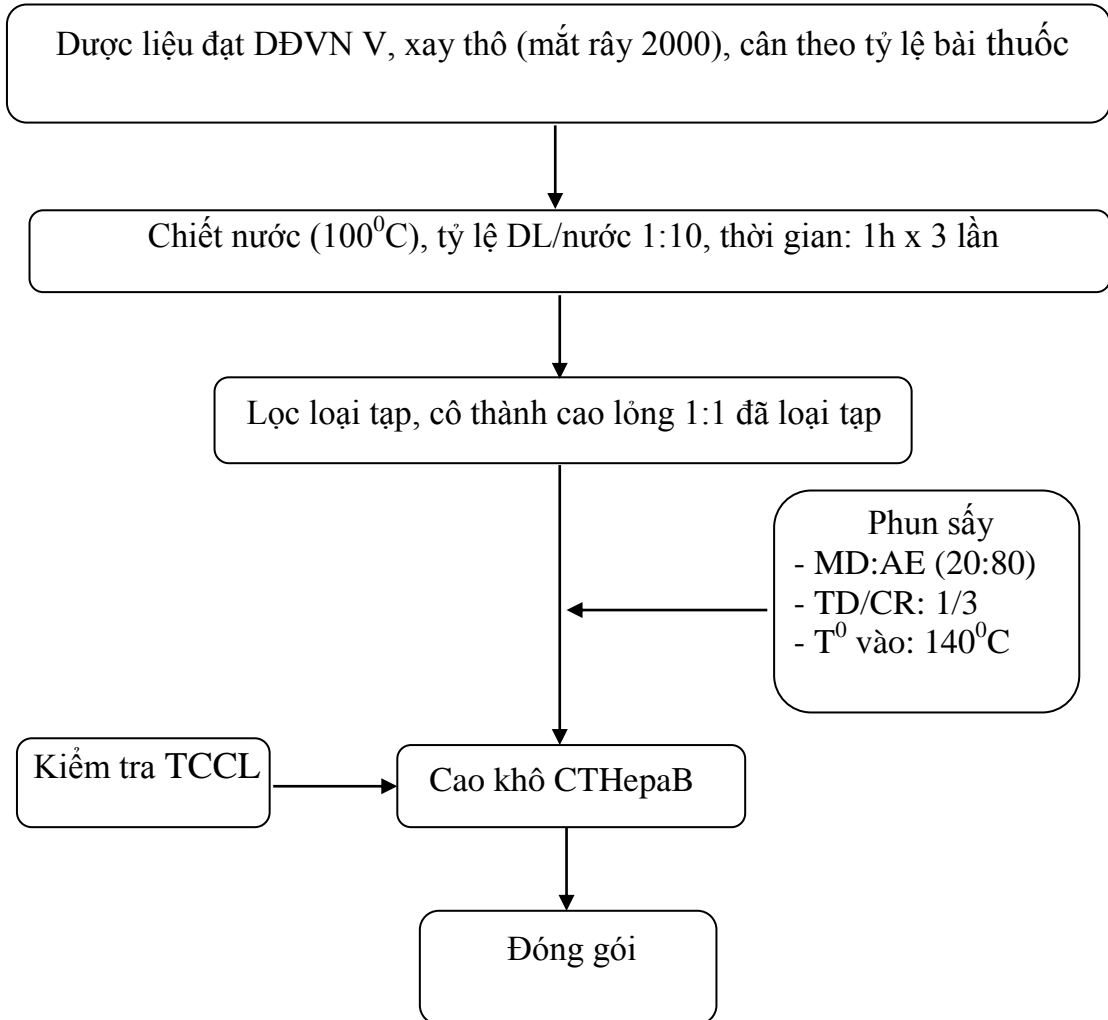
44. K.F. Cheunga, D.W. Yea, Z.F. Yangb, L.Lua, C.H. Liuc, X.L.Wangc, R.T.P. Poonb, Y.Tongd, P. Liuc, Y.C. Chena, George K.K. Laua (2009). Therapeutic efficacy of Traditional Chinese Medicine 319 recipe on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *J Ethnopharmacol* ;124(1):142-50.
45. Li CX, Li L, Lou J, Yang WX, Lei TW, Li YH, Liu J, Cheng ML, Huang LH (1998). The protective effects of traditional Chinese medicine prescription, han-dan-gan-le, on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Am J Chin Med*, 26(3-4):325-32.
46. Li Li, Zong qiang Hu, et al (2012). Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stages in Rats. *Gastroenterol Res Pract*. 2012:560345.
47. Lindsey C. Shipley, Page D. Axley, Ashwani K. Singal (2019). Liver Fibrosis: A Clinical Update. *EMJ Hepatol*, 7[1]:105-117.
48. Li H (2019). Advances in anti hepatic fibrotic therapy with Traditional Chinese Medicine herbal formula. *J Ethnopharmacol*, 251:112442.
49. Nawar E.A, Azza M., Hassanin B (2011). Clinical value of transforming growth factor beta as a marker of Fibrosis in adolescents with Chronic Liver Diseases. *Journal of American Science*, 7(3), 464-472.
50. Naru Kang, Hyun-Hee Lee¹, et al (2017). Development of High Cordycepin-Producing Cordyceps militaris Strains. *Mycobiology 2017*, 45(1): 31-38.
51. Machi Atarashi, Takeshi Izawa, et al (2018), Dietary Iron Supplementation Alters Hepatic Inflammation in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*, 10, 175.
52. Pellicoro A, Ramachandran P et al. (2012). Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5(Suppl 1), S26.
53. Ping Yi Hung and Chun-Lin Lee (2017), Higher Anti-Liver Fibrosis Effect of Cordyceps militaris-Fermented Product Cultured with Deep Ocean Water via Inhibiting Proinflammatory Factors and Fibrosis-Related Factors Expressions. *Mar. Drugs 2017*, 15, 168.
54. Qin Zhang, Liu P, Cheng HF, Chen L, Cao SH, Liu Y, Wei JJ, Fang ZH, Wu DZ (2003). Clinical investigation on characteristics of traditional Chinese medical syndrome of hepatocirrhosis. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 1(2):108-12.

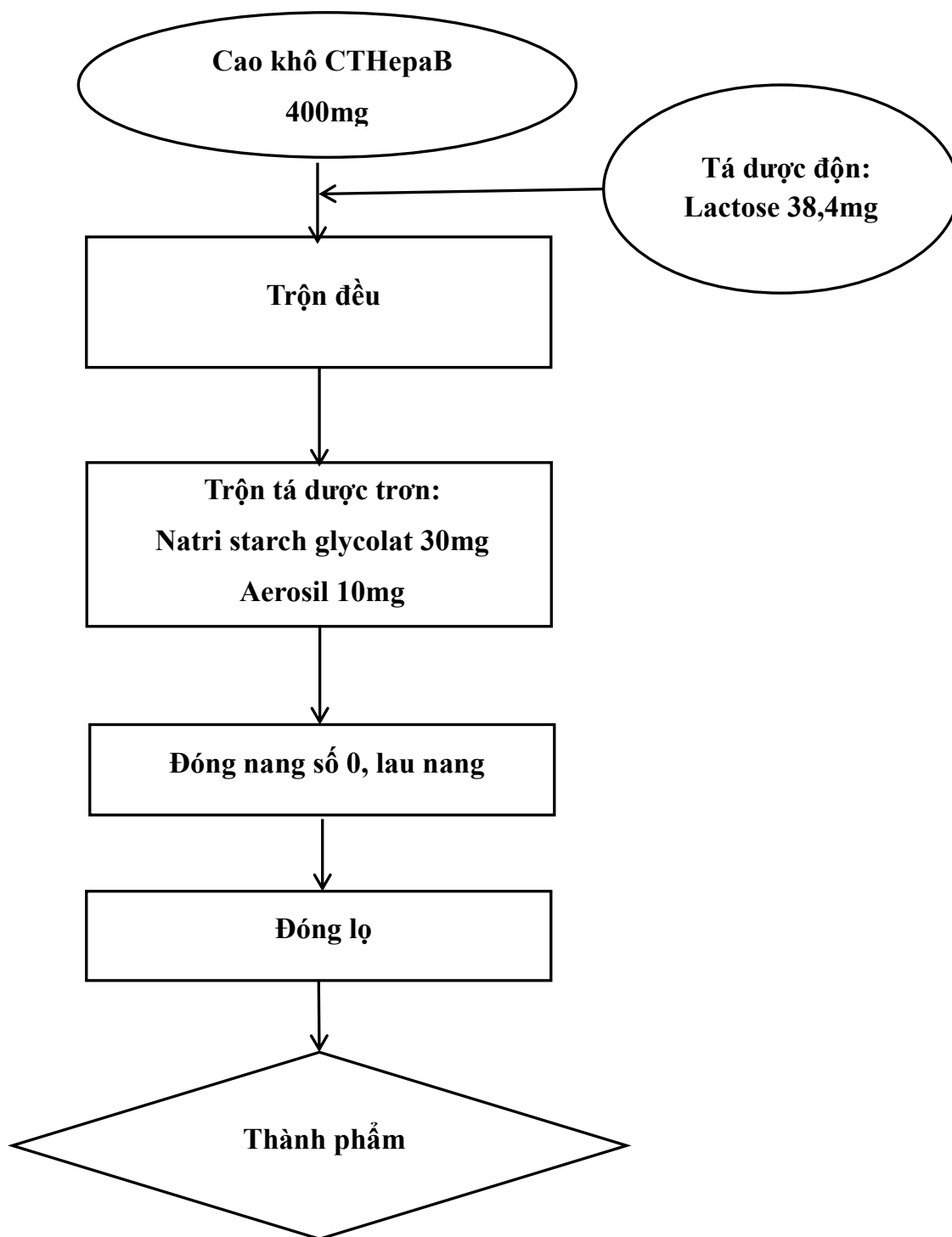
55. Q. Zhang, P. Liu, and H. W. Zhang (2006). Study on the patterns of TCM syndrome differentiation of 900 patients with posthepatic cirrhosis. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, vol. 26, no. 8, 694–697.
56. Ramón B, David AB. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115(2), 209-218.
57. Shimizu I (2000). Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 15 Suppl: D84-D90.
58. SanthRani Thaakur (2007). Inhibition of CCl₄ – induced liver fibrosis by *Trigonella foenum-graecum* Linn. *Natural Product Radiance*, vol 6(1), 11-17
59. Starkel P., Leclercq I.A. (2011), "Animal models for the study of hepatic fibrosis", *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25(2), 319-333.
60. Sami A. Gabr, Ahmad H. Alghadir, Yousery E. Sherif, and Ayman A. Ghfar (2016). *Biomarkers in Liver Disease*, Springer Reference, 471-491.
61. Tao Q, Sun MY, Feng Q (2009). Syndrome identification of CCl₄ induced liver fibrosis model rats based on syndrome detecting from recipe used. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 29(3):246-50.
62. Takahashi Shuhei, Liubao Gu, et al (2013). Blockade of Smad Signaling by 3'-deoxyadenosine: A Mechanism for Its Anti-Fibrotic Potential. *Lab Invest*, 93(4):450-61.
63. Wang GJ, Huang YJ, Chen DH, Lin YL (2009). Ganoderma lucidum extract attenuates the proliferation of hepatic stellate cells by blocking the PDGF receptor. *Phytotherapy Research*, 23(6):833-9.
64. Wen-Ce Zhou, Quan-Bao Zhang, Liang Qiao (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20(23): 7312-7324.
65. W. Z. Mehal, DPhil and D. Schuppan (2015). Antifibrotic Therapies in the Liver. *Semin Liver Dis*, 35(2), 184–198.
66. World Health Organization (2015). *Global Health Estimates 2015: Estimated deaths by cause 2000 and 2015*.
67. World Health Organization (2016). *World Hepatitis Day: Increased knowledge key to prevention and treatment of Hepatitis in Viet Nam*.

68. Xiaoning Wang, Guoxiang Xie, Xiaoyan Wang, Mingmei Zhou, Huan Yu, Yan Lin, Guangli Du, Guoan Luo, and Ping Liu (2015). Urinary Metabolite Profiling Offers Potential for Differentiation of Liver-Kidney Yin Deficiency and Dampness-Heat Internal Smoldering Syndromes in Posthepatitis B Cirrhosis Patients. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015: 464969.
69. Yibin Feng, Kwok-Fan Cheung, Ning Wang, Ping Liu, Tadashi Nagamatsu, and Yao Tong (2009). Chinese medicines as a resource for liver fibrosis treatment. *Chinese Medicine*, 4:16.
70. Zhu K, Pang P, Wu C, Shen M, Gong F, , et al. (2013). An MRI-Visible Non-Viral Vector Bearing GD2 Single Chain Antibody for Targeted Gene Delivery to Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(10): e76612.
71. Zhao XK, Cheng ML, et al (2014). Effect of Danshao Huaxian capsule on Gremlin and bone morphogenetic protein-7 expression in hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*, 20(40):14875-83.

PHỤ LỤC

Sơ đồ quy trình bào chế bột cao khô CT_{HepaB}





Sơ đồ các giai đoạn bào chế viên nang
Tiêu chuẩn cơ sở của viên nang CT HepaB
(bản scan)