

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM**



**TRẦN THỊ MỸ LINH**

**ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN VÀ  
TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN CỦA VIÊN NANG  
CTHEPAB TRÊN THỰC NGHIỆM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI- 2020**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

HỌC VIỆN Y DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN VIỆT NAM



**TRẦN THỊ MỸ LINH**

**ĐÁNH GIÁ ĐỘC TÍNH BÁN TRƯỜNG DIỄN VÀ  
TÁC DỤNG BẢO VỆ TẾ BÀO GAN CỦA VIÊN NANG  
CTHEPAB TRÊN THỰC NGHIỆM**

**Chuyên ngành : Y học cổ truyền**

**Mã số : 8720115**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ Y HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học:**

- 1. PGS.TS. Lê Thị Tuyết**
- 2. TS. Nguyễn Thị Minh Thu**

**HÀ NỘI - 2020**

## LỜI CẢM ƠN

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

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới PGS. TS Lê Thị Tuyết, TS. Nguyễn Thị Minh Thu Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam, người thầy hướng dẫn trực tiếp luôn theo sát, thường xuyên giúp đỡ, cho tôi nhiều ý kiến quý báu, sát thực trong quá trình học tập, nghiên cứu để hoàn thành luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám hiệu Trường Học Viện Quân Y đã quan tâm, tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong việc nghiên cứu, thu thập, hoàn thiện số liệu để hoàn thành đề tài.

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

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy, các Cô, các bác sỹ, kỹ thuật viên của Bộ môn Dược lý, trường Học Viện Quân Y đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và làm việc tại Bộ môn.

Tôi vô cùng biết ơn gia đình, bạn bè, anh chị em đồng nghiệp và tập thể học viên lớp cao học khóa 2017-2020 chuyên ngành Y học cổ truyền đã đồng viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.  
Xin trân trọng cảm ơn!

**Học viên**

**Trần Thị Mỹ Linh**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi là Trần Thị Mỹ Linh, Học viên Cao học khóa 10 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 Cô PGS.TS. Lê Thị Tuyết, TS. Nguyễn Thị Minh Thu.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

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

*Hà Nội, ngày 22 tháng 6 năm 2020*

**Người viết cam đoan**

**Trần Thị Mỹ Linh**

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Tổng quan về các bệnh lý gây hủy hoại tế bào gan.....	3
1.1.1. Tổng quan về bệnh Viêm gan B.....	3
1.1.2. Tổng quan về viêm gan do rượu.....	6
1.1.3. Tổng quan về tổn thương gan do thuốc .....	11
1.1.4. Viêm gan theo y học cổ truyền.....	13
1.2. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn và phương pháp thử nghiệm bảo vệ tế bào gan. ....	15
1.2.1. Tổng quan về thuốc y học cổ truyền .....	15
1.2.2. Tổng quan về thử nghiệm độc tính bán trường diễn.....	16
1.2.3. Tổng quan về phương pháp thử nghiệm bảo vệ tế bào gan.....	18
1.3. Tổng quan về viên nang cứng CTHepaB .....	19
1.3.1. Xuất xứ.....	19
1.3.2. Đặc điểm bào chế viên nang cứng CTHepaB.....	19
1.3.3. Cơ sở xây dựng bài thuốc.....	22
1.4. Tình hình nghiên cứu về các bài thuốc điều trị và vị thuốc điều trị viêm gan B .....	22
1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới về các bài thuốc điều trị viêm gan B.....	22
1.4.2. Tình hình nghiên cứu trong nước về các vị thuốc trong bài thuốc CTHepaB .....	25
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>26</b>
2.1. Chất liệu nghiên cứu .....	26
2.1.1. Chế phẩm làm nghiên cứu .....	26

2.1.2. Thiết bị máy móc và hóa chất.....	27
2.2. Đối tượng .....	27
2.2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	27
2.2.2. Tiêu chuẩn chọn mẫu.....	28
2.3. Địa điểm nghiên cứu.....	28
2.4. Thời gian nghiên cứu .....	28
2.5. Phương pháp nghiên cứu .....	28
2.5.1. Thiết kế nghiên cứu .....	28
2.5.2. Cỡ mẫu và cách chọn mẫu .....	29
2.5.3. Phương pháp nghiên cứu.....	29
2.6. Các biến số chỉ số trong nghiên cứu.....	31
2.6.1. Các biến số chỉ số trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn.....	31
2.6.2. Các biến số chỉ số trong nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào gan. ....	32
2.7. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu .....	33
2.8. Sai số và cách khống chế sai số.....	33
2.9. Đạo đức nghiên cứu.....	34
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>35</b>
3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của viên nang CTHePaB..	35
3.1.1. Ảnh hưởng của viên nang CTHePaB lên tình trạng chung và sự thay đổi khối lượng của chuột cống trắng khi dùng dài ngày .....	35
3.1.2. Ảnh hưởng của CTHePaB lên điện tim chuột ở đạo trình DII .....	36
3.1.3. Ảnh hưởng của CTHePaB đến một số chỉ tiêu huyết học chuột.....	37
3.1.4. Ảnh hưởng của CTHePaB lên chức năng gan, thận chuột thực nghiệm	41
3.1.5. Đại thể và mô bệnh học gan, thận và lách của chuột thí nghiệm .....	46
3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa của viên nang cứng trên mô hình thực nghiệm .....	50

3.2.1. Ảnh hưởng của CTHePaB trên khối lượng gan tương đối chuột nhắt trắng.....	50
3.2.2. Ảnh hưởng của CTHePaB lên hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh chuột .....	51
3.2.3. Ảnh hưởng của CTHePaB lên hàm lượng MDA trong gan chuột nhắt trắng.....	52
<b>Chương 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>55</b>
4.1. Về độc tính bán trường diễn của viên nang CTHePaB.....	56
4.1.1. Đối với thể trọng chuột.....	57
4.1.2. Đối với điện tim chuột ở đạo trình DII .....	57
4.1.3. Chức năng tạo máu .....	58
4.1.4. Chức năng gan, thận. ....	60
4.1.5. Tổn thương đại thể các cơ quan.....	62
4.1.6. Tổn thương vi thể các cơ quan .....	63
4.2. Tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang cứng CTHePaB trên thực nghiệm.....	63
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>68</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>69</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC VIẾT TẮT

<b>Viết tắt</b>	<b>Tiếng Việt</b>	<b>Tiếng Anh</b>
ALT	Chỉ số enzyme gan	Alanin Amino Transferase
AST	Chỉ số enzyme gan	Aspartat Amino Transferase
ĐVTN	Động vật thí nghiệm	
HBV	Virus viêm gan B	Virus Hepatitis B
HE×400	Nhuộm Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 400 lần	Hematoxylin - Eosin
ICH	Hội nghị quốc tế về hài hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người.	International Conference on Harmonization
MDA	Sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào	Malondialdehyde
TB	Trung bình	
WHO	Tổ chức y tế thế giới	World Health Organization
YHCT	Y học cổ truyền	
YHHĐ	Y học hiện đại	



## DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1.	Ảnh hưởng của CTHepaB đối với khối lượng cơ thể chuột.....	35
Bảng 3.2.	Ảnh hưởng đến điện tim chuột .....	36
Bảng 3.3.	Số lượng hồng cầu ở các lô chuột nghiên cứu.....	37
Bảng 3.4.	Hàm lượng huyết sắc tố ở các lô chuột nghiên cứu.....	38
Bảng 3.5.	Chỉ số hematocrit ở các lô chuột nghiên cứu .....	38
Bảng 3.6.	Chỉ số thể tích trung bình hồng cầu ở các lô chuột NC.....	39
Bảng 3.7.	Số lượng bạch cầu ở các lô chuột nghiên cứu .....	40
Bảng 3.8.	Số lượng tiểu cầu ở các lô chuột nghiên cứu.....	40
Bảng 3.9.	Nồng độ enzym AST, ALT của các lô chuột .....	41
Bảng 3.10.	Nồng độ bilirubin toàn phần của các lô chuột .....	42
Bảng 3.11.	Ảnh hưởng của viên nang CTHepaB lên các chỉ số albumin huyết tương trong máu.....	43
Bảng 3.12.	Ảnh hưởng của viên nang CTHepaB lên chỉ số creatinin trong máu chuột.....	44
Bảng 3.13.	Ảnh hưởng của viên nang CTHepaB lên nồng độ cholesterol toàn phần máu chuột sau.....	45
Bảng 3.14.	Ảnh hưởng của viên nang CTHepaB lên trọng lượng tương đối của gan. ....	50
Bảng 3.15.	Ảnh hưởng của CTHepaB lên hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh của các nhóm chuột nghiên cứu.....	51
Bảng 3.16.	Ảnh hưởng của CTHepaB đến hàm lượng MDA ở gan chuột gây độc.....	52
Bảng 3.17.	Tóm tắt nhận xét về đại thể gan của các nhóm chuột đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang cứng CTHepaB.....	53
Bảng 3.18.	Tóm tắt nhận xét về vi thể gan của các nhóm chuột đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang cứng CTHepaB .....	54

## DANH MỤC HÌNH VẼ

Hình 1.1.	Hình ảnh các vị thuốc trong bài thuốc và chế phẩm CTHepaB .	21
Hình 3.1.	Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô chứng .....	46
Hình 3.2.	Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 1 .....	46
Hình 3.3.	Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 2.....	46
Hình 3.4.	Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng.....	47
Hình 3.5.	Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 1 .....	47
Hình 3.6.	Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 2 .....	47
Hình 3.7.	Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng.....	48
Hình 3.8.	Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 1 .....	48
Hình 3.9.	Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 2 .....	48
Hình 3.10.	Hình ảnh vi thể thận chuột lô chứng.....	49
Hình 3.11.	Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 1 .....	49
Hình 3.12.	Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 2 .....	49
Hình 3.13.	Lô chứng, chuột 05 .....	53
Hình 3.14.	Lô mô hình, chuột 12.....	53
Hình 3.15.	Lô tham chiếu, chuột 26 .....	53
Hình 3.16.	Lô trị 1, chuột 34.....	53
Hình 3.17.	Lô trị 2, chuột 42.....	53
Hình 3.18.	Lô chứng, chuột 2 .....	54
Hình 3.19.	Lô mô hình, chuột 14.....	54
Hình 3.20.	Lô Silymarin, chuột 27 .....	54
Hình 3.21.	Lô trị 2 chuột 36.....	54
Hình 3.22.	Lô trị 2, chuột 45,.....	54

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Gan có nhiều chức năng quan trọng trong quá trình trao đổi chất và thải độc cơ thể. Trong các trường hợp bệnh lý hay có sự quá tải về lượng của các chất độc ở gan sẽ khiến các tế bào trong gan bị huỷ hoại dần, dẫn tới các tổn thương trên gan, thậm chí là hình thành các tổn thương không hồi phục như xơ gan và làm mất chức năng thải độc của gan [47], [48]. Bệnh lý của gan bao gồm nhiều loại trong đó bệnh viêm gan và xơ gan thường được nhắc đến nhiều do tính phổ biến và tính chất phức tạp của bệnh.

Ở nước ta nằm trong vùng nhiệt đới gió mùa ẩm, thuận lợi cho việc phát triển bệnh viêm gan virus, việc sử dụng thuốc, hóa chất, rượu thiếu hiểu biết, thiếu khoa học cũng là một tác nhân thuận lợi gây viêm gan mạn tính, dần dần phát triển thành xơ gan. Phần lớn các chất gây độc cho gan có liên quan tới sự peroxide hóa lipid màng tế bào gan và các stress oxy hóa [47].

Hiện nay, chưa có biện pháp loại bỏ hoàn toàn virus viêm gan B ra khỏi cơ thể. Mục tiêu của việc điều trị viêm gan virus B hiện nay chỉ là ngăn chặn virus nhân lên, giảm nồng độ virus trong máu (trở về âm tính là mục tiêu cao nhất), làm giảm bớt các tổn thương tế bào gan và hạ men gan. Mục tiêu lâu dài chính là ngăn chặn các biến chứng xơ gan, suy gan, ung thư gan. Vì thế, kết hợp dùng thảo dược đã được khoa học chứng minh tốt cho các bệnh viêm gan B mà hiện nay đang được các chuyên gia khuyến dùng.

Y học cổ truyền có nhiều bài thuốc hay, nhiều vị thuốc quý có tác dụng dự phòng và hỗ trợ điều trị bệnh viêm gan B. Bài thuốc CTHePaB gồm 8 dược liệu quý, được học viện Y dược Học cổ truyền Việt Nam đúc rút từ lý luận Y học cổ truyền và thực tiễn điều trị, bước đầu cho thấy có hiệu quả tốt trong điều trị các bệnh viêm gan, xơ gan, kể cả viêm xơ gan do virus. Bài thuốc được nghiên cứu hiện đại hóa dạng bào chế thành viên nang cứng

CTHepaB, qua điều trị viêm gan B trên lâm sàng cho thấy có kết quả khả quan. Cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu về độc tính và tác dụng bảo vệ tế bào gan của bài thuốc. Để có bằng chứng khoa học cho việc ứng dụng rộng rãi trên lâm sàng, tạo tiền đề cho việc phát triển sản phẩm phòng và điều trị viêm gan B, chúng tôi thực hiện nghiên cứu đề tài: **“Đánh giá độc tính bán trường diễn và tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang “CTHepaB” trên thực nghiệm”** với mục tiêu:

- 1. Đánh giá độc tính bán trường diễn của viên nang CTHepaB trên động vật thực nghiệm.*
- 2. Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang CTHepaB trên động vật thực nghiệm.*

## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Tổng quan về các bệnh lý gây hủy hoại tế bào gan

##### 1.1.1. Tổng quan về bệnh Viêm gan B

Viêm gan virus là một bệnh cũ đã được mô tả từ rất sớm. Năm 1947, Mac Callum và Bauer phân biệt viêm gan A là “Viêm gan truyền nhiễm” và viêm gan B là “Viêm gan huyết thanh” do hai bệnh khác nhau về phương diện dịch tễ học. 1964 Blumberg phát hiện kháng nguyên trong huyết thanh một người dân ở Australia gọi là kháng nguyên Australia. Năm 1968 Prince chứng minh kháng nguyên này liên quan tới nhiễm HBV, 1970 Dane quan sát thấy hạt HBV trong máu bệnh nhân trên kính hiển vi điện tử. Kháng nguyên này ngày nay được gọi tên là kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) và liên quan với nhiễm HBV cấp và mạn [27].

Virus viêm gan B (HBV - virus hepatitis B) nhân lên ở trong gan, gây nên các rối loạn chức năng gan, làm tổn thương tế bào gan và gây bệnh viêm gan virus B. Với virus viêm gan B bệnh có thể tiến triển từ cấp tính sang mạn tính và dẫn tới xơ gan và ung thư tế bào gan.

Theo Tổ chức Y tế thế giới ước tính hơn một phần ba dân số thế giới đã từng bị nhiễm HBV với khoảng 350 triệu người mang HBV (HBsAg(+)) mạn tính. Mỗi năm có khoảng 2 triệu người chết do hậu quả suy gan cấp, xơ gan, ung thư gan [38], [49].

Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ nhiễm virút viêm gan B cao trong quần thể dân cư nói chung và chịu hậu quả nặng nề do nhiễm virút viêm gan gây nên [34].

Những thử nghiệm huyết thanh học có độ nhạy và đặc hiệu cao đã sẵn sàng cho HBV và đưa đến những hiểu biết sâu sắc hơn về lịch sử tự nhiên của

bệnh. Các nghiên cứu về sinh bệnh học và dịch tễ học đã đưa đến sự phát triển một cách an toàn và hiệu quả của vaccin phòng chống nhiễm HBV cũng như các thuốc chống virus trong điều trị viêm gan B mạn [27].

Vì thế, mặc dù chương trình chủng ngừa hiệu quả rộng rãi trong thời gian qua đã giảm đáng kể tỷ lệ nhiễm HBV cấp trong nhiều nước, nhưng nhiễm HBV cho đến nay vẫn còn là một nguyên nhân quan trọng gây mắc bệnh và tử vong.

Hiện tại chúng ta có nhiều thuốc để điều trị viêm gan virus B (VGVRB) mạn với mục đích ức chế lâu dài nồng độ HBV DNA trong huyết thanh để có thể ngăn ngừa tiến triển đến xơ gan, ung thư tế bào gan (hepatocellular carcinoma = HCC) và tử vong.

#### *1.1.1.1. Viêm gan Virus B cấp*

- Chẩn đoán xác định:

\* Thể vàng da điển hình:

- Có tiền sử truyền máu hay các chế phẩm của máu, tiêm chích, quan hệ tình dục không an toàn trong khoảng từ 4 tuần đến 6 tháng.

- Lâm sàng: có thể có các triệu chứng chán ăn, mệt mỏi, vàng da, tiểu ít sẫm màu, đau tức vùng gan, nôn, buồn nôn, phân bạc màu...

- Cận lâm sàng:

- AST, ALT tăng cao (thường tăng trên 5 lần so với giá trị bình thường).

- Bilirubin tăng cao, chủ yếu là Bilirubin trực tiếp.

- HBsAg (+) hoặc (-) và anti-HBc IgM (+).

\* Một số thể lâm sàng khác:

- Thể không vàng da:

- Lâm sàng: có thể có mệt mỏi, chán ăn, đau cơ.

- Xét nghiệm: AST, ALT tăng cao, anti-HBc IgM (+) và HBsAg (+/-).

- Thể vàng da kéo dài:

○ Lâm sàng: Có các triệu chứng lâm sàng giống như thể điển hình, kèm theo có ngứa. Tình trạng vàng da thường kéo dài trên 6 tuần, có khi 3-4 tháng.

○ Xét nghiệm: AST, ALT tăng cao, Bilirubin tăng cao, chủ yếu là Bilirubin trực tiếp, HBsAg (+) hoặc (-) và anti-HBc IgM (+).

• Thể viêm gan tối cấp:

○ Lâm sàng: Người bệnh có biểu hiện suy gan cấp kèm theo các biểu hiện của bệnh lý não gan.

○ Xét nghiệm: AST, ALT tăng cao, Bilirubin tăng cao, chủ yếu là Bilirubin trực tiếp, HBsAg (+) hoặc (-) và anti-HBc IgM (+), thời gian đông máu kéo dài, giảm tiêu cầu.

- Chẩn đoán phân biệt:

\* Cần phân biệt với các loại viêm gan khác như: viêm gan nhiễm độc, viêm gan do virus khác (viêm gan vi rút A, viêm gan vi rút E, viêm gan vi rút C), viêm gan tự miễn, viêm gan do rượu...

\* Các nguyên nhân gây vàng da khác:

• Vàng da trong một số bệnh nhiễm khuẩn: Bệnh do *Leptospira*, sốt rét, sốt xuất huyết...

• Vàng da do tắc mật cơ học: u đầu tụy, u đường mật, sỏi đường mật,...

#### 1.1.1.2. Viêm gan virus mạn

Triệu chứng lâm sàng: giới hạn từ không có triệu chứng hay chỉ có những triệu chứng không đặc hiệu (mệt mỏi, đau khớp...) cho đến các triệu chứng của xơ gan như dấu hiệu bệnh gan mạn (sao mạch, vàng da, phù, bầm máu ngoài da...) hay tăng áp tĩnh mạch cửa (tuần hoàn bàng hệ, lách to, bàng bụng, dẫn tĩnh mạch thực quản...), ung thư gan. HBV có thể gây ung thư gan không qua giai đoạn xơ gan.

Chẩn đoán xác định:

○ HBsAg (+) > 6 tháng hoặc HBsAg (+) và Anti HBc IgG (+).

- AST, ALT tăng từng đợt hoặc liên tục trên 6 tháng.
- Có bằng chứng tổn thương mô bệnh học tiến triển, xơ gan (được xác định bằng sinh thiết gan hoặc đo độ đàn hồi gan hoặc Fibrotest hoặc chỉ số APRI) mà không do căn nguyên khác.

### ***1.1.2. Tổng quan về viêm gan do rượu***

Theo ông trưởng đại diện Tổ chức Y tế thế giới (WHO) tại Việt Nam Takeshi Kasai cho biết, theo thống kê của WHO, việc sử dụng đồ uống có cồn ở Việt Nam khá phổ biến, đặc biệt là ở nam giới. Ước tính có đến 70% đàn ông Việt Nam uống rượu, bia và cứ trong 4 người thì có 1 người sử dụng rượu, bia ở mức độ có hại, tương đương với 6 cốc bia hơi mỗi ngày. Việt Nam là đất nước tiêu thụ lượng bia lớn nhất Đông Nam Á.

Mỗi năm trên thế giới có 3,3 triệu người chết vì cồn, cao hơn số nạn nhân thiệt mạng vì AIDS, lao phổi và bạo lực cộng lại. Đó là kết luận trong báo cáo toàn cầu của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) ngày 12/5/2014, cảnh báo về tỷ lệ tiêu thụ đồ uống có cồn đang ngày càng tăng trong dân số thế giới [15].

#### ***1.1.2.1. Các nguyên nhân viêm gan do rượu***

Uống rượu nhiều và lâu ngày là nguyên nhân chính gây nên bệnh gan do rượu. Tổn thương gan do rượu gồm 3 hình thái :

- Gan nhiễm mỡ (fatty liver).
- Viêm gan do rượu (alcoholic hepatitis).
- Xơ gan do rượu (Alcoholic cirrhosis).

Gan nhiễm mỡ hay gặp nhất, chiếm > 90% các bệnh gan do rượu, viêm gan do rượu có tỉ lệ thấp hơn và gặp ở người uống nhiều rượu và uống kéo dài. Uống rượu lâu ngày sẽ tiến triển thành viêm gan do rượu và đây được coi là dấu hiệu báo trước của xơ gan rượu, nhưng gan nhiễm mỡ thì không được coi là dấu hiệu báo trước không tránh được của viêm gan hoặc xơ gan rượu, nó có thể hồi phục nếu bệnh nhân ngừng uống rượu.

Rượu gây độc cho gan phụ thuộc vào nhiều yếu tố :

- Lượng rượu uống vào



- Cách uống
- Tình trạng dinh dưỡng trước và trong khi uống
- Cơ địa

#### 1.1.2.2. Các thể lâm sàng viêm gan do rượu

##### *Gan nhiễm mỡ*

- Khái niệm: Gan nhiễm mỡ còn gọi là thoái hóa mỡ gan. Đó là tình trạng lượng mỡ tích tụ trong gan > 5% trọng lượng gan hay trên 50% tổng số tế bào gan bị nhiễm mỡ. Triệu chứng thường thấy là chứng gan to kín đáo, gia tăng vừa phải các men chuyển hóa (ALT: alanin aminotransferase) và phosphatase kiềm và hầu hết là không nguy hiểm.

- Lâm sàng chia 3 giai đoạn :

+ Giai đoạn 1: mỡ chiếm 5-10% trọng lượng gan. Lâm sàng chưa có triệu chứng, sinh thiết gan thấy có trên 50% số lượng tế bào gan có các hạt mỡ trong bào tương.

+ Giai đoạn 2: mỡ chiếm 10-30% trọng lượng gan. Lâm sàng thấy gan to hơn bình thường, men gan tăng, người mệt mỏi. Sinh thiết gan thấy nhiễm mỡ tế bào gan, có các vùng nhu mô gan viêm (Xâm nhập nhiều tế bào viêm). Đây là giai đoạn viêm gan nhiễm mỡ.

+ Giai đoạn 3: Mỡ chiếm trên 30% trọng lượng gan. Đây là giai đoạn nặng viêm gan và xơ gan, men gan tăng, đau tức vùng gan, người mệt mỏi, có thể có vàng da, xuất huyết. Sinh thiết gan có viêm và xơ gan.

- Điều trị:

+ Bắt buộc phải bỏ rượu. Nếu tổn thương gan mới chỉ ở giai đoạn 1 hoặc 2 thì bỏ rượu cấu trúc và chức năng có thể hồi phục sau một thời gian bỏ rượu.

+ Một số thuốc điều trị bệnh tiểu đường như: Actos, Avandia hay thuốc làm hạ lượng cholesterol trong máu (như lovastatin) có thể giúp làm giảm bớt sự phát triển của bệnh gan nhiễm mỡ.

- + Giảm cân nếu người bệnh thừa cân hoặc béo phì.
- + Hạn chế ăn các thực phẩm giàu cholesterol như phủ tạng động vật, mỡ động vật, ăn nhiều rau và hoa quả.

#### *Viêm gan do rượu*

- Khái niệm : Viêm gan do rượu được định nghĩa là những tổn thương mô bệnh học của tổ chức gan có liên quan đến việc lạm dụng rượu. Bệnh cảnh này được F.B. Mallory mô tả chính xác và chi tiết từ năm 1911 và cho đến nay vẫn không có gì thay đổi. Một hội nghị chuyên gia năm 1981 đã đưa ra tiêu chuẩn chẩn đoán gồm: (1) quá trình thoái hóa phi đại của tế bào gan, (2) hiện diện thể Mallory trong tế bào gan, (3) thâm nhiễm viêm, chủ yếu là do các tế bào hạt trung tính vào tổ chức liên kết, (4) tạo tổ chức xơ và (5) gan nhiễm mỡ (không bắt buộc).

#### - Lâm sàng:

Bệnh cảnh lâm sàng của viêm gan do rượu biến đổi từ bệnh không có triệu chứng hoặc triệu chứng nhẹ đến suy giảm chức năng gan gây tử vong. Bệnh cảnh viêm gan do rượu điển hình gồm:

- + Bệnh nhân chán ăn, buồn nôn, nôn, khó chịu, sụt cân, đau bụng và vàng da.

- + Sốt đôi khi cao tới 39,0 C có thể gặp ở 50% trường hợp.

- + Khám: gan to đau gặp ở phần lớn bệnh nhân, lách to gặp khoảng 1/3 trường hợp.

- + Nặng hơn có thể có: cổ trướng, phù, chảy máu, bệnh não gan.

- + Vàng da, cổ trướng và bệnh não gan có thể giảm dần khi kiêng rượu. Nếu tiếp tục uống rượu và chế độ ăn kém dinh dưỡng có thể dẫn đến các đợt viêm gan cấp lặp đi lặp lại với các biểu hiện của gan mất bù, có thể dẫn tới tử vong.

#### - Cận lâm sàng:

+ Men AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanin aminotransferase), GGT (gama glutamyl aminotransferase) tăng. Gợi ý nguyên nhân tổn thương gan do rượu là AST tăng cao hơn ALT ( chỉ số De Ritis:  $AST/ALT > 2$ ). GGT và bilirubin thường tăng trên ngưỡng bệnh lý.

+ Thiếu máu có thể do các nguyên nhân: Do chảy máu dạ dày ruột cấp hoặc mạn, thiếu hụt dinh dưỡng chủ yếu là acid folic và vitamin B12, cường lách, ức chế trực tiếp của ethanol lên tuỷ xương, thiếu máu huyết tán có thể do tác động tăng cholesterol huyết lên màng hồng cầu làm thành những chỗ nhô ra giống như cái cựa (hồng cầu gai).

+ Tăng bạch cầu (viêm gan do rượu) gặp trong những trường hợp nặng, tuy nhiên một số bệnh nhân có thể có giảm bạch cầu và tiểu cầu do cường lách hoặc do tác dụng ức chế của rượu tới tuỷ xương.

+ Tăng nhẹ bilirubin huyết thanh.

+ Thời gian prothrombin huyết thanh thường kéo dài.

+ Các rối loạn chuyển hoá: rối loạn dung nạp glucose, ở bệnh nhân bị cổ trướng có giảm natri huyết do pha loãng, giảm kali huyết có thể xảy ra do mất kali qua nước tiểu và một phần do tăng aldosteron.

+ Sinh thiết gan làm mô bệnh học:

- Các tế bào gan thoái hoá và hoại tử, thường có các tế bào căng phồng và có thâm nhiễm các bạch cầu đa nhân và lympho bào.

- Các thể Mallory gợi ý rất nhiều đến viêm gan do rượu nhưng không có tính đặc hiệu vì chất tương tự về mặt hình thái học.

- Lắng đọng collagen xung quanh tĩnh mạch trung tâm và trong vùng xung quanh xoang, hiện tượng này gọi là xơ chất trong trung tâm (central hyaline sclerosis) có thể kết hợp với gia tăng khả năng tiến triển đến xơ gan.

- Nhìn với độ phóng đại thấp (HE x 10) tổn thương chủ yếu là thoái hoá mỡ, xơ hoá, viêm và tổn thương tế bào gan.

- Điều trị:

+ Chế độ ăn: Bỏ rượu bia là bắt buộc. Nếu không có các dấu hiệu của hôn mê gan sắp xảy ra bệnh nhân phải ăn theo chế độ có ít nhất 1g protein cho 1kg trọng lượng cơ thể (khoảng 2000- 3000Kcal). Bổ sung vitamin (nhất là vitamin B1, acid folic).

+ Thuốc:

- Điều chỉnh các rối loạn điện giải nếu có.
- Corticoid: Prednisone 40 mg/ngày hoặc Prednisolone 32 mg/ngày trong vòng 4 tuần cho các bệnh nhân có DF trên 32 hoặc hôn mê gan (khi không có xuất huyết tiêu hóa, suy thận và nhiễm trùng).
- Chỉ số DF (Discriminant function) =  $4.6 \times (\text{TQ bệnh nhân} - \text{TQ chúng}) + \text{Bilirubin máu toàn phần}$ .
- TQ: thời gian prothrombin.
- Thuốc kháng phosphodiesterase: Pentoxifylline 400 mg uống 3 lần/ngày. Thuốc kháng phosphodiesterase không chọn lọc với tác dụng kháng viêm cho các bệnh nhân có DF trên 32.

### *Xơ gan*

- Khái niệm : Xơ gan là một bệnh gan mạn tính được đặc trưng bởi sự thay thế mô gan bằng mô xơ, sẹo và sự thành lập các nốt tân sinh dẫn đến mất chức năng gan.

- Lâm sàng :

Thời kỳ đầu, xơ gan thường không có triệu chứng, về sau tùy thuộc từng mức độ có các biểu hiện:

- + Hội chứng suy tế bào gan.
- + Hội chứng tăng áp lực tĩnh mạch cửa.
- + Hội chứng biến đổi hình thái gan: gan thường to chắc nhưng cũng có thể teo.

Bệnh nhân mệt mỏi, kém ăn, vàng da, da sạm, dễ chảy máu cam, chảy máu chân răng, phù, cổ trướng, suy giảm chức năng tình dục..., nặng hơn có những triệu chứng của biến chứng như nôn ra máu và đi ngoài phân đen do vỡ giãn tĩnh mạch thực quản, hôn mê gan, suy thận, các biểu hiện nhiễm khuẩn hoặc do xơ gan ung thư hóa...

- Điều trị:

+ Điều trị triệu chứng.

+ Ghép gan: Cho bệnh nhân bệnh gan giai đoạn cuối hoặc xơ gan đã cai rượu > 6 tháng.

### ***1.1.3. Tổng quan về tổn thương gan do thuốc***

Tổn thương gan do thuốc (DILI, drug-induced hepatotoxicity) được gây ra do thuốc (thuốc kê đơn hoặc OTC), các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược, hoặc các chất ngoại lai khác (xenobiotic) dẫn tới bất thường trong xét nghiệm về gan hoặc rối loạn chức năng gan thích được bằng các nguyên nhân khác. Có 2 loại DILI: nội tại và đặc ứng. DILI nội tại là độc tính trên gan do thuốc có thể dự đoán trước và liên quan đến liều (ví dụ: paracetamol), DILI đặc ứng ít xảy ra hơn, ít liên quan đến liều và có các biểu hiện đa dạng hơn.

Khó xác định chính xác tỷ lệ mắc DILI do các thử nghiệm lâm sàng trước khi thuốc được lưu hành trên thị trường không đủ hiệu lực để phát hiện các DILI đặc ứng. Tỷ lệ mắc DILI hàng năm được ước tính khoảng 10 đến 15 trong 10.000 đến 100.000 người sử dụng thuốc kê đơn. Theo đó, mỗi năm có khoảng 44.000 người Mỹ mắc DILI, gây tổn hại về sức khỏe người bệnh và gia tăng chi phí y tế. Tỷ lệ này được dự đoán sẽ gia tăng do việc sử dụng rộng rãi các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược. Trong 2000 trường hợp suy gan cấp (acute liver failure - ALF) ở Mỹ mỗi năm, số ca liên quan đến thuốc chiếm >50%, với 37% số ca liên quan đến paracetamol và 13% số ca do các phản ứng có hại đặc ứng của thuốc.

### *1.1.3.1. Cơ chế tổn thương của DILI*

DILI được cho rằng có thể xảy ra theo một số cơ chế khác nhau. Trong đó có suy giảm trực tiếp về cấu trúc (ví dụ rối loạn chức năng ty thể) và chức năng toàn vẹn của gan, hình thành chất chuyển hóa làm thay đổi cấu trúc và chức năng tế bào gan, hình thành chất chuyển hóa có hoạt tính liên kết với protein ở gan, hình thành sản phẩm thuốc-protein có tính kháng nguyên là mục tiêu tấn công của hệ thống miễn dịch của cơ thể (giả thuyết bán kháng nguyên), và sự khởi đầu đáp ứng quá mẫn toàn thân (ví dụ: dị ứng thuốc) gây tổn thương gan.

### *1.1.3.2. Các thuốc liên quan đến DILI*

Trên 60% trường hợp DILI liên quan đến kháng sinh và thuốc chống động kinh. Các hướng dẫn lâm sàng về DILI đặc ứng của Trường môn Tiêu hóa Hoa Kỳ (American College of Gastroenterology-ACG) đã xác định các thuốc phổ biến nhất và được mô tả chi tiết liên quan đến DILI cũng như loại tổn thương gan:

- Các thuốc chống viêm giảm đau nonsteroid
- Thuốc kháng yếu tố hoại tử khối u
- Các steroid tăng đồng hóa
- Các androgen chứa khung steroid.
- Và một số dẫn xuất khác.

### *1.1.3.3. Tổn thương gan do các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược*

Số trường hợp DILI do các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược có sự gia tăng đáng kể. Dữ liệu từ nghiên cứu DILI cho thấy mức tăng từ 7% đến 20% từ năm 2004 đến năm 2013. Các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược phổ biến nhất liên quan đến DILI

tại Mỹ là các chế phẩm bổ sung trong tập luyện thể hình và giảm cân. Các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược trong tập luyện thể hình gây vàng da kéo dài, nhưng không gây tử vong, trên nam giới khỏe mạnh. Các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược ngoài tập luyện thể hình gây DILI tế bào gan chủ yếu ở những phụ nữ trung niên và nhiều khả năng hơn dẫn tới tử vong (trong 13%) hoặc cần có chỉ định ghép gan. Khác với các thuốc kê đơn và không kê đơn chứa các thành phần có hoạt tính và không hoạt tính được phân loại rõ ràng, thành phần của các chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược thường rất dao động (khác nhau về hiệu lực của thành phần có hoạt tính, tạp chất). Các sản phẩm này cũng thiếu sự giám sát, quản lý, gây khó khăn trong việc đánh giá DILI. Một số chế phẩm bổ sung và sản phẩm có nguồn gốc thảo dược liên quan đến DILI và phản ứng lặp lại sau khi tái sử dụng sản phẩm bao gồm sản phẩm chiết xuất từ Trà xanh, các glycosid từ Phan tả diệp, Rau má (*Centella asiatica*), cây Hoàng liên lớn, vỏ Hạt mã đề (*isabgol*) và *Venencapsan*.

#### 1.1.3.4. Các tiêu chuẩn đánh giá

Các tiêu chuẩn hóa sinh lâm sàng để xác định sự xuất hiện DILI bao gồm ít nhất một trong các tiêu chí sau: ALT tăng  $\geq 5$  lần ULN (giới hạn bình thường trên), ALP tăng  $\geq 2$  lần ULN, và ALT tăng  $\geq 3$  lần ULN kèm theo bilirubin tăng  $> 2$  lần ULN. Giá trị R được sử dụng để xác định loại tổn thương gan:  $R = (ALT/ULN)/(ALP/ULN)$ .  $R \geq 5$  phản ánh tổn thương tế bào gan,  $R < 2$  tương ứng với tổn thương tắc mật; trong khi  $2 < R < 5$  thể hiện tổn thương tế bào gan và tắc mật hỗn hợp. Cần lưu ý, loại tổn thương và các biểu hiện lâm sàng có thể thay đổi đối với cùng một thuốc [21].

#### 1.1.4. Viêm gan theo y học cổ truyền

Khái niệm: Bệnh viêm gan được miêu tả trong chứng hoàng đản hiệp thống của y học cổ truyền [33].

Trên lâm sàng được chia làm 2 thể, là cấp tính và mạn tính. Thể cấp tính do thấp nhiệt gây ra, thuộc phạm vi chứng dương hoàng (nếu có hoàng đản), thể mạn tính do sự giảm sút công năng của các tạng can, tỷ thuộc phạm vi chứng âm hoàng (nếu có vàng da kéo dài).

Viêm gan mạn tính thường xảy ra sau khi mắc các bệnh viêm gan cấp (viêm gan virus hay viêm gan nhiễm độc), sau khi mắc bệnh sốt rét hoặc suy dinh dưỡng kéo dài.

Trong các y văn cổ của Y học cổ truyền không có bệnh danh xơ gan. Nhưng qua các biểu hiện triệu chứng lâm sàng thường thấy triệu chứng của bệnh này như ăn kém, đau hạ sườn phải, gan to, lách to, vàng da, vàng mắt... thì bệnh được xếp vào phạm vi các chứng “hiếp thông”, “hoàng đản”, “tích tụ”.

#### *Chứng hoàng đản*

Trong “Hoàng đế nội kinh”- Một bộ sách kinh điển nhất của Y học Trung hoa vào thế kỷ thứ VIII trước công nguyên ở chương “Bình nhân khí tượng luận” đã mô tả chứng bệnh có biểu hiện vàng da, vàng mắt, tiểu tiện vàng, trên lâm sàng và gọi đó là hoàng đản. Ngoài ra tập sách cũng đã đề cập tới những nguyên nhân gây bệnh từ sự thay đổi của môi trường bên ngoài như: Thử, Thấp, Nhiệt... kết hợp với sự suy yếu chức năng của các nội tạng bên trong mà phát bệnh. Đến thời Hán ở Trung quốc vào thế kỷ thứ II – III sau công nguyên trong bộ sách “Kim quỹ yếu lược” đã phân Hoàng đản ra thành 5 loại: Hoàng đản, Cốc đản, Tửu đản, Nữ lao đản và Hắc đản, cũng như các phương pháp điều trị tương ứng như thanh nhiệt trừ thấp, thẩm thấp lợi tiểu thoái hoàng... với các bài thuốc cổ phương điều trị có hiệu quả như “Nhân trần cao thang”, “Nhân trần ngũ linh tán” ... vẫn còn nguyên giá trị đến ngày nay và được các thầy thuốc YHCT sử dụng có hiệu quả trên lâm sàng. Ở Việt Nam thế kỷ thứ XIV danh y Tuệ Tĩnh cũng phân Hoàng đản ra thành 5 loại, nhưng lấy Hoàng đản thay Hắc đản và ông cũng đưa ra một số vị thuốc



để điều trị như Chi tử, ý dĩ, Hoàng cầm... trong bộ sách “Nam dược thần hiệu” của mình.

*Chứng hiệp thống:*

Là những biểu hiện đau tức nặng vùng hạ sườn phải, một dấu hiệu cơ năng thường gặp trong các bệnh lý gan mật như viêm gan mạn tính, xơ gan... Chứng hiệp thống: với giải nghĩa theo từ Hán Việt: “Hiệp” là vùng mạng sườn và “Thống” là đau: hiệp thống là đau vùng mạng sườn. Trong sách “Linh khu” - một trong những bộ sách kinh điển của YHCT ra đời trước công nguyên ở Trung quốc trong thiên “Ngũ tà” có viết: Tà ở can thì mạng sườn đau, vì mạng sườn có đường đi của can kinh.

*Chứng tích tụ:*

Trong Y học hiện đại một trong những triệu chứng lâm sàng thường gặp của xơ gan là thấy gan lách to. Trong Y học cổ truyền thuộc vào chứng “Tích tụ”. Trong sách Nội kinh nói “Tà khí lưu đọng, tích tụ hình thành”. Ngay từ thời xa xưa các nhà y học cũng nhận thấy rằng sự hình thành tích tụ là do tà khí lưu trệ, khí huyết không thông mà gây ra. Sách Nạn kinh phân biệt giữa tích và tụ một cách tương đối “tích là do ngũ tạng sinh ra, tụ là do lục phủ sinh thành, tích là âm khí tụ là dương khí..”. Trong sách Kim quỹ yếu lược đã có những lý luận sâu về nguyên nhân, cơ chế bệnh sinh và điều trị chứng tích tụ.

## **1.2. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn và phương pháp thử nghiệm bảo vệ tế bào gan.**

### **1.2.1. Tổng quan về thuốc y học cổ truyền.**

Thuốc y học cổ truyền Việt Nam đã có lịch sử tồn tại và phát triển từ hàng ngàn năm nay. Lịch sử phát triển của thuốc cổ truyền gắn liền với lịch sử tồn tại, phát triển của dân tộc Việt Nam. Thuốc đông y, thuốc từ dược liệu dễ dàng được đón nhận nhờ vào bề dày lịch sử cũng như người dân tin rằng thuốc

YHCT bào chế từ thảo dược sẽ ít có tác dụng phụ hơn so với thuốc tây. Đáp ứng thị hiếu người tiêu dùng, các nhà sản xuất thuốc cổ truyền của Việt Nam đã “tự do” cho ra đời hàng loạt các chế phẩm không qua thử nghiệm hoặc thử nghiệm không đầy đủ theo chuẩn từ nhiều dược liệu khác nhau, đa dạng phong phú về tên gọi, chủng loại, thành phần, tác dụng cũng như cách bào chế, giá cả tạo nên một thị trường thuốc từ dược liệu, thuốc đông y khó kiểm soát [1].

Việc nghiên cứu các thuốc có nguồn gốc dược liệu nhằm:

- Đánh giá tính xác thực của thuốc (authenticity) với các tiêu chuẩn cảm quan, thực vật, hóa lý và nếu có thể cả tiêu chuẩn sinh học.
- Đánh giá chất lượng thuốc thông qua việc xác định hàm lượng tạp chất, hàm lượng hoạt chất hoặc nhóm hoạt chất của dược liệu.
- Đánh giá hiệu quả của qui trình bào chế cổ truyền.
- Đánh giá độc tính của thuốc.
- Đánh giá tác dụng điều trị.
- Đánh giá tác dụng hỗ trợ điều trị.
- Đánh giá tác dụng có lợi đối với sức khỏe con người.
- Các đánh giá khác tùy theo mục tiêu nghiên cứu.

Hiện nay nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam thường sử dụng thuốc đông y để điều trị, mang lại lợi ích lớn cho người bệnh vì ít tác dụng không mong muốn, ít tốn kém [1].

### ***1.2.2. Tổng quan về thử nghiệm độc tính bán trường diễn***

#### ***1.2.2.1. Mục tiêu***

Thử độc tính dài ngày chỉ được tiến hành sau khi đã có thông tin về độc tính cấp trên động vật và mẫu thử được dự định sử dụng hoặc tiếp xúc dài ngày trên người.

Thử độc tính dài ngày nhằm xác định khả năng dung nạp của động vật thí nghiệm khi dùng mẫu thử nhiều lần. Thông tin cần xác định có những biểu hiện độc tính sau khi dùng dài ngày, bao gồm:

Mức liều không hoặc có gây thay đổi đáng kể tới chức năng, cơ quan

hoặc một số biểu hiện sống có thể quan sát được trên động vật thí nghiệm.

Những độc tính có thể quan sát được trên động vật và khả năng hồi phục nếu có.

#### 1.2.2.2. Lựa chọn mô hình thử

Căn cứ vào các thông tin của mẫu thử và kết quả thử độc tính cấp để thiết kế mô hình, mức liều thử.

Trường hợp mẫu thử không thể hiện độc tính cấp hoặc rất ít độc, có thể thử trên 1 loài động vật (gặm nhấm).

Trường hợp mẫu thử thể hiện độc tính cấp cao, liều gây độc gần với liều có tác dụng dược lý, cần thiết thử trên 2 loài động vật (gặm nhấm và không gặm nhấm).

#### 1.2.2.3. Thời gian thử

Thời gian thử trên động vật được tính dựa theo thời gian dự kiến dùng trên người hoặc có thể thử với các khoảng thời gian xác định. Ngoài ra, thời gian thử còn phụ thuộc vào đích của thử nghiệm là cung cấp thông tin cho thử lâm sàng giai đoạn nào. Khi cần thông tin cho thử lâm sàng giai đoạn 1 hoặc 2, thời gian có thể ngắn hơn (14-28 ngày), khi cần cung cấp thông tin cho thử lâm sàng giai đoạn 3, thời gian thử cần dài hơn (28-90 ngày). Hiện nay, tài liệu hướng dẫn của các nước tham gia hòa hợp ICH (*International Conference on Harmonization*) giới thiệu tính thời gian thử độc tính theo 2 cách:

Thời gian thử thuốc bằng 3-4 lần thời gian dự kiến dùng trên người.

Thời gian thử theo từng khoảng xác định: 14 ngày, 28 hoặc 90 ngày.

Lựa chọn từng khoảng thời gian thử tùy theo yêu cầu từng mẫu và điều kiện thử nghiệm.

Đánh giá mức độ độc sẽ được xem xét trên báo cáo kết quả tương ứng với từng khoảng thời gian đã thử.

#### 1.2.2.4. Liều dùng

Thuốc được dùng chủ yếu qua đường uống bằng dụng cụ chuyên biệt. Mức liều thử phải được lựa chọn sao cho có ý nghĩa trong việc đánh giá về khả năng an toàn hay mức độ gây độc của mẫu thử khi dùng nhiều ngày trên động vật. Mức liều thử thường được tính từ các thông tin thu được từ thử độc tính cấp, và được quy đổi tương đương theo liều giữa các loài nếu thử trên loài khác nhau (phụ lục 1). Với những nghiên cứu đầy đủ, thử nghiệm được thiết kế với 3 mức liều (tương đương 3 nhóm thử):

- Liều thấp: mức liều đủ để mẫu thử có tác dụng dược lý hoặc điều trị (tức là tương đương mức liều dự kiến dùng để điều trị cho người).

- Liều trung bình: mức liều có thể không gây những độc tính quan sát được hoặc gây ảnh hưởng không đáng kể.

- Liều cao: mức liều dự kiến sẽ quan sát được biểu hiện ngộ độc trên cơ quan của ĐVTN hoặc đến mức thể tích giới hạn cao nhất mà ĐVTN có thể dùng được.

Thử nghiệm nên được tiến hành song song với 1 nhóm chứng trong cùng điều kiện với cùng số lượng động vật đã dùng trong nhóm thử. Tuy nhiên, trong thời điểm hiện tại phần lớn các nghiên cứu có thể chấp nhận với 1 nhóm chứng và 2 nhóm thử (liều thấp và liều cao). Cho động vật dùng thuốc hàng ngày, 7 ngày/ tuần, trừ khi có chế độ liều đặc biệt. Số động vật trên mỗi nhóm tùy theo loài 8-10 con (gặm nhấm), hoặc 2-4 con (không gặm nhấm). Việc dùng các động vật không gặm nhấm thường rất tốn kém, đặc biệt là các loài linh trưởng. Khi cần thử nghiệm trên động vật không gặm nhấm, đề cương cần được xem xét bởi Hội đồng khoa học hoặc khi có yêu cầu của cơ quan quản lý hoặc nhà sản xuất [3].

### ***1.2.3. Tổng quan về phương pháp thử nghiệm bảo vệ tế bào gan***

Để gây tổn thương gan trên chuột, người ta dùng nhiều loại hóa chất khác nhau như: paracetamol, carbon tetrachlorid, D-galactosamin, ethanol, erythromycin estolate, aflatoxin B [44], [45].

Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) là một chất gây độc cho gan đã được biết

từ lâu. Chất này gây bệnh viêm gan cấp tính và mãn tính, cũng như gây ra bệnh ung thư gan. CCl<sub>4</sub> được dùng phổ biến làm chất thử nghiệm để gây tổn thương gan trên mô hình động vật. CCl<sub>4</sub> gây nên sự xơ hóa gan và làm thay đổi các chỉ số sinh hóa của gan, với các triệu chứng tương tự với viêm gan cấp tính do virút [42], [43]. Khi tế bào bị tổn thương, enzyme transaminase như alanine aminotransferase (ALT) tiết ra môi trường làm cho hoạt độ ALT đo được trong môi trường tăng. Tiến hành đo hoạt lực enzyme này để đánh giá mức độ thương tổn của tế bào gan [42], [43].

Paracetamol là chất chuyển hóa có hoạt tính của phenacetin, là thuốc giảm đau - hạ sốt hữu hiệu được sử dụng nhiều trong cuộc sống. Khi dùng quá liều paracetamol một chất chuyển hóa là N - acetyl - benzoquinonimin gây độc nặng cho gan.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chọn paracetamol làm tác nhân gây tổn thương gan do sinh ra gốc tự do gây peroxy hóa màng tế bào gan. Ngoài cơ chế sinh ra gốc tự do tương tự như tác nhân truyền thống gây độc gan cấp tính là CCl<sub>4</sub>, paracetamol còn làm suy kiệt hệ thống chống oxi hóa của cơ thể (hệ thống các chất thiol). Paracetamol sau khi vào cơ thể, một phần bị chuyển hóa bởi các cytochrome P450 tạo thành N-acetyl para-benzoquinonimin (NAPQI), một gốc tự do gây peroxy hóa lipid và sinh ra MDA (malondialdehyde) dẫn đến tổn thương các tế bào gan, làm tăng AST, ALT và làm biến đổi cấu trúc gan [44], [45], [46].

### **1.3. Tổng quan về viên nang cứng CT<sub>HepaB</sub>**

#### ***1.3.1. Xuất xứ***

“CT<sub>HepaB</sub>” là bài thuốc kinh nghiệm của PGS.TS. Đậu Xuân Cảnh đã đúc rút trong quá trình điều trị lâm sàng, 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.

#### ***1.3.2. Đặc điểm bào chế viên nang cứng CT<sub>HepaB</sub>***

Thành phần liệu dược liệu khô trong bài thuốc CTHePaB 100g gồm: Cà gai leo (*Solanum hainanense* Hance *Solanaceace*) 30g, Cỏ sữa nhỏ lá (*Euphorbia thymifolia* Burm) 20g, Chi tử (*Gardenia jasminoides*) 10g, Đại hoàng (*Rheum palmatum* Baill) 05g, Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) 10g, Nấm đông trùng (*Cordyceps Militaris*) 05g, Linh chi (*Ganoderma lucidum*) 10g, Hà thủ ô (*Fallopia multiflora* (Thunb) 10g.

Các vị thuốc trong CTHePaB đều đạt tiêu chuẩn dược điển Việt Nam V. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành bào chế bột cao khô định chuẩn bằng phương pháp phun sấy, hiện tại số liệu chưa được công bố. Cả bài thuốc được sấy ở nhiệt độ 60° C trong 2h, sau đó cô cao, loại tạp rồi phun sấy để được bột cao khô. Cuối cùng nén thành viên nang cứng. Từ 100g dược liệu khô của bài thuốc bào chế ra 8g bột cao khô CTHePaB, sau đó đóng vào viên nang cứng CTHePaB 400mg dùng đường uống, do Viện Đào tạo Dược – Học Viện Quân Y sản xuất, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

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 trên chuột và cho kết quả an toàn, không gây ảnh hưởng chung của chuột (nhóm nghiên cứu đã tiến hành, số liệu chưa được công bố).



Cà gai leo  
(*Solanumhainanens*  
*eHance*  
*Solanaceace*)



Cỏ sữa nhỏ lá  
(*Euphorbia*  
*thymifolia*  
Burm)



Đinh lăng  
(*Polyscias fruticosa*  
(L.) Harms)



Linh chi  
(*Ganoderma*  
*lucidum*)



Hà thủ ô (*Fallopia*  
*multiflora* (Thunb))



Đại hoàng  
(*Rheum*  
*palmatum* Baill)



Nấm đông trùng  
(*Cordyceps*  
*Militaris*)



Các vị thuốc



**Hình ảnh chế phẩm CTHePaB**

**Hình 1.1. Hình ảnh các vị thuốc trong bài thuốc và chế phẩm CTHePaB**

### ***1.3.3. Cơ sở xây dựng bài thuốc***

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

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

- Dựa vào tính năng các vị thuốc phù hợp để điều trị triệu chứng bệnh gan. Bài thuốc có tác dụng: Thanh nhiệt giải độc, ích can, bổ khí ích huyết gồm 8 vị thuốc đã trình bày ở trên. Với:

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

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

+ Tá: Đinh lăng, Đông trùng hạ thảo, Linh chi, Hà thủ ô bồi bổ nguyên khí giúp nâng cao chính khí đẩy lùi thấp nhiệt độc, phục hồi hình thái, công năng tạng phủ.

+ Sứ: Đại hoàng, 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 (xem phần phụ lục).

- Một số công trình nghiên cứu trên thực nghiệm , trên lâm sàng của các vị thuốc trong bài thuốc như Cà gai leo [9], [12], [13] Đông trùng hạ thảo [52], [53], [57], Nấm linh chi [41], [57], Đại hoàng [58], Chi tử [8], đã chứng minh các tác dụng: bảo vệ phục hồi tổn thương tế bào gan, ức chế sự nhân lên và diệt phần nào HBV, ức chế sự phát triển của xơ gan.

- Tác dụng các vị thuốc được viết trong phần phụ lục.

## **1.4. Tình hình nghiên cứu về các bài thuốc điều trị và vị thuốc điều trị viêm gan B**

### ***1.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới về các bài thuốc điều trị viêm gan B***

Lưu Hào Giang, Bệnh Viên ung thư Nam Thông, tỉnh Giang Tô (2000) dùng bài “Kiện tỳ hoạt huyết thang” trong đó có các vị thuốc như ý dĩ, tam



lãng nga truật,... điều trị cho bệnh nhân xơ gan giai đoạn đầu, kết quả lâm sàng có khả quan [24].

Chu Minh Liệt, Bệnh viện nhân dân Sa thị số 3, tỉnh Hồ Bắc dùng bài “Kiện tỳ nhuận can thang” trong đó có chứa Linh Chi chiếm hàm lượng cao điều trị xơ gan còn bù, kết quả hết triệu chứng lâm sàng, chức năng gan phục hồi bình thường [41].

Lữ Vân Kiếm, Bệnh viện Trung y Hạ Ấp, tỉnh Hà Nam dùng bài “Kiện tỳ phân tiêu thang” trong đó hàm lượng Ý dĩ hoàng kỳ chiếm tỉ lệ cao, trị xơ gan cổ trướng; kết quả lâm sàng tốt [41].

Theo nghiên cứu của LiCX và cộng sự (1998) tác dụng của viên Hán Đan Can Lạc, một chế phẩm y học Trung Quốc bao gồm Đan Sâm, Bạch Thược, Hoàng Kỳ, Phòng Kỳ và Ngân hạnh diệp trên mô hình chuột gây xơ gan bằng CCl<sub>4</sub>. Hán Đan Can Lạc làm thay đổi hình thái của gan chuột bị xơ. Hán Đan Can Lạc làm giảm hơn 50% sự tích tụ collagen ở gan do CCl<sub>4</sub> 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 [79].

Theo nghiên cứu của Chen H, Yang BW và các cộng sự (2016), tác dụng phòng ngừa và điều trị của viên nang Phù Chính Hóa Ú (chiết suất từ Đan Sâm, Đông Trùng Hạ Thảo, Đào Nhân, Giảo Cổ Lam, Phấn Hoa Thông, Ngũ Vị Tử) đối với xơ gan và biểu hiện yếu tố tăng trưởng mô liên kết (CTGF) ở chuột. Trên mô hình thực nghiệm 40 con chuột được gây xơ gan bằng CCl<sub>4</sub> và rượu, Viên nang Phù Chính Hóa Ú cho thấy tác dụng phòng ngừa và điều trị đối với bệnh xơ gan. Phù Chính Hóa Ú có thể ức chế biểu hiện CTGF trong mô gan, đây có thể là một trong những cơ chế phân tử của những tác động này [77].

Theo Cheng ML, Lu T, Yao YM, Geng XX (1998) “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 [79].

Theo Zhao XK, Cheng ML và các cộng sự (2014) đã nghiên cứu ảnh hưởng của viên nang Đan Thược Hóa Xơ trên biểu hiện của Gremlin và protein tạo hình xương-7 (BMP-7) trong gan của chuột bị xơ hóa gan bằng CCl<sub>4</sub>. Nghiên cứu đã kết luận cơ chế điều trị của Đan Thược Hóa Xơ 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 [78].

Theo nghiên cứu của Cheng ML, Lu T, Yao YM, Geng XX (2006) “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 [80].

Theo nghiên cứu của Tian H và các cộng sự (2019) đã nghiên cứu: tác dụng của CGA đối với sự chết theo chương trình ở gan trong xơ gan gây ra bởi CCl<sub>4</sub>. CGA bao gồm Cordyceps sinensis mycelia polysaccharit (hoạt chất chính trong Đông trùng hạ thảo), gypenosides (hoạt chất chính trong giảo cổ lam) và amygdalin (hoạt chất chính trong đào nhân), đã được chứng minh là công thức thành phần hiệu quả trong viên nang Phù Chính Hóa Ứ. Kết quả cho thấy công thức CGA cải thiện xơ hóa gan do CCl<sub>4</sub>, tương quan với sự ức chế của nó đối với sự chết theo chương trình của tế bào gan [76].

#### ***1.4.2. Tình hình nghiên cứu trong nước về các vị thuốc trong bài thuốc CT<sub>HepaB</sub>***

Theo nghiên cứu của Nguyễn Hải Hà và cộng sự (2011), “Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hoá của bài thuốc proteclive (PL) trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng”. Bài thuốc PL có các vị thuốc như Chi tử kết quả bước đầu có tác dụng trong việc bảo vệ tế bào gan [8].

Theo nghiên cứu của Trương Thị Thu Hiền và cộng sự (2018), Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây cà gai leo (*Solanum procumbens* Lour) trên mô hình gây tổn thương gan bằng Paracetamol ở chuột nhắt trắng”.

Kết quả ghi nhận chế phẩm từ cà gai leo có độc tính thấp và có tác dụng bảo vệ tế bào gan [9].

Theo nghiên cứu của Trịnh Thị Xuân Hòa và cộng sự (1999), chế phẩm Haina có chiết xuất từ cà gai leo bước đầu điều trị hiệu quả tốt cho bệnh nhân viêm gan [12].

Theo nghiên cứu của Trịnh Thị Xuân Hòa và cộng sự (2004), bài thuốc Haina chiết xuất từ cà gai leo đã thay đổi các marker virus viêm gan B ở bệnh nhân viêm gan B mạn [13].

Như vậy nghiên cứu tổng quan cho thấy cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu nào tiến hành đánh giá độc tính bán trường diễn và tác dụng bảo vệ tế bào gan của dạng viên nang bài thuốc CT<sub>HepaB</sub>. Do đó đề tài này được tiến hành sẽ giải quyết một phần vấn đề trên.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Chất liệu nghiên cứu

##### 2.1.1. Chế phẩm làm nghiên cứu

###### 2.1.1.1. Viên nang nghiên cứu CT<sub>HepaB</sub>

Viên nang cứng CT<sub>HepaB</sub> bào chế từ bài thuốc CT<sub>HepaB</sub>.

Thành phần liệu dược liệu khô trong bài thuốc CT<sub>HepaB</sub> 100g gồm cà gai leo 30g, cỏ sữa nhỏ lá 20g, chi tử 10g, đại hoàng 05g, đinh lăng 10g, đông trùng hạ thảo 05g, linh chi 10g, hà thủ ô 10g. Từ 100g dược liệu khô của bài thuốc bào chế ra 8 g bột cao khô CT<sub>HepaB</sub>, sau đó đóng vào viên nang cứng CT<sub>HepaB</sub> 400mg dùng đường uống, tương đương 1 thang bài thuốc CT<sub>HepaB</sub> uống trong 2 ngày. Viên nang do Viện Đào tạo Dược – Học Viện Quân Y sản xuất, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Liều dùng được tính theo g bột cao khô trong viên nang/kg/ngày. Liều dự kiến sử dụng trên người là 4g/người/ngày, tương đương uống 10 viên/ ngày mỗi viên hàm lượng 400mg. 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 nhắt với hệ số quy đổi là 12 thì liều dự kiến có tác dụng trên chuột nhắt là 0,96g/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 [6].

###### 2.1.1.2. Thuốc gây mô hình tổn thương và hủy hoại tế bào gan

Effergal (paracetamol) viên sủi 500 mg của hãng Bristol-Myers Squibb (Pháp).

###### 2.1.1.3. Thuốc tham chiếu (chứng dương).

Legalon (silymarin) viên nén 70 mg của hãng MADAUS GmbH (Đức). Thành phần của Legalon là cao khô của quả cây *Silybum marianum* (tương ứng với 70 mg silymarin).

### **2.1.2. Thiết bị máy móc và hóa chất**

- *Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu :*

+ Máy xét nghiệm sinh hoá Biochemical Systems International Srl, Italia, model 3000 Evolution.

+ Máy phân tích huyết học Humancout 30TS, hãng Human, Đức, sử dụng phần mềm phân tích huyết học dành cho chuột thí nghiệm.

+ Máy điện tim Fukuda FX 7102 (Fukuda - Nhật Bản)

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

+ Ống micropipette chuyên dụng để lấy máu hóc mắt.

+ Bộ dụng cụ mô động vật cỡ nhỏ và các dụng cụ thí nghiệm khác.

+ Máy đúc khối nén, máy cắt tiêu bản, kính hiển vi điện tử.

- *Thuốc, hóa chất nghiên cứu*

+ Kit định lượng các enzym và chất chuyển hóa trong máu: ALT (alanin aminotransferase), AST (aspartat aminotranferase), bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol, creatinin và glucose.

+ Hóa chất xét nghiệm huyết học của hãng Human Đức.

+ Hóa chất xét nghiệm sinh hóa của hãng MEDIA, sản xuất tại Italia.

+ Các hóa chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học: hematoxylin- eosin, formon

+ Thuốc Silymarin (biệt dược Legalon) của hãng Madaus (Pháp), loại viên nang 140mg Silymarin.

## **2.2. Đối tượng**

### **2.2.1. Đối tượng nghiên cứu**

#### **2.2.1.1. Đối với nghiên cứu độc tính bán trường diễn**

30 con chuột cống trắng trưởng thành, thuần chủng, cả 2 giống khoẻ mạnh, chủng Wistar.

### *2.2.1.2. Đối với nghiên cứu tác dụng trên mô hình tổn thương và hủy hoại tế bào gan*

50 con chuột nhắt trắng, chủng Swiss, thuần chủng, cả 2 giống, khỏe mạnh, 4-6 tuần tuổi, trọng lượng  $20 \pm 2g$ , chưa sinh sản lần nào, không nuôi con bú.

### **2.2.2. Tiêu chuẩn chọn mẫu**

#### *2.2.2.1. Đối với nghiên cứu độc tính bán trường diễn*

30 chuột cống trắng trưởng thành, thuần chủng cả 2 giống khỏe mạnh, dòng Wistar, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, cân nặng mỗi con tại thời điểm thí nghiệm là 160-180g.

#### *2.2.2.2. Đối với nghiên cứu tác dụng trên mô hình tổn thương và hủy hoại tế bào gan trên thực nghiệm.*

50 con chuột nhắt trắng chủng Swiss thuần chủng cả 2 giống, đạt tiêu chuẩn nghiên cứu, tại thời điểm nghiên cứu mỗi con 6 tuần tuổi, trọng lượng mỗi con  $20 \pm 2g$  chia 4 lô, mỗi lô 10 con.

### **2.3. Địa điểm nghiên cứu**

- Bộ môn dược lý Học viện Quân y
- Học viện y dược học cổ truyền Việt Nam

### **2.4. Thời gian nghiên cứu**

Từ tháng 10 năm 2018 đến tháng 6 năm 2019.

### **2.5. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.5.1. Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của viên nang cứng CTHePaB được xác định trên chuột cống trắng trưởng thành theo đường uống theo quy định và hướng dẫn của Bộ Y tế và hướng dẫn của OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) về đánh giá tính an toàn và hiệu lực của thuốc [37], [38], [40].

Nghiên cứu tác dụng dược lý của viên nang cứng CT<sub>HepaB</sub> trên mô hình tổn thương và hủy hoại tế bào gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng.

### **2.5.2. Cỡ mẫu và cách chọn mẫu**

#### **2.5.2.1. Đối với nghiên cứu độc tính bán trường diễn**

30 chuột cống trắng, chia 3 lô mỗi lô 10 con, được nuôi dưỡng trong phòng nuôi động vật thí nghiệm ít nhất một tuần trước khi tiến hành thí nghiệm.

#### **2.5.2.2. Đối với nghiên cứu tác dụng trên mô hình tổn thương và hủy hoại tế bào gan trên thực nghiệm.**

50 con chuột nhắt trắng chia 4 lô, mỗi lô 10 con, nuôi dưỡng trong phòng nuôi động vật thí nghiệm ít nhất một tuần trước khi tiến hành thí nghiệm.

#### **2.5.2.3. Động vật tham gia nghiên cứu**

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

- Động vật ăn thức ăn theo tiêu chuẩn thức ăn cho động vật nghiên cứu, nước sạch đun sôi để nguội uống tự do. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thí nghiệm

- Chuột được để nhịn ăn 12 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống được cung cấp đầy đủ.

- Điều kiện thử trong môi trường vi khí hậu, nhiệt độ 25°C độ ẩm 80%.

### **2.5.3. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.5.3.1. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của thuốc CT<sub>HepaB</sub> trên thực nghiệm**

Chuột cống trắng khỏe mạnh, đủ tiêu chuẩn thí nghiệm được chia ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con và lấy máu xét nghiệm các chỉ số sinh hóa huyết học, xác định cân nặng của chuột, ghi điện tim.

Sau đó được cho uống thuốc CTHePaB các liều tang dần hoặc nước cất liên tục trong 90 ngày, thể tích cho uống là 10ml/kg/24 h cụ thể:

- Lô chứng sinh lý: uống nước cất.
- Lô trị 1: uống CTHePaB liều 0,56 g/kg/ngày.
- Lô trị 2: uống CTHePaB liều 3,36 g/kg/ngày (gấp 6 lần liều 1).

2.5.3.2. *Đánh giá tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa của viên nang cứng trên mô hình thực nghiệm:*

Chuột nhắt trắng nghiên cứu được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô ít nhất 10 con được thực hiện qua 3 bước:

- Bước 1: Cho chuột uống nước cất (nhóm chứng) hoặc thuốc silymarin (nhóm tham chiếu) hoặc CTHePaB với 2 liều lượng khác nhau (nhóm thuốc nghiên cứu) liên tục 8 ngày.

- Bước 2: Gây tổn thương và hủy hoại tế bào gan chuột bằng: Efferalgan (paracetamol) viên sủi 500 mg liều 400 mg/kg với thể tích 0,2 ml/10g liều duy nhất vào ngày thứ 8, sau uống nước cất, thuốc silymarin và CTHePaB.

- Bước 3: Đánh giá tác dụng của CTHePaB: Lấy máu đo hoạt độ enzym AST, ALT để đánh giá mức độ tổn thương tế gan; lấy gan cân trọng lượng, định lượng MDA dịch đồng thể và quan sát mô bệnh học (đại thể, vi thể) ở cả 5 lô chuột, sau uống paracetamol 48 giờ, cụ thể:

- + Lô 1 (lô chứng): uống nước cất, thể tích 0,2 ml/10 g
- + Lô 2 (mô hình): uống nước cất + uống PAR (Paracetamol) 400mg/kg
- + Lô 3 (tham chiếu): uống silymarin liều 70mg/kg + uống PAR 400mg/kg.
- + Lô 4 (trị 1): uống CTHePaB liều 0,96 g/kg/ngày + uống PAR 400mg/kg.
- + Lô 5 (trị 2): uống CTHePaB liều 1,92 g/kg/ngày + uống PAR 400mg/kg.



Liều dùng được tính theo g bột cao khô trong viên nang/kg/ngày. Từ 10g dược liệu khô của bài thuốc CTHePaB tạo ra 0,8g bột cao khô trong viên nang CTHePaB. Liều dự kiến sử dụng trên người là 4g/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 nhất với hệ số quy đổi là 12 thì liều có tác dụng trên chuột nhất là 0,96g/kg/ngày [6].

Chuột được uống nước cất hoặc silymarin hoặc CTHePaB liên tục trong 8 ngày, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

PAR liều 400 mg/kg với thể tích 0,2 ml/10g liều duy nhất vào ngày thứ 8, sau uống nước cất/thuốc silymarin/ CTHePaB 3 giờ (chuột được nhịn đói 16 - 18 giờ trước đó).

Sau đó tiếp tục cho uống nước cất hoặc thuốc silymarin hoặc CTHePaB liên tục trong thêm 2 ngày nữa, mỗi ngày một lần vào buổi sáng. 48 giờ sau khi uống paracetamol:

Lấy máu đo hoạt độ enzym AST, ALT để đánh giá mức độ tổn thương tế gan [3], [31].

Mổ chuột lấy gan cân trọng lượng, quan sát mô bệnh học (đại thể, vi thể) và nghiền gan tạo dịch đồng thể để định lượng MDA (malondialdehyde)

## **2.6. Các biến số chỉ số trong nghiên cứu**

### **2.6.1. Các biến số chỉ số trong nghiên cứu độc tính bán trường diễn**

Theo dõi tại 3 thời điểm, xuất phát điểm, ngày thứ 45, ngày thứ 90, sau uống thuốc các chỉ số như sau:

- Sinh lý: theo dõi tình trạng chung, da, niêm mạc, sự biến đổi màu sắc, lông, phân, nước tiểu, hoạt động, ăn, uống, cân nặng (g), của chuột (liên tục trong 90 ngày).

- Điện tim ở đạo trình DII: tần số, biên độ, song bất thường T, PQ, ST

- Huyết học: số lượng hồng cầu (T/l), hàm lượng huyết sắc tố (g/dL), hematocrit (%), thể tích trung bình hồng cầu (g/L), số lượng bạch cầu (G/l), số lượng tiểu cầu(G/l) trong máu chuột.

- Sinh hóa: nồng độ enzym AST, ALT (UI/l) trong máu, bilirubin (umol/l) toàn phần, bilirubin trực tiếp, creatinin máu (umol/l), albumin huyết tương (g/l), cholesterol toàn phần (mmol/l), trong máu chuột.

Vào ngày thứ 90 khi kết thúc thí nghiệm tiến hành theo dõi:

- Mô bệnh học: quan sát hình ảnh đại thể các tạng (tập trung quan sát đánh giá các tạng gan, lách, thận) .

- Sau đó làm sinh thiết các tạng gan, lách, thận các tạng của chuột nghiên cứu thực nghiệm để xem tổn thương về mặt vi thể.

Như vậy:

Thời điểm xét nghiệm: lấy máu xét nghiệm các chỉ số sinh hóa, huyết học, xác định cân nặng của chuột, ghi điện tim tại 3 thời điểm: xuất phát điểm, ngày 45, ngày 90 sau uống thuốc.

Thời gian theo dõi: 90 ngày

### **2.6.2. Các biến số chỉ số trong nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào gan.**

Hoạt độ enzym AST, ALT: chuột được gây mê giải phẫu lấy máu ở tim để xác định hàm lượng enzyme aspartate transaminase (AST) và alanine aminotransferase (ALT) trong huyết thanh, máu chuột thí nghiệm được đo hoạt độ enzyme ALT và AST bằng máy xét nghiệm sinh hóa Biochemical Systems International Srl, Italia, model 3000 Evolution, để đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan chuột thực nghiệm.

Hàm lượng MDA gan chuột: gan chuột được xử lý và tiến hành định lượng malondialdehyde (MDA) theo phương pháp của Ohkawa *et al.* (1979) và Moron *et al.* (1979) được hiệu chỉnh theo Nguyễn Bảo Trân và ctv. (2011). Gan chuột được tách ra khỏi cơ thể và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm

KCl 1,15% ở nhiệt độ 4°C. Dịch đồng thể gan gồm 1 mL được trộn với 0,5 mL dung dịch đệm phosphate 25 mM (pH = 7,4) và ủ ở 37°C trong 60 phút. Phản ứng sau khi được kết thúc bằng 0,5 mL acid tricloacetic 10% được ly tâm 13000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C. Phần dịch lỏng sau khi ly tâm được sử dụng để xác định hàm lượng MDA. Hàm lượng malondialdehyde (MDA) được xác định như sau: Lấy 1 mL dịch ly tâm cho phản ứng với 0,5 mL thiobarbituric 0,8% ở 100°C trong 30 phút và đo mật độ quang ở bước sóng 532 nm. Hàm lượng MDA (nM/g) được tính dựa theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn MDA.

Trọng lượng tương đối của gan trung bình của từng lô chuột thực nghiệm: sau thí nghiệm toàn bộ chuột được mổ để thu nhận gan và được xác định khối lượng gan tương đối theo phương pháp Girish và đồng tác giả (2009) [85].

Hình ảnh đại thể và vi thể của gan trung bình của từng lô chuột thực nghiệm.

| Trung bình nhóm chứng- TB nhóm can thiệp|

$$\text{Chỉ số hiệu quả(\% giảm)} = \frac{\text{Trung bình nhóm chứng}}{\text{Trung bình nhóm chứng}} \times 100\%$$

## 2.7. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 16.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

Sử dụng thuật toán: tính tỷ lệ phần trăm (%), tính số trung bình ( ), tính độ lệch chuẩn (SD). Student - t test: so sánh sự khác nhau giữa hai giá trị trung bình.

## 2.8. Sai số và cách khống chế sai số

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

## **2.9. Đạo đức nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích xác định độc tính bán trường diễn và tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang cứng CTHePaB trên thực nghiệm nhằm mục đích góp phần xác định tính an toàn của viên nang CThepaB ngoài ra không có bất cứ mục đích nào khác.

Nghiên cứu đã được thông qua bởi Hội đồng khoa học của Học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam.

Các số liệu thu thập trong nghiên cứu là hoàn toàn trung thực, có độ tin cậy và chính xác.

### Chương 3

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn của viên nang CT<sub>HepaB</sub>

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của viên nang CT<sub>HepaB</sub> lên tình trạng chung và sự thay đổi khối lượng của chuột cống trắng khi dùng dài ngày

##### 3.1.1.1. Tình trạng chung

Chuột cống trắng được theo dõi hàng ngày về tình trạng chung gồm hoạt động, ăn uống, tình trạng lông, da, niêm mạc, chất tiết. Các chuột ở cả lô chứng và các lô dùng viên nang CT<sub>HepaB</sub> đều hoạt động bình thường: Chuột lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn, uống bình thường, phân thành khuôn.

##### 3.1.1.2. Sự thay đổi khối lượng chuột

**Bảng 3.1. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> đối với khối lượng cơ thể chuột**

Lô NC	Thời điểm xét nghiệm						p
	Trước thí nghiệm		Sau 45 ngày		Sau 90 ngày		
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	
<b>Lô chứng (1)</b>	10	169,50±4,40	10	211,50±5,80	10	211,50±5,80	< 0,05
<b>Lô trị 1 (2)</b>	10	167,10±3,70	10	210,20±8,23	10	210,20±8,23	< 0,05
<b>Lô trị 2 (3)</b>	10	168,60±5,89	10	211,30±6,48	10	211,30±6,48	< 0,05
p		$p_{2-1} > 0,05$		$p_{2-1} > 0,05$		$p_{2-1} > 0,05$	
		$p_{3-2} > 0,05$		$p_{3-2} > 0,05$		$p_{3-2} > 0,05$	
		$p_{3-1} > 0,05$		$p_{3-1} > 0,05$		$p_{3-1} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.1 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:
  - + Trước thí nghiệm, sau 45 ngày, sau 90 ngày, khối lượng cơ thể chuột ở lô trị 1 và trị 2 là lô dùng thuốc CTHePaB so với lô chứng sinh lý không dùng CTHePaB, không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).
- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu
  - + Thời điểm sau 45 ngày và 90 ngày thí nghiệm với trước thí nghiệm giữa các lô chứng sinh lý không dùng CTHePaB và các lô trị 1, trị 2 dùng CTHePaB thấy khối lượng cơ thể chuột đều tăng có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. Ảnh hưởng của CTHePaB lên điện tim chuột ở đạo trình DII

**Bảng 3.2. Ảnh hưởng đến điện tim chuột**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Tần số tim (CK/phút, <math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	493,90 $\pm$ 15,64	489,10 $\pm$ 14,81	494,10 $\pm$ 16,01	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	489,60 $\pm$ 12,14	486,00 $\pm$ 11,96	491,30 $\pm$ 15,34	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	486,40 $\pm$ 10,28	489,50 $\pm$ 9,65	494,20 $\pm$ 12,90	$p_{3-1} > 0,05$
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
<b>Biên độ (mV, <math>\bar{x} \pm SD</math>)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	0,318 $\pm$ 0,041	0,317 $\pm$ 0,029	0,314 $\pm$ 0,037	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	0,319 $\pm$ 0,037	0,318 $\pm$ 0,033	0,315 $\pm$ 0,021	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	0,316 $\pm$ 0,032	0,315 $\pm$ 0,036	0,313 $\pm$ 0,034	$p_{3-1} > 0,05$
p	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-
<b>Sóng bất thường</b>	Không	Không	Không	-

Kết quả bảng 3.2 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau trong cùng một thời điểm thí nghiệm, tần số và biên độ của điện tim chuột ở đạo trình DII không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, tần số và biên độ của điện tim chuột ở đạo trình DII không có sự thay đổi ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

- Không có sóng bất thường trên điện tim ở đạo trình DII của các lô chuột tại các thời điểm nghiên cứu.

### 3.1.3. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> đến một số chỉ tiêu huyết học chuột

#### 3.1.3.1. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> lên chỉ số hồng cầu chuột

**Bảng 3.3. Số lượng hồng cầu ở các lô chuột nghiên cứu**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Số lượng hồng cầu chuột (T/L)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	5,72 ± 0,62	5,89 ± 0,86	6,03 ± 0,52	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	5,79 ± 0,61	6,04 ± 0,46	6,08 ± 0,76	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	5,85 ± 0,50	6,01 ± 0,74	6,10 ± 0,54	$p_{3-1} > 0,05$
<b>p</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05; p_{c-a} > 0,05$			-

Kết quả bảng 3.3 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:

Trước thí nghiệm, sau 45 ngày, sau 90 ngày, số lượng hồng cầu chuột ở lô chứng sinh lý không dùng CT<sub>HepaB</sub> so với lô trị 1 và trị 2 là lô dùng thuốc CT<sub>HepaB</sub> có sự thay đổi nhưng không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

Thời điểm sau thí nghiệm 90 ngày và 45 ngày với trước thí nghiệm giữa các lô chứng sinh lý không dùng CT<sub>HepaB</sub> và các lô trị 1, trị 2 dùng CT<sub>HepaB</sub> thấy số lượng hồng cầu không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.3.2. Ảnh hưởng của CTHepaB lên chỉ số huyết sắc tố chuột

**Bảng 3.4. Hàm lượng huyết sắc tố ở các lô chuột nghiên cứu**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột (g/dL)</b>				
<b>Trước TN</b>	107,90±9,71	106,50±13,30	110,80±9,74	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày</b>	110,30±12,36	109,20± 8,98	111,60±10,37	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày</b>	109,20± 9,34	111,30±10,61	112,80±15,29	$p_{3-1} > 0,05$
<b>p</b>	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Kết quả bảng 3.4 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:

Trước thí nghiệm, sau 45 ngày, sau 90 ngày, hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột ở lô chứng sinh lý không dùng CTHepaB so với lô trị 1 và trị 2 là lô dùng thuốc CTHepaB có sự thay đổi nhưng không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

Thời điểm sau thí nghiệm 45 ngày và 90 ngày so với trước thí nghiệm giữa các lô chứng sinh lý không dùng CTHepaB và các lô trị 1, trị 2 dùng CTHepaB thấy hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.3.3. Ảnh hưởng của CTHepaB lên chỉ số hematocrit chuột

**Bảng 3.5. Chỉ số hematocrit ở các lô chuột nghiên cứu**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Hematocrit (%)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	31,88 ±2,60	31,95 ± 3,69	31,29 ±3,01	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	31,29 ±3,07	31,54 ± 3,05	31,61 ±3,19	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	31,67 ±3,03	31,99 ± 3,06	31,72 ±2,55	$p_{3-1} > 0,05$
<b>P</b>	$p_{b-a} > 0,05, p_{c-a} > 0,05, p_{c-b} > 0,05$			-



Kết quả bảng 3.5 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:

Trước thí nghiệm, sau 45 ngày, sau 90 ngày hàm lượng hematocrit trong máu chuột ở lô chứng sinh lý không dùng CTHepaB so với lô trị 1 và trị 2 là lô dùng thuốc CTHepaB có sự thay đổi nhưng không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

Thời điểm sau thí nghiệm 90 ngày và 45 ngày so với trước thí nghiệm giữa các lô chứng sinh lý không dùng CTHepaB và các lô trị 1, trị 2 dùng CTHepaB thấy hàm lượng hematocrit trong máu chuột không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

#### 3.1.3.4. Ảnh hưởng của CTHepaB lên chỉ số thể tích trung bình hồng cầu chuột

**Bảng 3.6. Chỉ số thể tích trung bình hồng cầu ở các lô chuột NC**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Thể tích trung bình hồng cầu (fL)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	55,70± 2,11	55,60± 4,09	55,40± 2,27	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	56,40± 2,80	56,20± 4,26	55,80± 2,49	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	56,10± 2,85	55,90± 2,96	56,60± 3,41	$p_{3-1} > 0,05$
<b>P</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Kết quả bảng 3.6 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:

Trước thí nghiệm, sau 45 ngày, sau 90 ngày, thể tích trung bình hồng cầu chuột ở lô chứng sinh lý không dùng CTHepaB so với lô trị 1 và trị 2 là lô dùng thuốc CTHepaB có sự thay đổi nhưng không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

Thời điểm sau thí nghiệm 90 ngày và 45 ngày so với trước thí nghiệm giữa các lô chứng sinh lý không dùng CTHepaB và các lô trị 1, trị 2 dùng CTHepaB thấy thể tích trung bình hồng cầu chuột không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.3.5. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> lên số lượng bạch cầu chuột

**Bảng 3.7. Số lượng bạch cầu ở các lô chuột nghiên cứu**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Số lượng bạch cầu (G/L)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	8,15 ± 1,46	8,25 ± 1,61	8,19 ± 1,81	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	8,18 ± 1,39	8,23 ± 2,10	8,24 ± 1,58	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	8,21 ± 1,22	8,26 ± 2,02	8,30 ± 1,53	$p_{3-1} > 0,05$
<b>P</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Kết quả bảng 3.7 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng 1 thời điểm nghiên cứu:

Trước thí nghiệm, sau 45 ngày, sau 90 ngày, số lượng bạch cầu chuột ở lô chứng sinh lý không dùng CT<sub>HepaB</sub> so với lô trị 1 và trị 2 là lô dùng thuốc CT<sub>HepaB</sub> có sự thay đổi nhưng không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

Thời điểm sau thí nghiệm 90 ngày và 45 ngày so với trước thí nghiệm giữa các lô chứng sinh lý không dùng CT<sub>HepaB</sub> và các lô trị 1, trị 2 dùng CT<sub>HepaB</sub> thấy số lượng bạch cầu chuột không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.3.6. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> lên số lượng tiểu cầu chuột

**Bảng 3.8. Số lượng tiểu cầu ở các lô chuột nghiên cứu**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Số lượng tiểu cầu (G/L)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	395,20±123,26	396,60±138,35	407,70±109,75	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	392,90±121,04	408,30± 167,37	390,60 ±131,43	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	418,10±134,43	421,50 ±105,91	415,90± 117,07	$p_{3-1} > 0,05$
<b>P</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Kết quả bảng 3.8 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng 1 thời điểm nghiên cứu:

Trước thí nghiệm, sau 45 ngày, sau 90 ngày, số lượng tiểu cầu chuột ở lô chứng sinh lý không dùng CTHePaB so với lô trị 1 và trị 2 là lô dùng thuốc CTHePaB có sự thay đổi nhưng không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

Thời điểm sau thí nghiệm 90 ngày và 45 ngày so với trước thí nghiệm giữa các lô chứng sinh lý không dùng CTHePaB và các lô trị 1, trị 2 dùng CTHePaB thấy số lượng tiểu cầu chuột không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.4. Ảnh hưởng của CTHePaB lên chức năng gan, thận chuột thực nghiệm

#### 3.1.4.1. Ảnh hưởng của CTHePaB lên chức năng gan chuột thực nghiệm

#### Ảnh hưởng của CTHePaB lên enzym gan chuột thực nghiệm

**Bảng 3.9. Nồng độ enzym AST, ALT của các lô chuột**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Hoạt độ AST (UI/l)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	79,90±16,26	81,90±12,76	81,10±16,41	$p_{2,3-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	81,80±12,55	77,90± 12,37	73,50±15,29	
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	82,50±23,23	76,10± 13,17	71,40±14,65	
<b>p</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-
<b>Hoạt độ ALT (UI/l)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	58,90± 9,94	60,40± 8,66	58,50± 11,28	$p_{2,3-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	60,60± 15,32	56,10± 12,26	53,20± 12,48	
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	59,20± 12,80	54,10± 13,01	50,70± 8,56	
<b>p</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Kết quả bảng 3.9 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng 1 thời điểm nghiên cứu:

+ Trước thí nghiệm hoạt độ AST và ALT ở lô trị 1 và trị 2 là lô dùng thuốc CTHepaB so với lô chứng sinh lý không dùng CTHepaB có sự thay đổi nhưng không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ) lần lượt là (81,90 UI/l và 60,40UI/l) và (81,10UI/l và 58,50UI/l) so với (79,90 UI/l và 58,90 UI/l).

+ Sau 45 ngày, sau 90 ngày, thí nghiệm: hoạt độ các enzym AST, ALT ở hai lô dùng CTHepaB trị 1 và trị 2 có giảm hơn so với lô chứng sinh lý, trong đó lô dùng liều cao trị 2 có xu hướng giảm rõ hơn so với lô dùng liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong cùng 1 lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

+ Lô chứng sinh lý: hoạt độ các enzym AST, ALT trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

+ Lô trị 1 và trị 2 dùng CTHepaB: hoạt độ các enzym AST, ALT trong máu chuột tại các thời điểm sau 90 ngày và 45 ngày giảm hơn, tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê so với thời điểm ban đầu ( $p > 0,05$ ).

### **Ảnh hưởng CTHepaB lên Bilirubin toàn phần chuột thực nghiệm**

**Bảng 3.10. Nồng độ bilirubin toàn phần của các lô chuột**

<b>Thời điểm XN</b>	<b>Lô chứng (1)</b>	<b>Lô trị 1 (2)</b>	<b>Lô trị 2 (3)</b>	<b>p</b>
<b>Bilirubin toàn phần (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	77,20 $\pm$ 18,59	76,10 $\pm$ 17,95	75,60 $\pm$ 16,73	$p_{2,3-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	79,10 $\pm$ 15,57	70,30 $\pm$ 15,31	66,10 $\pm$ 15,10	
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	80,30 $\pm$ 21,82	69,20 $\pm$ 13,59	64,10 $\pm$ 15,56	
<b>p</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Kết quả bảng 3.10 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:
  - + Trước thí nghiệm: chỉ số bilirubin TP trong máu chuột giữa các lô không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).
  - + Tại các thời điểm sau 45 ngày và sau 90 ngày uống thuốc: chỉ số bilirubin TP ở hai lô dùng CTHePaB trị 1 và trị 2 có giảm hơn so với lô chứng sinh lý, trong đó lô dùng liều cao trị 2 có xu hướng giảm rõ hơn so với lô dùng liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
  - So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:
    - + Ở lô chứng sinh lý, chỉ số bilirubin TP trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
    - + Ở hai lô dùng CTHePaB trị 1 và trị 2, chỉ số bilirubin TP trong máu tại các thời điểm sau giảm hơn, tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê so với thời điểm ban đầu ( $p > 0,05$ ).

### **Ảnh hưởng CTHePaB lên albumin huyết tương chuột thực nghiệm**

**Bảng 3.11. Ảnh hưởng của viên nang CTHePaB lên các chỉ số albumin huyết tương trong máu.**

<b>Thời điểm XN</b>	<b>Lô chứng (1)</b>	<b>Lô trị 1 (2)</b>	<b>Lô trị 2 (3)</b>	<b>p</b>
<b>Albumin huyết tương (g/l)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	35,60 ± 2,59	35,40 ± 2,55	35,80 ± 2,62	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	35,90 ± 2,88	35,70 ± 2,00	36,20 ± 1,81	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	36,10 ± 2,02	36,00 ± 1,94	36,40 ± 2,17	$p_{3-1} > 0,05$
<b>p</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Kết quả bảng 3.11 cho thấy

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:
  - Trước thí nghiệm, sau 45 ngày và sau 90 ngày uống thuốc: chỉ số albumin huyết tương ở hai lô dùng CTHePaB trị 1 và trị 2 có thay đổi nhưng chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

Lô chứng sinh lý, hai lô dùng CTHePaB trị 1 và trị 2, chỉ số albumin huyết tương trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### 3.1.4.2. Ảnh hưởng của CTHePaB lên chức năng thận chuột thực nghiệm

**Bảng 3.12. Ảnh hưởng của viên nang CTHePaB lên chỉ số creatinin trong máu chuột.**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Creatinin (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>				
<b>Trước TN (a)</b>	76,60 $\pm$ 9,69	75,50 $\pm$ 12,00	75,20 $\pm$ 11,54	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày (b)</b>	75,90 $\pm$ 11,95	73,10 $\pm$ 15,93	71,90 $\pm$ 12,97	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày (c)</b>	77,10 $\pm$ 12,64	72,50 $\pm$ 11,37	71,30 $\pm$ 10,74	$p_{3-1} > 0,05$
<b>p</b>	$p_{b-a} > 0,05; p_{c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Kết quả bảng 3.12 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:

Trước thí nghiệm, sau 45 ngày và sau 90 ngày uống thuốc: chỉ số creatinin ở hai lô dùng CTHePaB trị 1 và trị 2 có thay đổi nhưng chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:

Lô chứng sinh 1, hai lô dùng CTHePaB trị 1 và trị 2, chỉ số creatinin trong máu có thay đổi tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê so với thời điểm ban đầu ( $p > 0,05$ ).

3.1.4.3. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> lên nồng độ cholesterol toàn phần máu chuột thực nghiệm

**Bảng 3.13. Ảnh hưởng của viên nang CT<sub>HepaB</sub> lên nồng độ cholesterol toàn phần máu chuột sau**

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	p
<b>Cholesterol toàn phần (mmol/l)</b>				
<b>Trước TN</b>	1,79 ± 0,76	1,71 ± 0,54	1,83 ± 0,48	$p_{2-1} > 0,05$
<b>Sau 45 ngày</b>	1,77 ± 0,71	1,50 ± 0,57	1,47 ± 0,64	$p_{3-2} > 0,05$
<b>Sau 90 ngày</b>	1,69 ± 0,70	1,42 ± 0,47	1,41 ± 0,63	$p_{3-1} > 0,05$
<b>p</b>	> 0,05	> 0,05	> 0,05	-

Kết quả bảng 3.13 cho thấy:

- So sánh các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu:
  - + Trước thí nghiệm: chỉ số cholesterol TP trong máu chuột giữa các lô không có sự khác biệt ( $p > 0,05$ ).
  - + Tại thời điểm sau 45, sau 90 ngày uống thuốc: chỉ số cholesterol TP ở hai lô dùng CT<sub>HepaB</sub> trị 1 và trị 2 có xu hướng giảm khi so sánh với lô chứng sinh lý, và lô dùng liều cao trị 2 giảm rõ hơn so với lô dùng liều thấp trị 1 nhưng chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
- So sánh trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu:
  - + Ở lô chứng sinh lý, chỉ số cholesterol TP trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).
  - + Ở hai lô dùng CT<sub>HepaB</sub> trị 1 và trị 2, chỉ số cholesterol TP trong máu có xu hướng giảm khi so sánh giữa thời điểm sau 45 ngày và 90 ngày dùng thuốc CT<sub>HepaB</sub> và thời điểm trước thí nghiệm tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### **3.1.5. Đại thể và mô bệnh học gan, thận và lách của chuột thí nghiệm**

#### **3.1.5.1. Kết quả đại thể các tạng (gan, lách, thận) của chuột thí nghiệm.**

Quan sát đại thể bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần thấy: màu sắc, hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng viên nang CTHePaB không khác so với chúng.



**Hình 3.1. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô chứng (chuột 03, lô chứng)**



**Hình 3.2. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 1 (chuột 12, lô trị 1)**



**Hình 3.3. Hình ảnh đại thể gan, lách, thận chuột lô trị 2 (chuột 24, lô trị 1)**

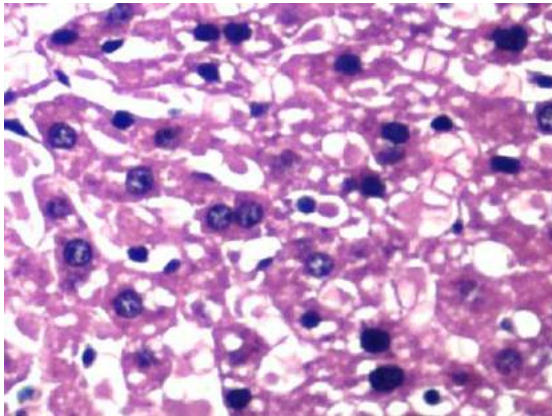
Kết quả hình 3.1; 3.2 và 3.3 cho thấy: Hình ảnh đại thể các tạng gan, lách, thận của chuột ở các lô trị 1 (hình 3.2), lô trị 2 (hình 3.3), là các lô cho uống viên nang CTHePaB, có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống, không khác biệt so với hình ảnh gan, lách, thận của chuột ở lô chứng (hình 3.1)



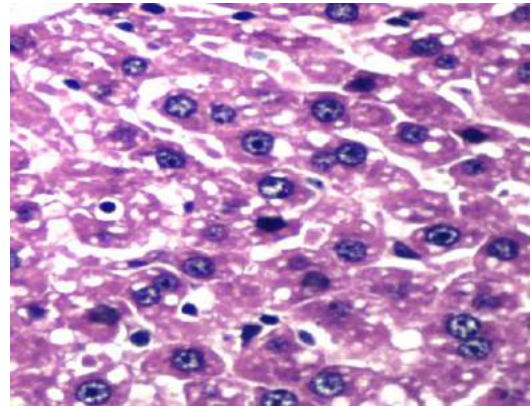
***Kết quả mô bệnh học các tạng (gan, lách, thận) của chuột thí nghiệm.***

Các tiêu bản mô bệnh học đọc tại khoa hình thái giải phẫu bệnh, bệnh viện 103. Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cho thấy viên nang CTHepaB dùng đường uống với liều 0,94g viên nang/kg/ngày và liều 4,70g viên nang/kg/ngày liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột. Hình ảnh vi thể gan, lách, thận của các chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu được trình bày ở các ảnh dưới đây.

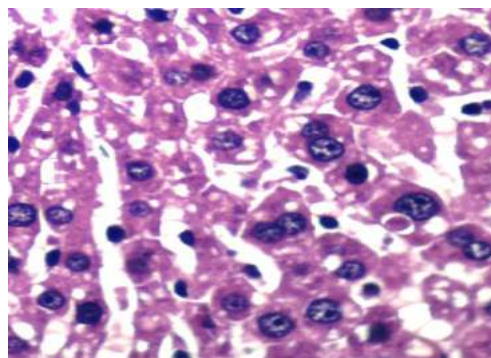
**Hình ảnh mô bệnh học gan chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu**



***Hình 3.4. Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng (chuột 6, lô chứng).***



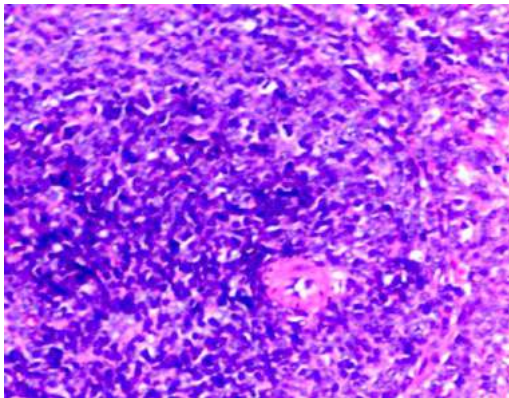
***Hình 3.5. Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 1 (chuột 15, lô trị 1).***



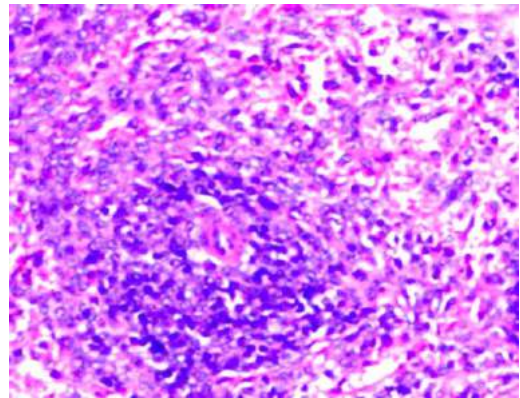
***Hình 3.6. Hình ảnh vi thể gan chuột lô trị 2 (chuột 26, lô trị 2)***

*Kết quả hình 3.4;3.5 và 3.6 cho thấy:* Hình ảnh vi thể gan dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (Hình 3.5) và lô trị 2 (Hình 3.6), là các lô cho uống viên nang CTHepaB, không khác biệt so với hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng (Hình 3.4). Trên hình ảnh không thấy ở xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.

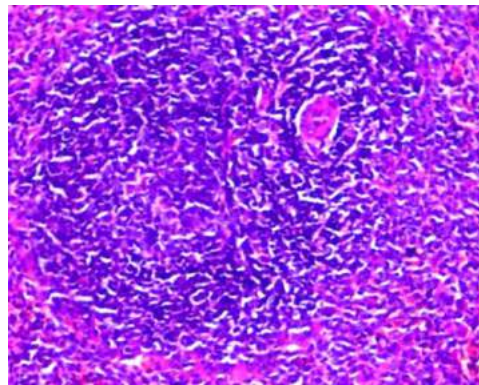
**Hình ảnh mô bệnh học lách chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu**



**Hình 3.7. Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng (chuột 5, lô chứng).**



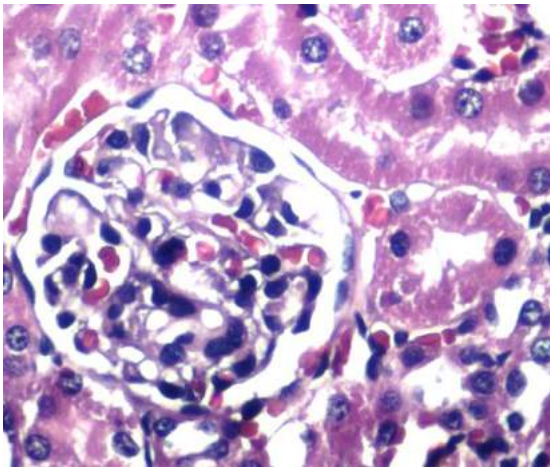
**Hình 3.8. Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 1 (chuột 11, lô trị 1).**



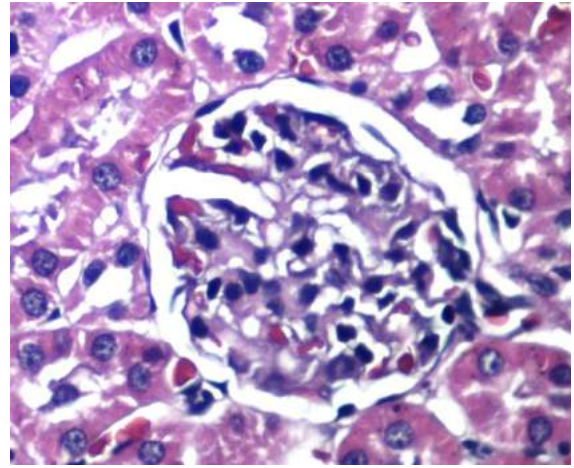
**Hình 3.9. Hình ảnh vi thể lách chuột lô trị 2 (chuột 22, lô trị 2).**

*Kết quả hình 3.7, 3.8 và 3.9 cho thấy:* Hình ảnh vi thể lách dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (Hình 3.8) và lô trị 2 (Hình 3.9), là các lô cho uống viên nang CTHepaB, không khác biệt so với hình ảnh vi thể lách chuột ở lô chứng (Hình 3.7). Trên hình ảnh thấy vùng tủy trắng bất màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn. Vùng tủy đỏ có màu xanh đỏ, với các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào. Không thấy ở xuất huyết hoặc hoại tử.

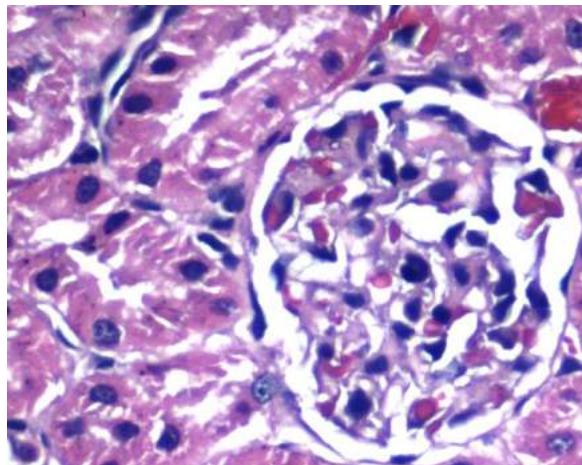
**Hình ảnh mô bệnh học thận chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu**



**Hình 3.10. Hình ảnh vi thể thận chuột lô chứng (chuột 8, lô chứng).**



**Hình 3.11. Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 1 (chuột 16, lô trị 1).**



**Hình 3.12. Hình ảnh vi thể thận chuột lô trị 2 (chuột 24, lô trị 2).**

*Kết quả ảnh:* Hình ảnh vi thể thận dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (Hình 3.11) và lô trị 2 (Hình 3.12), là các lô cho uống viên nang CT<sub>HepaB</sub>, không khác biệt so với hình ảnh vi thể thận chuột ở lô chứng (Hình 3.10). Cấu trúc các vùng chức năng thận bình thường.

### 3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa của viên nang cứng trên mô hình thực nghiệm

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> trên khối lượng gan tương đối chuột nhắt trắng

**Bảng 3.14. Ảnh hưởng của viên nang CT<sub>HepaB</sub> lên trọng lượng tương đối của gan.**

Lô nghiên cứu	Trọng lượng tương đối của gan (g/10g cơ thể)	% giảm so với (2)
Lô chứng (1)	0,43 ± 0,08	-
Mô hình (2)	0,66 ± 0,11	-
Tham chiếu (3)	0,51 ± 0,12	22,42
Trị 1 (4)	0,49 ± 0,10	26,21
Trị 2 (5)	0,47 ± 0,09	29,09
<i>p</i>	$p_{1,3,4,5-2} < 0,01$ ; $p_{3,4,5-1} > 0,05$ ; $p_{4,5-3} > 0,05$ ; $p_{4-5} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.14 cho thấy:

- So với lô chứng (không gây độc), trọng lượng tương đối của gan ở lô mô hình tăng cao có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

- So với lô mô hình, trọng lượng tương đối của gan ở các lô gây độc có dùng thuốc (lô 3 đến lô 5) đều giảm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p_{3,4,5-2} < 0,01$ ). Silymarin, CT<sub>HepaB</sub> (cả 2 mức liều) thể hiện rõ tác dụng làm giảm mức độ viêm của gan gây ra do Paracetamol.

- Trọng lượng tương đối của gan ở các lô dùng CT<sub>HepaB</sub> giảm hơn nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê so với lô dùng Silymarin liều 67mg/kg/24h ( $p > 0,05$ ).

- Chỉ số gan ở lô dùng CT<sub>HepaB</sub> liều cao giảm hơn so với lô dùng liều thấp nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.2. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> lên hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh chuột

**Bảng 3.15. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> lên hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh của các nhóm chuột nghiên cứu**

Lô nghiên cứu	AST		ALT	
	Hoạt độ (IU/l)	% giảm so với (2)	Hoạt độ (IU/l)	% giảm so với (2)
Lô chứng (1)	42,60 ± 16,91	-	53,90 ± 11,52	-
Mô hình (2)	80,20 ± 11,20	-	98,50 ± 14,46	-
Tham chiếu (3)	56,10 ± 11,69	30,05	64,50 ± 12,66	34,52
Trị 1 (4)	50,30 ± 10,15	37,28	59,40 ± 8,04	39,70
Trị 2 (5)	48,80 ± 10,48	39,15	56,30 ± 10,07	42,84
<i>p</i>	$p_{1,3,4,5-2} < 0,01$ ; $p_{3,4,5-1} > 0,05$ ; $p_{4,5-3} > 0,05$ ; $p_{4-5} > 0,05$			

Kết quả bảng 3.15 cho thấy:

- So với lô chứng (không gây độc), hoạt độ các enzym gan AST và ALT ở lô mô hình tăng cao có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

- So với lô mô hình, hoạt độ enzym ở các lô gây độc có dùng thuốc (lô 3 đến lô 5) đều giảm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ). Silymarin, CT<sub>HepaB</sub> (cả 2 mức liều) thể hiện rõ tác dụng bảo vệ tế bào gan, làm giảm mức độ hủy hoại tế bào gan gây ra do Paracetamol.

- Nồng độ AST và ALT ở các lô dùng CT<sub>HepaB</sub> giảm hơn nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê so với lô dùng Silymarin liều 67mg/kg/24h ( $p > 0,05$ ).

- Nồng độ AST và ALT ở lô dùng CT<sub>HepaB</sub> liều cao giảm hơn so với lô dùng liều thấp nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> lên hàm lượng MDA trong gan chuột nhắt trắng.

**Bảng 3.16. Ảnh hưởng của CT<sub>HepaB</sub> đến hàm lượng MDA ở gan chuột gây độc.**

Lô nghiên cứu	Hàm lượng MDA (mmol/g tổ chức)	% giảm so với (2)
Lô chứng (1)	7,66 ± 1,93	-
Mô hình (2)	13,95 ± 3,52	-
Tham chiếu (3)	9,42 ± 2,34	32,51
Trị 1 (4)	8,83 ± 2,02	36,74
Trị 2 (5)	8,39 ± 1,83	39,89
<i>p</i>	$p_{1,3,4,5-2} < 0,01$ ; $p_{3,4,5-1} > 0,05$ ; $p_{4,5-3} > 0,05$ ; $p_{4-5} > 0,05$	

Kết quả bảng 3.16 cho thấy:






- So với lô chứng (không gây độc), hàm lượng MDA gan chuột ở lô mô hình tăng cao có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

- So với lô mô hình, hàm lượng MDA gan chuột ở các lô gây độc có dùng thuốc (silymarin, CT<sub>HepaB</sub> cả 2 mức liều) đều giảm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

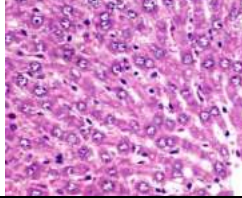
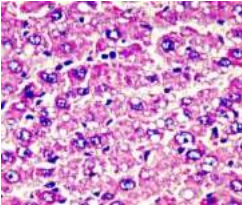
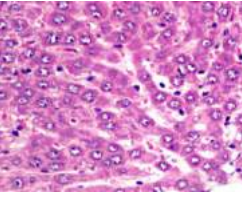
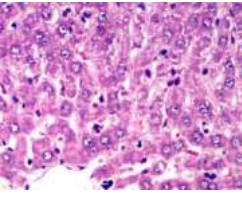
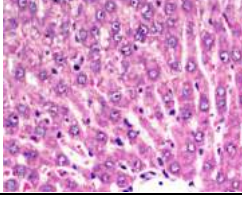
- Hàm lượng MDA gan chuột ở các lô dùng CT<sub>HepaB</sub> giảm hơn nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê so với lô dùng Silymarin liều 67mg/kg/24h ( $p > 0,05$ ).

- Hàm lượng MDA gan chuột ở lô dùng CT<sub>HepaB</sub> liều cao giảm hơn so với lô dùng liều thấp nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Đánh giá về đại thể và vi thể gan chuột sau 8 ngày uống thuốc**  
**Bảng 3.17. Tóm tắt nhận xét về đại thể gan của các nhóm chuột đánh giá**  
**tác dụng bảo vệ gan của viên nang cứng CTHePaB**

<b>Lô NC</b>	<b>Đại thể</b>	<b>Hình ảnh</b>
<b>Lô 1: Lô chứng Nước cất</b>	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết	 Hình 3.13 Lô chứng, chuột 05
<b>Lô 2: Mô hình Nước cất + PAR</b>	Gan nhạt màu, phù nề, sung huyết.	 Hình 3.14 Lô mô hình, chuột 12
<b>Lô 3: Tham chiếu Silymarin 67mg/kg/24h + PAR</b>	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết	 Hình 3.15 Lô tham chiếu, chuột 26
<b>Lô 4: Trị 1 CTHePaB 0,96 g/kg/ngày + PAR</b>	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết	 Hình 3.16 Lô trị 1, chuột 34
<b>Lô 5: Trị 2 CTHePaB 1,92 g/kg/ngày + PAR</b>	Gan màu đỏ, mặt nhẵn, mật độ mềm, không phù nề, không sung huyết	 Hình 3.17 Lô trị 2, chuột 42

**Bảng 3.18. Tóm tắt nhận xét về vi thể gan của các nhóm chuột đánh giá tác dụng bảo vệ gan của viên nang cứng CTHePaB**

Lô nghiên cứu	Hình ảnh vi thể		Vi thể
<b>Lô 1: Lô chứng</b> Nước cất		<b>Hình 3.18 Lô chứng, chuột 2</b>	Các mẫu bệnh phẩm có cấu trúc gan bình thường.
<b>Lô 2: Mô hình</b> Nước cất + PAR		<b>Hình 3.19 Lô mô hình, chuột 14</b>	Các mẫu bệnh phẩm gan có xâm nhập viêm, thoái hóa nhẹ.
<b>Lô 3: Tham chiếu</b> Silymarin 67mg/kg/24h + PAR		<b>Hình 3.20 Lô Silymarin, chuột 27</b>	Các mẫu bệnh phẩm có cấu trúc gan bình thường.
<b>Lô 4: Trị 1</b> CTHEPAB 0,96 g/kg/ngày + PA R		<b>Hình 3.21 Lô trị 2 chuột 36</b>	Các mẫu bệnh phẩm có cấu trúc gan bình thường.
<b>Lô 5: Trị 2</b> CTHEPAB 1,92 g/kg/ngày + PAR		<b>Hình 3.22 Lô trị 2, chuột 45,</b>	Các mẫu bệnh phẩm có cấu trúc gan bình thường.



## **Chương 4**

### **BÀN LUẬN**

Thuốc y học cổ truyền Việt Nam đã có lịch sử tồn tại và phát triển từ hàng ngàn năm nay. Thuốc đông y, thuốc từ dược liệu dễ dàng được đón nhận nhờ vào bề dày lịch sử cũng như người dân tin rằng thuốc YHCT bảo chế từ thảo dược sẽ ít có tác dụng phụ hơn so với thuốc tây. Hiện nay nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam thường sử dụng thuốc đông y để điều trị. Y học cổ truyền có nhiều bài thuốc hay, nhiều vị thuốc quý có tác dụng dự phòng và hỗ trợ điều trị bệnh viêm gan B. Bài thuốc CTHeptaB gồm 8 dược liệu quý là Cà gai leo, Cỏ sữa nhỏ lá, Chi tử, Đại hoàng, Đinh lăng, Đông trùng hạ thảo, Linh chi, Hà thủ ô, được học viện Y dược học cổ truyền Việt Nam đúc rút từ lý luận y học cổ truyền, lâm sàng và thực tiễn điều trị của PGS.TS Đậu Xuân Cảnh trong điều trị các bệnh viêm gan, xơ gan đạt hiệu quả tốt. Một số công trình nghiên cứu trên thực nghiệm, trên lâm sàng của các vị thuốc trong bài thuốc đã chứng minh có tác dụng bảo vệ, phục hồi tế bào gan, ức chế sự nhân lên, và diệt phần nào virus viêm gan B, ức chế sự phát triển của xơ gan như : Tại Trung Quốc theo nghiên cứu của Chen H và cộng sự (2016) bài thuốc Phù Chính Hóa Ú có thành phần Đông Trùng Hạ Thảo có tác dụng tốt trong bảo vệ tế bào gan và ngăn chặn biến chứng xơ gan [53]. Cũng theo nghiên cứu của Tian H và cộng sự (2019) chế phẩm CGA có hoạt chất từ Đông Trùng Hạ Thảo có tác dụng tốt trong việc bảo vệ tế bào gan, cải thiện xơ hóa gan [52], theo Jin H và cộng sự (2005) thảo dược Đại hoàng có tác dụng tốt ức chế sự tiến triển xơ gan, bảo vệ tế bào gan [58]. Tại Việt Nam các nghiên cứu của Trịnh Thị Xuân Hòa và cộng sự (1999) và (2004) sử dụng chế phẩm Haina có chiết xuất từ Cà gai leo có tác dụng tốt trong điều trị viêm gan B, tổn thương gan [12], [13]. Bài thuốc CTHeptaB đã điều trị thành công nhiều bệnh nhân bị các bệnh

lý về gan, tuy nhiên cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu về độc tính và tác dụng bảo vệ tế bào gan của bài thuốc, do đó nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài này để có bằng chứng khoa học cho việc ứng dụng rộng rãi trên lâm sàng, tạo tiền đề cho việc phát triển sản phẩm phòng và điều trị viêm gan B.

#### **4.1. Về độc tính bán trường diễn của viên nang CTHeptaB**

Nghiên cứu bán trường diễn được chúng tôi thực hiện trong thời gian 3 tháng.

Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và quy định của Bộ y tế Việt Nam [36], [50], [51], thời gian nghiên cứu bán trường diễn trên động vật thường gấp 4 lần thời gian dự kiến dùng trên người. Tuy nhiên, nếu nghiên cứu trên động vật trong thời gian quá dài, đặc biệt khi cho động vật dùng thuốc cường bức (qua kim cong đầu tù), một số yếu tố nhiễu có thể ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu. Vì vậy, trong trường hợp thời gian dự định sử dụng trên người là dùng hàng ngày trên 30 ngày thì thời gian nghiên cứu bán trường diễn trên động vật là 3 tháng [50]. Như vậy, việc tiến hành nghiên cứu bán trường diễn trong thời gian 3 tháng bảo đảm để đánh giá được tính an toàn của chế phẩm khi dự kiến sử dụng trên người hàng ngày trên 30 ngày.

Để gây tổn thương gan trên chuột, người ta dùng nhiều loại hóa chất khác nhau như: paracetamol, carbotetraclorid, D-galactosamin, ethanol, erythromycin estolate, aflatoxin B [44], [45].

Paracetamol là chất chuyển hóa có hoạt tính của phenacetin, là thuốc giảm đau - hạ sốt hữu hiệu được sử dụng nhiều trong cuộc sống. Khi dùng quá liều paracetamol một chất chuyển hóa là N - acetyl - benzoquinonimin gây độc nặng cho gan.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chọn paracetamol làm tác nhân gây tổn thương gan do sinh ra gốc tự do gây peroxy hóa màng tế bào gan. Ngoài cơ chế sinh ra gốc tự do tương tự như tác nhân truyền thống gây độc gan cấp tính

là CCl<sub>4</sub>, paracetamol còn làm suy kiệt hệ thống chống oxy hóa của cơ thể (hệ thống các chất thiol). Paracetamol sau khi vào cơ thể, một phần bị chuyển hóa bởi các cytochrome P450 tạo thành N-acetyl para-benzoquinonimin (NAPQI), một gốc tự do gây peroxy hóa lipid và sinh ra MDA dẫn đến tổn thương các tế bào gan, làm tăng AST, ALT và làm biến đổi cấu trúc gan [46].

Thuốc tham chiếu được sử dụng là Silymarin Legalon viên nén 70 mg của hãng MADAUS GmbH (Đức).

Thuốc tham chiếu silimarin là thuốc có hiệu quả tốt trong điều trị bệnh lý về gan, với tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan tốt.

Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn (cho uống viên nang CTHepaB kéo dài trong 90 ngày) không gây ảnh hưởng lên tình trạng hoạt động chung của chuột. Trong thời gian thí nghiệm, chuột ở lô chứng và viên nang CTHepaB cả 2 liều hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô.

Đối với thể trọng chuột, điện tim, các chỉ tiêu huyết học toàn bộ, các chỉ tiêu sinh hóa máu gồm albumin, creatinin và cholesterol toàn phần, hình ảnh đại thể và vi thể gan, lách, thận bình thường cụ thể:

#### **4.1.1. Đối với thể trọng chuột**

Các thời điểm sau so với trước của các lô theo thứ tự chứng, trị 1 và trị 2 đều tăng, và thể trọng của chuột ở 2 lô uống viên nang CTHepaB so với thể trọng của chuột ở lô chứng sinh lý tại tất cả các thời điểm thay đổi, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê (kết quả bảng 3.1).

Như vậy viên nang CTHepaB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa gây ra các thay đổi đối với thể trọng chuột.

#### **4.1.2. Đối với điện tim chuột ở đạo trình DII**

Các lô với nhau trong cùng một thời điểm hoặc trong từng lô giữa các thời điểm, tần số và biên độ của điện tim chuột ở đạo trình DII không có sự

thay đổi, không có sóng bất thường trên điện tim ở đạo trình DII (kết quả bảng 3.2).

Như vậy viên nang CTHePaB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa gây ra các thay đổi trên điện tim chuột ở đạo trình DII.

#### **4.1.3. Chức năng tạo máu**

Máu là một trong các tổ chức quan trọng có khả năng biểu hiện tình trạng bệnh lý của nhiều cơ quan khác nhau trong cơ thể. Nếu thuốc có ảnh hưởng đến cơ quan tạo máu thì trước hết các thành phần của máu sẽ bị thay đổi vì máu phản ánh trạng thái của các cơ quan tạo máu [23]. Theo WHO, đánh giá được càng nhiều thông số của máu càng có khả năng đánh giá chính xác độc tính của thuốc [60]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành định lượng các thành phần của máu gồm: số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu.

*Đối với số lượng hồng cầu:* các lô với nhau trong cùng một thời điểm và trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm số lượng hồng cầu thay đổi, nhưng không có ý nghĩa thống kê (kết quả bảng 3.3).

Như vậy viên nang CTHePaB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về số lượng hồng cầu trong máu chuột.

*Đối với hàm lượng huyết sắc tố trong máu:* các lô với nhau trong cùng một thời điểm và từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột không thay đổi (kết quả bảng 3.4).

Như vậy viên nang CTHePaB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột.

*Đối với hàm lượng hematocrit trong máu chuột:* các lô với nhau trong cùng một thời điểm hematocrit trong máu chuột và từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, hàm lượng hematocrit trong máu chuột không thay đổi (kết quả bảng 3.5).

Như vậy viên nang CT<sub>HepaB</sub> với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về hàm lượng hematocrit trong máu chuột.

*Đối với thể tích trung bình hồng cầu:* thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột giữa các lô với nhau trong cùng một thời điểm và từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột không thay đổi (kết quả bảng 3.6).

Như vậy viên nang CT<sub>HepaB</sub> với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên các chỉ tiêu về thể tích trung bình hồng cầu trong máu chuột.

*Đối với số lượng bạch cầu trong máu:* số lượng bạch cầu trong máu chuột các lô với nhau trong cùng một thời điểm và từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng bạch cầu trong máu chuột không thay đổi (kết quả bảng 3.7).

Như vậy viên nang CT<sub>HepaB</sub> với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên chỉ tiêu về số lượng bạch cầu trong máu chuột.

*Đối với số lượng tiểu cầu trong máu:* số lượng tiểu cầu trong máu chuột các lô với nhau trong cùng một thời điểm và trong từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm, số lượng tiểu cầu trong máu chuột không thay đổi (kết quả bảng 3.8).

Như vậy viên nang CT<sub>HepaB</sub> với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên chỉ tiêu về số lượng tiểu cầu trong máu chuột.

Như vậy, CTHepaB không làm thay đổi kết quả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, tiểu cầu) so với lô chứng.

#### **4.1.4. Chức năng gan, thận.**

Trong cơ thể, gan là cơ quan đảm nhận nhiều chức năng rất quan trọng. Gan còn là nơi thuốc được chuyển hóa và thải trừ. Khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc có thể gây độc với gan, làm tổn thương gan. Vì vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc đến gan là rất cần thiết khi đánh giá độc tính của thuốc. Để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan, thường định lượng hoạt độ các enzym có nguồn gốc gan trong huyết thanh. Sự tăng hoạt độ của các enzym này, quan trọng nhất là 2 enzym ALT và AST, thường gắn liền với độc tính của thuốc thử do sự hủy hoại tế bào gan. ALT là enzym có nhiều nhất ở gan, khu trú trong bào tương của tế bào nhu mô gan. Khi tổn thương hủy hoại tế bào gan, thậm chí chỉ cần thay đổi tính thấm của màng tế bào gan, hoạt độ ALT trong máu đã tăng cao. Khác với ALT, 2/3 AST khu trú trong ty thể (mitochondria) và chỉ ít hơn 1/3 lượng AST khu trú ở bào tương của tế bào. Khi tổn thương tế bào gan ở mức độ dưới tế bào, AST trong ty thể được giải phóng ra. Vì vậy, trong viêm gan nói chung, hoạt độ ALT luôn tăng cao hơn AST [3].

*Đối với hoạt độ AST và ALT:* hoạt độ AST và ALT trong máu chuột các lô với nhau trong cùng một thời điểm (79,9 U/l so với 81,90 và 81,1U/l); (58,90 U/l so với 60,4 U/l và 58,5 UI/l) và (76,10 U/l và 71,40 U/l so với 82,5UI/l) và từng lô giữa các thời điểm thí nghiệm (81,10 UI/l so với 81,80 UI/l và 82,5 UI/l), (58,90 UI/l so với 60,60 UI/l và 59,20 UI/l) và (79,9 UI/l so với 73,50 UI/l và 71,40 UI/l) và (58,50 UI/l so với 53,20 U/l và 50,7 UI/l), các thời điểm sau giảm hơn, tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê (kết quả bảng 3.9).

Hoạt độ các enzyme AST, ALT trong máu ở các lô dùng viên nang CTHePaB có xu hướng giảm hơn so với lô chứng (mặc dù chưa đạt ý nghĩa thống kê). Ở các chuột khỏe mạnh, nuôi trong điều kiện chuẩn của nuôi động vật thí nghiệm nhìn chung các enzyme, AST ALT luôn được duy trì trong giới hạn bình thường. Vì vậy, khi chuột uống thuốc CTHePaB bào chế từ các dược liệu có tác dụng tốt đối với gan làm tế bào gan được bảo vệ tốt hơn giúp cho các enzyme AST, ALT có xu hướng giảm, tuy nhiên vẫn là giá trị trong giới hạn bình thường và vì vậy ta không thấy được sự thay đổi có ý nghĩa thống kê.

Như vậy viên nang CTHePaB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu có xu hướng có tác dụng làm giảm hoạt độ các enzyme AST, ALT trong máu chuột.

*Đối với chỉ số bilirubin toàn phần:* chỉ số bilirubin toàn phần trong máu chuột các lô với nhau tại cùng thời điểm nghiên cứu (77,20  $\mu\text{mol/l}$  so với 76,10  $\mu\text{mol/l}$  và 75,60  $\mu\text{mol/l}$ ), (69,20  $\mu\text{mol/l}$  và 64,10  $\mu\text{mol/l}$  so với 80,30  $\mu\text{mol/l}$ ) và trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu: (77,20  $\mu\text{mol/l}$  so với 79,10  $\mu\text{mol/l}$  và 80,30  $\mu\text{mol/l}$ ), (kết quả bảng 3.10).

Như vậy viên nang CTHePaB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu có xu hướng tác dụng làm giảm chỉ số bilirubin TP trong máu.

*Đối với albumin và creatinin:* các lô với nhau trong cùng một thời điểm cũng như trong từng lô giữa các thời điểm nghiên cứu, chỉ số albumin huyết tương và creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa (kết quả bảng 3.11 và 3.12).

Đánh giá cấu trúc và chức năng thận là một yêu cầu bắt buộc khi nghiên cứu độc tính của các sản phẩm hoặc thuốc mới [84]. Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể. Nhu mô thận rất dễ bị tổn thương. Thận có đặc điểm là dễ bị ngộ độc hơn các mô khác vì là mô có nhiều máu qua nhất [31]. Chính vì

vậy, khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc có thể gây độc và làm tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng đến chức năng thận. Hiện nay, creatinin là chỉ số thường được dùng để đánh giá và theo dõi chức năng thận [3], [32]. Nguyên nhân là do Creatinin là thành phần đậm trong máu ổn định nhất, gần như không phụ thuộc vào chế độ ăn hoặc những thay đổi sinh lý mà chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Khi cầu thận bị tổn thương, nồng độ creatinin máu tăng sớm và tin cậy.

Như vậy viên nang CTHeptaB với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không làm thay đổi các chỉ số albumin và creatinin trong máu chuột nghiên cứu.

*Đối với nồng độ cholesterol toàn phần* : nồng độ cholesterol toàn phần trong máu chuột lô chứng sinh lý tại các thời điểm (1,69 mmol/l so với 1,77 mmol/l và 1,79 mmol/l) không thay đổi, ở các lô dung thuốc có xu hướng giảm khi so sánh thời điểm sau so với thời điểm trước (1,42 mmol/l so với 1,50 và 1,50 mmol/l) và (1,41 mmol/l so với 1,47 mmol/l và 1,83mmol/l) cũng như khi so sánh với lô chứng sinh lý (1,41 mmol/l so với 1,42 mmol/l và 1,69 mmol/l) tuy nhiên sự thay đổi không có ý nghĩa (bảng 3.13).

Chuyển hóa chất là một trong những chức năng quan trọng của gan. Gan có một hệ thống các enzym chuyển hóa rất phong phú cho quá trình tổng hợp và thoái hóa protid, lipid... Tổn thương gan cũng ảnh hưởng tới hàm lượng protein máu toàn phần. Kết quả nghiên cứu cho thấy CTHeptaB không ảnh hưởng đến nồng độ albumin, bilirubin và cholesterol trong huyết thanh chuột. Điều đó chứng tỏ viên nang CTHeptaB không ảnh hưởng đến chức năng chuyển hóa protein, lipid cũng như chức năng bài tiết và chuyển hóa mật của gan.

#### **4.1.5. Tổn thương đại thể các cơ quan**

Đối với đại thể và mô bệnh học các tạng (gan, lách, thận) của chuột

Quan sát đại thể bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần thấy: màu sắc hình thái của gan, lách và thận ở hai lô dùng viên nang



CTHepaB không khác so với chứng: có màu nâu đỏ thẫm đồng đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống không khác biệt so với hình ảnh gan, lách, thận của chuột ở lô chứng.

Hình ảnh đại thể gan, lách, thận của các chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu được trình bày ở các ảnh 3.1, 3.2 và 3.3

Kết quả mô bệnh học các tạng (gan, lách, thận):

Kết quả nghiên cứu về mô bệnh học gan, lách, thận chuột cho thấy viên nang CTHepaB dùng đường uống với liều 0,94g viên nang/kg/ngày và liều 4,70g viên nang/kg/ngày liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột. Hình ảnh vi thể gan, lách, thận của các chuột đại diện cho các lô chuột nghiên cứu được trình bày ở ảnh lô trị 1 (ảnh 3.5) và lô trị 2 (ảnh 3.6) lô chứng (ảnh 3.4). Trên hình ảnh không thấy ở xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.

#### **4.1.6. Tổn thương vi thể các cơ quan**

Hình ảnh vi thể lách dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (ảnh 3.8) và lô trị 2 (ảnh 3.9), là các lô cho uống viên nang CTHepaB, không khác biệt so với hình ảnh vi thể lách chuột ở lô chứng (ảnh 3.7). Trên hình ảnh thấy vùng tủy trắng bắt màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn. Vùng tủy đỏ có màu xanh đỏ, với các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào. không thấy ở xuất huyết hoặc hoại tử.

Hình ảnh vi thể thận dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (ảnh 3.11) và lô trị 2 (ảnh 3.12), là các lô cho uống viên nang CTHepaB, không khác biệt so với hình ảnh vi thể thận chuột ở lô chứng (ảnh 3.10). Cấu trúc các vùng chức năng thận bình thường.

## **4.2. Tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang cứng CTHepaB trên thực nghiệm.**

*Enzym AST và ALT* trong máu chuột AST (hay còn gọi là SGOT), ALT (hay còn gọi là SGPT) đây là hai men gan đặc trưng cho gan. Khi có nhiều tế

bào gan bị tổn thương, hoại tử, cả hai men này sẽ được “giải thoát” và ô ạt phóng thích vào máu.

Kết quả nghiên cứu bảng 3.15 cho thấy AST và ALT trong máu chuột ở lô mô hình tăng so với lô chứng (80,20 UI/l và 98,50 UI/l so với 42,60 UI/l và 54,90 UI/l), thể hiện sự hủy hoại tế bào gan.

Ở các lô trị (chuột gây độc và được uống viên nang CTHePaB) cho thấy giảm rõ rệt hoạt độ các enzyme AST và ALT so với lô mô hình ( $p < 0,01$ ), và trở về gần tương đương so với lô sinh lý không gây độc.

Như vậy, chế phẩm viên nang CTHePaB có khả năng bảo vệ tế bào gan tốt.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự (2016) “*Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của rễ cây xáo tam phân Paramignya trimeca trên chuột gây tổn thương bằng Paracetamol*” [2].

Mô hình gây độc tế bào gan làm hoạt độ enzyme AST và ALT lần lượt là  $715,75 \pm 253,94$  UI/l và  $558,25 \pm 296,54$  UI/l so với lô mô hình của đề tài viên nang CTHePaB là 80,20 UI/l và 98,50 UI/l. Kết quả này cho thấy mô hình rễ cây Xáo tam phân hoạt độ enzym tăng rất cao, cao hơn so với mô hình viên nang CTHePaB.

So sánh hoạt độ AST và ALT của 2 đề tài sau khi sử dụng cao nước rễ Xáo tam phân và sử dụng thuốc CTHePaB lần lượt là  $266,00 \pm 170,92$  UI/l và  $113,25 \pm 27,41$  UI/l so với 48,80 UI/l và 56,30 UI/l. Kết quả này cho thấy viên nang CTHePaB cũng có tác dụng bảo vệ tế bào gan khi so sánh với chế phẩm khác.

Theo nghiên cứu của Phí Thị Cẩm Miên và cộng sự (2017) “*Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của dịch chiết chùm ngây (Moringa oleifera) trên chuột gây tổn thương gan bằng Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)*” [20].

Trên mô hình gây độc bằng CCl<sub>4</sub> hoạt độ AST và ALT lần lượt là  $1178,83 \pm 93,75$  UI/l và  $524,13 \pm 68,89$  UI/l so với lô mô hình của chế phẩm CTHePaB thì hoạt độ cao hơn rất nhiều.

Tại lô trị dịch chiết Chùm ngây hàm lượng cao hoạt độ AST và ALT lần lượt là  $785,05 \pm 76,44$  UI/l và  $439,24 \pm 62,46$  UI/l. Kết quả này cho thấy, hoạt độ AST và ALT có giảm nhiều, so với mô hình của viên nang CTHePaB đều có tác dụng trong việc bảo vệ tế bào gan. Tuy nhiên nếu áp dụng trên các trường hợp chỉ số AST và ALT tăng cao như nghiên cứu trên liệu viên nang CTHePaB có tác dụng bảo vệ tế bào gan không? Nhóm nghiên cứu kiến nghị nên làm các nghiên cứu sâu hơn các tác dụng của CTHePaB như tác dụng đối với xơ gan và K gan nhiễm virus viêm gan B trên thực nghiệm.

#### *Hàm lượng MDA gan chuột*

Nghiên gan, tạo dịch đồng thể để định lượng MDA, MDA là sản phẩm của quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào. Khi hàm lượng MDA gan chuột tăng cao trong nghiên cứu này, chứng tỏ paracetamol làm tổn thương tế bào gan, tạo ra nhiều sản phẩm peroxy hóa lipid.

Kết quả nghiên cứu bảng 3.14 cho thấy: lô mô hình, hàm lượng MDA gan chuột tăng cao so với lô chứng ( $13,95$  mmol/g so với  $7,66$  mmol/g);

Các lô có dùng thuốc (silymarin, CTHePaB cả 2 mức liều khác nhau), hàm lượng MDA gan chuột so với lô mô hình đều giảm ( $9,42$ ;  $8,83$  và  $8,39$  mmol/g so với  $13,95$  mmol/g). Chỉ số hiệu quả (% giảm so với mô hình) theo thứ tự  $32,51\%$ ;  $36,74\%$  và  $39,89\%$ .

Các lô dùng CTHePaB, hàm lượng MDA gan chuột giảm hơn lô dùng silymarin ( $8,39$  mmol/g và  $8,83$  mmol/g so với  $9,42$  mmol/g). Chỉ số hiệu quả (% giảm) theo thứ tự  $36,74\%$  và  $39,83\%$  so với  $32,51\%$ .

Như vậy khi dùng paracetamol làm tổn thương tế bào gan, hàm lượng MDA gan chuột tăng cao, nhưng chuột uống viên nang CTHePaB (liều

0,96g/kg/ngày và 1,92g/kg/ngày) đều thể hiện tác động làm giảm sự gia tăng hàm lượng MDA gây bởi paracetamol, tuy nhiên ở lô dùng CTHepaB liều 1,92g/kg/ngày giảm hơn so với lô dùng 0,96g/kg/ngày (8,39 mmol/g so với 8,83 mmol/g).

Trọng lượng tương đối của gan

Quá trình gây tổn thương, hủy hoại tế bào gan luôn đi kèm với quá trình viêm, làm gan phù nề, xung huyết dẫn đến trọng lượng tương đối của gan tăng. Đánh giá chỉ số về trọng lượng tương đối của gan trong nghiên cứu này, nhằm mục đích đánh giá về tác dụng chống quá trình viêm, phù nề ở gan của chế phẩm.

Theo kết quả bảng 3.14, trọng lượng tương đối của gan ở lô mô hình tăng cao so với lô chứng (0,66 g so với 0,43 /10g), các lô gây độc có dùng thuốc đều giảm (0,51; 0,49 và 0,47 g/10g so với 0,66 g/10g) so lô mô hình. Chỉ số hiệu quả (% giảm so với lô mô hình) thứ tự 22,42%; 26,21%; 29,09%.

Trọng lượng tương đối của gan ở các lô dùng CTHepaB giảm hơn lô dùng silymarin (0/49 g/10g; 0,47 g/10g so với 0,51 g/10g) và lô dùng CTHepaB liều cao giảm hơn so với lô dùng liều thấp (0,47 g/10g so với 0,49 g/10g).

Như vậy, viên nang CTHepaB có tác dụng làm giảm khối lượng tương đối của gan chuột gây độc bằng paracetamol, chứng tỏ chế phẩm có tác dụng làm giảm quá trình viêm, phù nề ở gan.

*Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột*

Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột ở lô dùng thuốc, hồi phục hoàn toàn: hình ảnh đại thể không còn biểu hiện của phù nề, xung huyết; hình ảnh vi thể không còn hình ảnh hoại tử tế bào gan hay xung huyết xoang mạch nan hoa (kết quả bảng 3.4 và hình 3.1; 3.2).

Theo nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự (2016) [2]: hình ảnh đại thể và vi thể gan của lô dùng cao chiết cây Xáo tam phân có

biểu hiện tổn thương gan giảm so với lô chứng bệnh lý, so sánh với kết quả của chúng tôi thì tổn thương trên đại thể vi thể gan lô chuột dùng CTHepaB đã hồi phục hoàn toàn.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Hải Hà và cộng sự (2011), “Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa của bài thuốc proteclive (PL) trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng”. Kết quả bước đầu có tác dụng trong việc bảo vệ gan [7].

Theo nghiên cứu của Trương Thị Thu Hiền và cộng sự (2018). “Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây cà gai leo (*solanum procumbens* Lour) trên mô hình gây tổn thương gan bằng Paracetamol ở chuột nhắt trắng” [8], kết quả ghi nhận chế phẩm từ cà gai leo có độc tính thấp và có tác dụng bảo vệ tế bào gan.

## KẾT LUẬN

Từ các kết quả thực nghiệm của viên nang CTHePaB, chúng tôi kết luận

### **1. Độ tính bán trường diễn của viên nang CTHePaB**

Trên các lô chuột trên chuột cống trắng dùng viên nang CTHePaB liều 0,56/kg/ngày, và liều 3,36g/kg/ngày, trong 90 ngày liên tục thấy:

- Chuột khỏe mạnh, tăng trọng tốt, đều
- Chưa thấy ảnh hưởng các sóng điện tim ở đạo trình DII của chuột
- Không làm thay đổi các chỉ số huyết học (hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu).
- Không làm thay đổi các chỉ tiêu máu, chức năng gan, thận.
- Không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận.

Như vậy viên nang CTHePaB an toàn ở các mức liều đã dùng.

### **2. Tác dụng của viên nang CTHePaB trên mô hình thực nghiệm gây tổn thương và hủy hoại tế bào gan ở chuột nhắt trắng**

Trên chuột nhắt trắng gây tổn thương và hủy hoại tế bào gan bằng paracetamol liều 400mg, viên nang CTHePaB liều 0,96 g/kg/ngày và 1,92 g/kg/ngày có tác dụng tốt bảo vệ tế bào gan (giảm AST, ALT); chống viêm (giảm trọng lượng tương đối của gan); chống oxy hóa (giảm MDA dịch đồng thể gan); hình ảnh đại thể, vi thể gan chuột không có tổn thương do paracetamol gây ra. Tác dụng của CTHePaB liều 0,96 g/kg/ngày và 1,92 g/kg/ngày có xu hướng tốt. CTHePaB có tác dụng bảo vệ tế bào gan tương tự Silimarin.

## **KIẾN NGHỊ**

Từ những kết quả nghiên cứu về độc tính bán trường diễn và tác dụng bảo vệ tế bào gan của viên nang “CTHepaB” thu được trên động vật thực nghiệm, cần nghiên cứu sâu hơn các tác dụng khác của CTHepaB như tác dụng đối xơ gan và K gan nhiễm virus viêm gan B trên thực nghiệm, nhằm làm sáng tỏ hơn về tác dụng dược lý của thuốc.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### TÀI LIỆU TRONG NƯỚC

1. Lê Quang Cường (2015), *Hướng dẫn thử nghiệm phi lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y thuốc từ dược liệu (ban hành kèm theo Quyết định số /QĐ-BYT ngày //2015)*.
2. Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự (2016), “Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của rễ cây xáo tam phân *Paramignya trimeca* trên chuột gây tổn thương bằng Paracetamol”. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 54, 37-45.
3. Phạm Tử Dương, Nguyễn Thế Khánh (2005), *Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
4. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nhà xuất bản y học.
5. Đỗ Trung Đàm (2014), “*Phương pháp Litchfield Wilcoxon*”, Phương pháp xác định độc tính của thuốc, Nhà xuất bản y học, 101 – 1124.
6. Đỗ Trung Đàm (2006), “*Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm*”, Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 377 – 392.
7. Nguyễn Xuân Duy và cộng sự (2016), *Hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme tyrosinase của nấm linh chi thượng hoàng (Phellinus linteus) ở Việt Nam*, Tạp chí dược học, số 479, 38-41.
8. Nguyễn Hải Hà và cộng sự (2011), *Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa của bài thuốc proteclive (PL) trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng*, Tạp chí dược học số 425, 48-51.



9. Trương Thị Thu Hiền và cộng sự (2018), *Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây cà gai leo (Solanum procumbens Lour) trên mô hình gây tổn thương gan bằng Paracetamol ở chuột nhắt trắng*, Tạp chí quân sự, số 6, 14-21
10. Lê Mai Hương và cộng sự (2017), *Tác dụng kháng ung thư của chế phẩm Bio-Plus*, Tạp chí dược học, số 493, 71-74.
11. Nguyễn Thùy Hương và cộng sự (2006), *Đánh giá tác dụng của viên “HM” trong hội chứng rối loạn lipid máu*, Tạp chí dược học, số 360, 29-32.
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, dihacharin*. Tạp chí y dược học quân sự - Học viện Quân y, Tập 30 ĐS/2005, 115-12.
14. Nguyễn Nhược Kim và cộng sự (1999), *Góp phần đánh giá hiệu quả bệnh viêm gan mạn tính và xơ gan giai đoạn còn bù bằng bài thuốc nghiệm phương YHCT*, Tạp chí YHCT Việt Nam - Số 302 (14-17).
15. Hà Hoàng Kiệm (2014), *Bệnh gan do rượu*.
16. Hoàng Thị Phương Liên và cộng sự (2017), *Khảo sát độc tính cấp đường uống và tác động giải độc rượu của cao chiết từ một bài thuốc dân gian*, Tạp chí dược học, số 500, 36-40.
17. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản y học 2006 tr 546- tr 199- tr 455- tr 828 –tr 831- tr 833 –tr 882.
18. Vũ Đức Lợi và cộng sự (2017), *Chiết xuất, phân lập một số hợp chất từ cây cỏ sữa lá nhỏ (Euphorbia thymifolia Burm.)*, Tạp chí dược học, số 490, 70-72, 78.

19. Phạm Kim Mãn và cộng sự (1999), *Tác dụng chống ung thư của Cà gai leo*. Tạp chí Dược liệu, số 3-4, 126.
20. Phí Thị Cẩm Miện và cộng sự (2017) ‘*Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của dịch chiết chum ngân (Moringa oleifera) trên chuột gây tổn thương gan bằng Carbon tetrachloride (CCl4)*’. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, tập 15, số 2, 225-233.
21. Trần Thị Ngọc (2016), *Tầm soát tổn thương gan do thuốc thông qua kết quả xét nghiệm cận lâm sàng tại bệnh viện Hữu Nghị*. Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ, Trường đại học Dược Hà Nội.
22. Nguyễn Thị Mai Phương và cộng sự (2013), *Xây dựng mô hình sàng lọc chất kháng viêm thông qua thụ thể toll like 4 (TLR4) trên màng tế bào macrophage chuột*, Tạp chí dược học, số 443, 05-10.
23. Đỗ Trung Phấn (2013). *Kỹ thuật xét nghiệm huyết học và truyền máu ứng dụng trong lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
24. Nguyễn Đức Quang và cộng sự (2008), *Kết quả bước đầu về tác dụng của thuốc cổ truyền trên sỏi gan mật trong thực nghiệm*, Tạp chí dược học, số 383, 33-34, 38.
25. Nguyễn Bích Thu và cộng sự (2000), *Nghiên cứu tác dụng của Cà gai leo (Solanum hainanense Hance) trên collagenase*, Tạp chí Dược liệu, 5 (5), 149-152.
26. Lê Xuân Tiến (2011), *Đánh giá tác dụng của trà tan Diệp linh trong điều trị bệnh viêm gan viruts B mạn tính*, Luận văn bác sỹ chuyên khoa II, Đại học Y Hà Nội, 20-27.
27. Phạm Văn Ty (2005), *Virut học*, Nhà xuất bản giáo dục, Hà Nội.
28. Đào Xuân Vinh (2008). *Hướng dẫn sử dụng các xét nghiệm sinh hóa*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

29. Tiollais P, B. M. (1991), Virus viêm gan B, Hội thảo Khoa học nhân kỷ niệm 100 năm thành lập Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh.
30. Bùi Đại (2016), *Viêm gan virus B và D*. Nhà xuất bản y học, tr 21-22.
31. Bộ môn Miễn dịch Trường Đại học Y Hà Nội (2010). *Sinh lý bệnh, Bài giảng sinh lý bệnh*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
32. Bộ môn Sinh lý học Trường Đại học Y Hà Nội (2007). *Bài giảng sinh lý học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
33. Trường Đại học Y Hà Nội (2006), *Chuyên đề nội khoa y học cổ truyền*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, 218-221.
34. Trung tâm Á châu đại học Stanford (2016), *Cẩm nang cho cán bộ y tế về Viêm gan B*.
35. Bộ Y Tế (2014), Công văn 19098/QLD-ĐK về việc lưu hành thuốc từ dược liệu có phối hợp mới thành phần dược liệu.
36. Bộ Y tế (2018), “Quy định về thử thuốc trên lâm sàng”, Thông tư số 29/2018/TT-BYT ngày 29 tháng 10 năm 2018.
37. Bộ Y Tế (2007). Quyết định số 01/2007/ QĐ-BYT về việc ban hành “quy định về thử thuốc trên lâm sàng.
38. Bộ Y Tế (2014) Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh viêm gan virus B.

## **TÀI LIỆU NƯỚC NGOÀI**

39. OECD 423 (2001), OECD guideline for testing of chemicals – Sub chronic oral toxicity – Acute toxic class method.
40. World Health Organization (2000), General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine
41. Ming - Chih Hou, Jaw - Ching Wu et al (1993), Heterosexual transmission as the most route of acute hepatic B virus infection among adult in Taiwan - The importance of extending vaccination to susceptible adult. *The journal of infectious diseases* ; 167: 938 - 41.

42. Kumar V., Cotran R. S., Robbins S. L., (1992). Cell injury and adaptation; 5th ed. Bangalore. India: Prime Books Publ, 3-24.11.
43. Vogels B. A., Karlsen O. T., Mass M. A., et al (1997). L- ornithine vs. L-ornithine-L-aspartate as a treatment for hyperammonemia-induced encephalopathy in rats. *Journal of Hepatology*, 26(1): 174-178.
44. Cui Y., Yang X., Lu X., Chen J., Zhao Y. (2014), Protective effects of polyphenols-enriched extract from Huangshan Maofeng green tea against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice, *Chemico Biological Interactions* 220 (5): 75-83.
45. Choi K. C., Chung W. T., Kwon J. K., et al (2010) - Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B<sub>1</sub> induced hepatic damage in mice, *Food and Chemical Toxicology* 48 (10): 2747-2753.
46. Sabina E. S., Samue J., Ramya S. R., et al (2009), Hepatoprotective and antioxidant potential of *Spirulina fusiformis* on acetaminophen induced hepatotoxicity in mice, *International Journal of Integrative Biology* 6 (1): 1-5.
47. Shahani S., (1999). Evaluation of hepatoprotective efficacy of APCL-A polyherbal formulation in vivo in rats. *Indian Drugs*, 36: 628-631.
48. Dianzani M. U., Muzia G., Biocca M.E., et al (1991), Lipid peroxidation in fatty liver induced by caffeine in rats, *Int. J. Tissue React.* 13 (1): 79-85.
49. Chen CC, Wang LY et (2000), Epidemiology of hepatitis B virút infection in the Asia-Pacific region, *J Gastroenterology and hepatology* 1 S9Suppl): E3-E6.
50. WHO (1993). Research Guidelines For Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines, ROWP, Manila, Philippines.
51. WHO (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, EDM/TRM, Geneva, Switzerland.

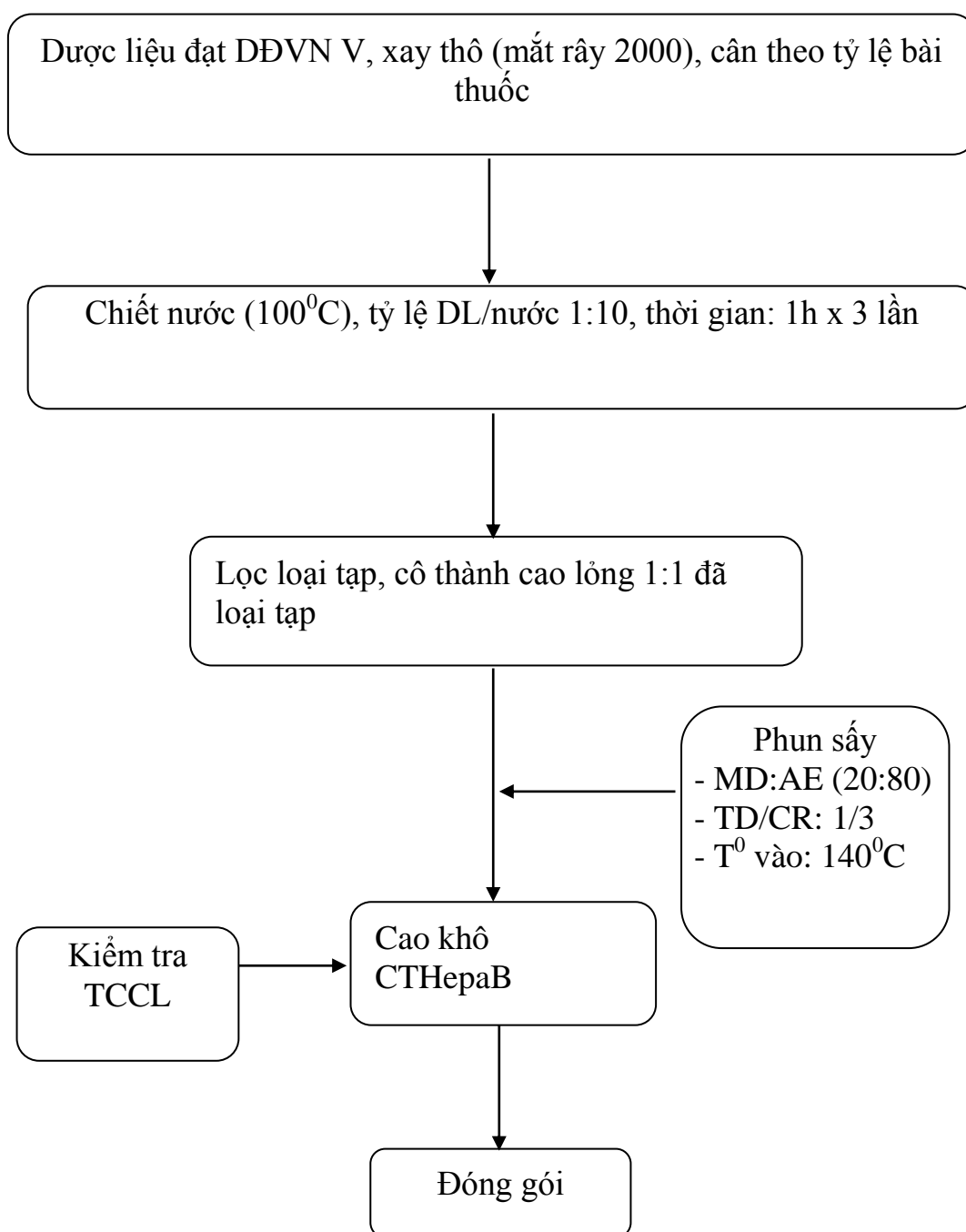
52. Tian H, Liu L, Li Z, et al (2019). Chinese medicine CGA formula ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride involving inhibition of hepatic apoptosis in rats. *J Ethnopharmacol*, 232:227-235.
53. Chen H, Yang BW et al (2016). Prevention and Therapeutic Effects of Fuzheng Huayu Capsule on Liver Fibrosis and Expression of Connective Tissue Growth Factor in Rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 47(2):197-202.
54. 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.
55. Li CX, Li L, Lou J, et al (1998). The protective effects of traditional Chinese medicine prescription, han-dan-gan-le, on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. *Am J Chin Med*, 26(3-4):325-32.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. World Health Organization (2000). Working group on the safety and efficacy of herbal medicine, Report of regional office for the western pacific of the World Health Organization, 36 - 42.

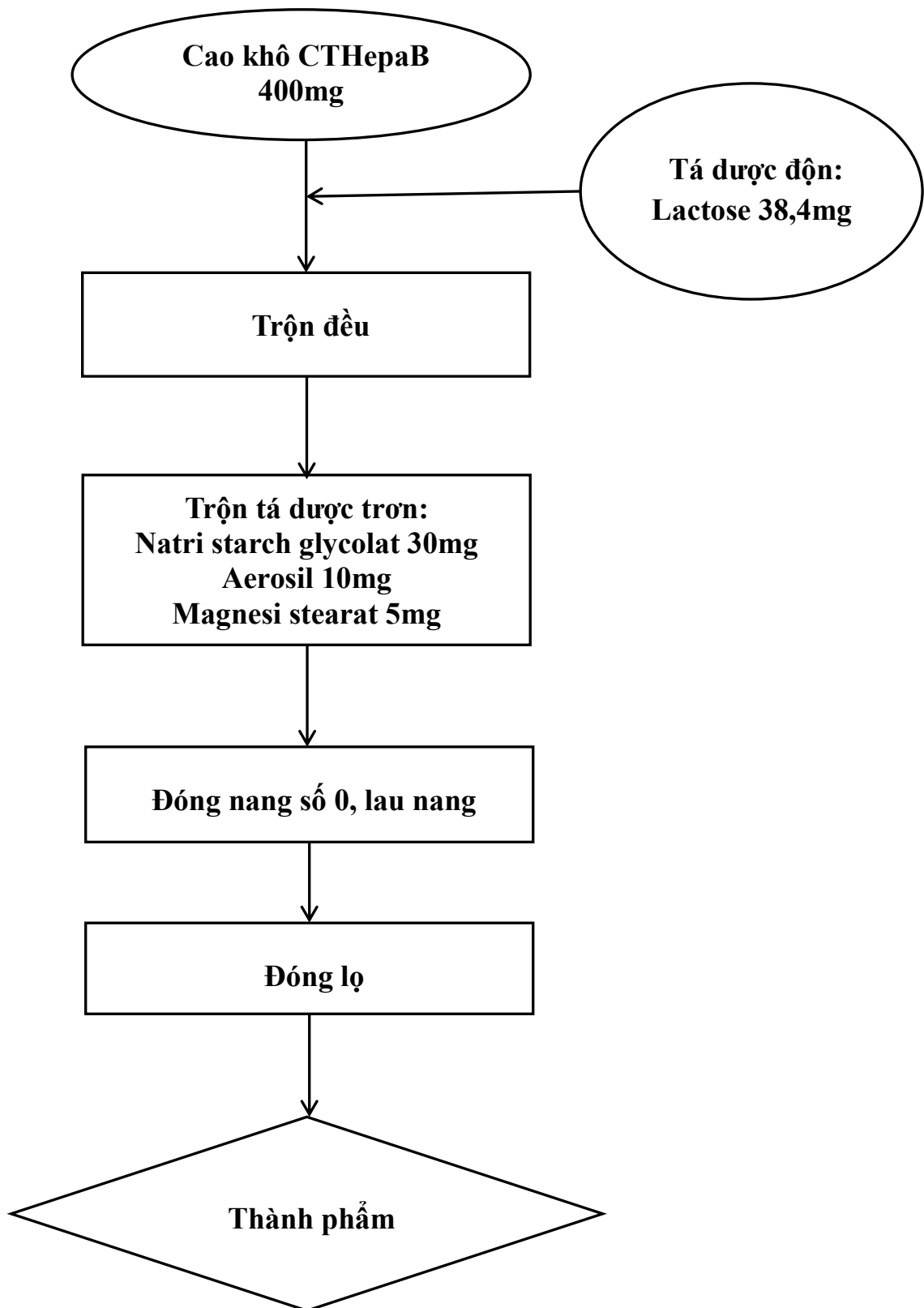
## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1 Quy trình sản xuất viên nang cứng CTHePaB

#### 1. Nghiên cứu bào chế bột cao khô định chuẩn

##### Sơ đồ quy trình bào chế bột cao khô CTHePaB





**Sơ đồ các giai đoạn bào chế viên nang**