

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN PHƯƠNG THANH

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KÍCH THÍCH
MIỄN DỊCH VÀ CHỐNG VIÊM GAN MẠN
CỦA VIÊN NÉN LIVGANIC TRÊN
THỰC NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

NGUYỄN PHƯƠNG THANH

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KÍCH THÍCH
MIỄN DỊCH VÀ CHỐNG VIÊM GAN MẠN
CỦA VIÊN NÉN LIVGANIC TRÊN
THỰC NGHIỆM**

Chuyên ngành : Dược lý và độc chất

Mã số : 62720120

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông

HÀ NỘI – 2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Phương Thanh nghiên cứu sinh khóa 32, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Dược lý và độc chất, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Trọng Thông
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 tháng năm 2021

Người viết cam đoan ký

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Bệnh lý viêm gan.....	3
1.1.1. Sơ lược về giải phẫu, mô học và chức năng của gan	3
1.1.2. Bệnh lý viêm gan cấp tính.....	5
1.1.3. Bệnh lý viêm gan mạn tính	6
1.2. Mô hình dược lý gây suy giảm miễn dịch và viêm gan mạn, xơ gan. 30	
1.2.1. Mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm.....	30
1.2.2. Mô hình gây viêm gan mạn tính, xơ gan	34
1.3. Viên nén Livganic	36
1.3.1. Cây Cà gai leo.....	36
1.3.2. Cây Mật nhân.....	39
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	42
2.1. Động vật thực nghiệm	42
2.2. Chất liệu nghiên cứu.....	42
2.2.1. Nguồn gốc	42
2.2.2. Quy trình tạo thuốc nghiên cứu	42
2.2.3. Chuẩn bị dung dịch sản phẩm nghiên cứu	44
2.3. Hóa chất, dụng cụ phục vụ nghiên cứu	44
2.3.1. Hóa chất phục vụ nghiên cứu	44
2.3.2. Dụng cụ, máy móc phục vụ nghiên cứu	45
2.4. Mô hình nghiên cứu và đánh giá tác dụng của viên nén Livganic.....	45
2.4.1. Tác dụng của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch.....	46
2.4.2. Tác dụng của Livganic trên mô hình viêm gan mạn	54
2.4.3. Xử lý số liệu.....	55

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	56
3.1. Tác dụng của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch	56
3.1.1. Mô hình suy giảm miễn dịch cấp bằng cyclophosphamid	56
3.1.2. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY kéo dài.....	65
3.1.3. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ.....	77
3.2. Tác dụng của viên nén Livganic trên mô hình viêm gan mạn tính	89
3.2.1. Kết quả về ảnh hưởng tỷ lệ chuột chết, trọng lượng và hình thái gan.....	89
3.2.2. Kết quả đánh giá chức năng gan thông qua xét nghiệm máu	96
3.2.3. Ảnh hưởng lên các chỉ số đánh giá mức độ xơ gan	98
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	99
4.1. Tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic.....	99
4.1.1. Tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch do CY	99
4.1.2. Tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ	112
4.1.3. Bàn luận chung về tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic	116
4.2. Tác dụng ức chế viêm gan mạn của Livganic	117
4.3. Mối liên quan giữa tác dụng tăng cường miễn dịch và chống viêm gan mạn của viên nén Livganic	123
4.4. Hạn chế của đề tài.....	127
KẾT LUẬN.....	129
KIẾN NGHỊ.....	130
DANH MỤC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN	
ĐẾN ĐỀ TÀI	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Anti-HBc	: Kháng thể kháng HBc
Anti-HBe	: Kháng thể kháng HBe
Anti-HBs	: Kháng thể kháng HBs
BC:	: Bạch cầu
BCTT:	: Bạch cầu đa nhân trung tính
CCl ₄	: Carbon tetrachlorid
CSF	: Colony stimulating factor Yếu tố kích thích tạo dòng
CY	: Cyclophosphamid
DAMP	: Danger-associated molecular pattern Kiểu mẫu phân tử liên quan tới tổn thương
G-CSF	: Granulocyte colony stimulating factor Yếu tố kích thích tạo dòng tế bào hạt
HBcAg	: Hepatitis B core antigen Kháng nguyên lõi viêm gan B
HBeAg	: Hepatitis B envelope antigen Kháng nguyên vỏ viêm gan B
HBsAg	: Hepatitis B surface antigen Kháng nguyên bề mặt viêm gan B
HBV	: Hepatitis B virus Virus viêm gan B
HCV	: Hepatitis C virus Virus viêm gan C
hGM-CSF	: Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor Yếu tố kích thích tạo dòng tế bào hạt – đại thực bào người
IFN	: Interferon

IL	: Interleukin
MHC	: Major-histocompatibility-complex Phức hợp hòa hợp mô chủ yếu
NK	: Natural killer Tế bào giết tự nhiên
PAMP	: Pathogen-associated molecular pattern Kiểu mẫu phân tử liên quan tới bệnh nguyên
PRR	: Pattern recognition receptor Thụ thể nhận diện kiểu mẫu
TLR	: Toll – like receptor Thụ thể giống Toll
TNF	: Tumor necrosis factor Yếu tố hoại tử u
VGM	: Viêm gan mạn

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Giai đoạn xơ hóa gan theo các thang điểm	9
Bảng 1.2. Các thuốc sử dụng để điều trị viêm gan C tại Việt Nam	26
Bảng 1.3. Phác đồ điều trị người bệnh viêm gan C không xơ gan.....	27
Bảng 1.4. Phác đồ điều trị viêm gan C ở bệnh nhân xơ gan còn bù	27
Bảng 1.5. Phác đồ điều trị viêm gan C ở bệnh nhân xơ gan mất bù	28
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng lách tương đối.....	56
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng tuyến ức tương đối.....	57
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của thuốc thử lên số lượng bạch cầu	57
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của thuốc thử lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi	58
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của thuốc thử lên nồng độ IgG máu ngoại vi.....	59
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của thuốc thử đến phản ứng bì với kháng nguyên OA.....	60
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IL - 2	60
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ TNF - α	61
Bảng 3.9. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức.	62
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng lách tương đối.....	65
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng tuyến ức tương đối....	66
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của thuốc thử lên số lượng bạch cầu	67
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của thuốc thử lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi..	68
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của thuốc thử lên nồng độ IgG máu ngoại vi.....	69
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của thuốc thử đến phản ứng bì với kháng nguyên OA ...	70
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IL - 2	71
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IFN - α	71
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của Livganic lên các dấu ấn miễn dịch.....	72
Bảng 3.19. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức.	73
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng lách tương đối.....	77

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng tuyến ức tương đối....	77
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của thuốc thử lên số lượng bạch cầu	78
Bảng 3.23. Ảnh hưởng của thuốc thử lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi	79
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của thuốc thử lên nồng độ IgG máu ngoại vi.....	80
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của thuốc thử đến phản ứng bì với kháng nguyên OA ...	81
Bảng 3.26. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IL - 2	82
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IFN - α	82
Bảng 3.28. Ảnh hưởng của Livganic lên các dấu ấn miễn dịch.....	83
Bảng 3.29. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức.	84
Bảng 3.30. Số lượng chuột chết sau 18 tuần	89
Bảng 3.31. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng gan.....	89
Bảng 3.32. Kết quả giải phẫu vi thể gan	92
Bảng 3.33. Ảnh hưởng của thuốc thử đến hoạt độ AST, ALT và nồng độ bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần.....	96
Bảng 3.34. Ảnh hưởng của thuốc thử lên một số chỉ số huyết học.....	97
Bảng 3.35. Ảnh hưởng của thuốc thử lên hàm lượng hydroxyprolin và lượng collagen typ IV	98

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Đáp ứng miễn dịch tế bào với HBV	14
Hình 1.2. Tác dụng của rượu lên phản ứng miễn dịch không đặc hiệu tại gan ...	20
Hình 1.3. Suy giảm miễn dịch trong xơ gan.	21
Hình 1.4. Cây cà gai leo	37
Hình 1.5. Hình ảnh cây mật nhân	39
Hình 1.6. Quy trình sản xuất viên nén Livganic.....	43

DANH MỤC ẢNH

Ảnh 3.1: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học (chuột số 2).....	63
Ảnh 3.2: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học (chuột số 2).....	63
Ảnh 3.3: Hình ảnh vi thể lách chuột lô mô hình (chuột số 12).....	63
Ảnh 3.4: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô mô hình (chuột số 12).....	63
Ảnh 3.5: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống levamisol	64
Ảnh 3.6: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống levamisol	64
Ảnh 3.7: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 61)....	64
Ảnh 3.8: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 61)..	64
Ảnh 3.9: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 73) ..	65
Ảnh 3.10: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 73)....	65
Ảnh 3.11: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học (chuột số 1).....	74
Ảnh 3.12: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học (chuột số 1)....	74
Ảnh 3.13: Hình ảnh vi thể lách chuột lô mô hình (chuột số 11)	74
Ảnh 3.14: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô mô hình (chuột số 11).....	74
Ảnh 3.15: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống levamisol (chuột số 23)	75
Ảnh 3.16: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống levamisol (chuột số 23).....	75
Ảnh 3.17: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg.....	75
Ảnh 3.18: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 38) ..	75
Ảnh 3.19: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 45)....	76
Ảnh 3.20: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg.....	76
Ảnh 3.21: Hình ảnh vi thể lách chuột lô chứng sinh học.....	86
Ảnh 3.22: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô chứng sinh học.....	86

Ảnh 3.23: Hình ảnh vi thể lách chuột lô mô hình (chuột số 13).....	86
Ảnh 3.24: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô mô hình (chuột số 13).....	86
Ảnh 3.25: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống levamisol (chuột số 33).....	87
Ảnh 3.26: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống levamisol (chuột số 33).....	87
Ảnh 3.27: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 36)..	87
Ảnh 3.28: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 36).	87
Ảnh 3.29: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 61).....	88
Ảnh 3.30: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 61).....	88
Ảnh 3.31: Hình ảnh đại thể gan lô Chứng sinh học (chuột số 1): Gan bình thường	90
Ảnh 3.32: Hình ảnh đại thể gan lô Chứng sinh học (chuột số 2): Gan bình thường	90
Ảnh 3.33: Hình ảnh đại thể gan chuột lô mô hình (chuột số 17): <i>Hình ảnh xơ gan (nhạt màu, mất độ bóng, có khối xơ)</i>	90
Ảnh 3.34: Hình ảnh đại thể gan chuột lô mô hình (chuột số 20): <i>Hình ảnh xơ gan (nhạt màu, mất độ bóng, có khối xơ)</i>	90
Ảnh 3.35: Hình ảnh đại thể gan chuột Lô Silymarin (chuột số 24): Gan gần như bình thường	91
Ảnh 3.36: Hình ảnh đại thể gan chuột Lô Silymarin (chuột số 25): Gan gần như bình thường	91
Ảnh 3.37: Hình đại thể gan chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 36): Gan gần như bình thường	91
Ảnh 3.38: Hình đại thể gan chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 37): Gan nhạt màu, mất độ bóng.....	91

Ảnh 3.39: Hình đại thể gan chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 51): Gan gần như bình thường	91
Ảnh 3.40: Hình đại thể gan chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 54): Gan gần như bình thường	91
Ảnh 3.41: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng sinh học (chuột số 1)	94
Ảnh 3.42: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng sinh học (chuột số 6)	94
Ảnh 3.43: Hình ảnh vi thể gan chuột Mô hình (chuột số 17)	94
Ảnh 3.44 Hình ảnh vi thể gan chuột Mô hình (chuột số 20)	94
Ảnh 3.45: Hình ảnh vi thể gan chuột Chứng dương (chuột số 24)	94
Ảnh 3.46: Hình ảnh vi thể gan chuột Chứng dương (chuột số 26)	94
Ảnh 3.47: Hình ảnh vi thể gan chuột Livganic 0,6 g/kg (chuột số 36)	95
Ảnh 3.48: Hình ảnh vi thể gan chuột Livganic 0,6 g/kg (chuột số 38)	95
Ảnh 3.49: Hình ảnh vi thể gan chuột Livganic 1,8 g/kg (chuột số 51)	95
Ảnh 3.50: Hình ảnh vi thể gan chuột Livganic 1,8 g/kg (chuột số 53)	95

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan mạn tính là một bệnh lý gây ra bởi nhiều tác nhân, có thể dẫn tới các hậu quả như xơ gan, ung thư gan và là nguyên nhân dẫn tới gia tăng gánh nặng bệnh tật hoặc tử vong [1]. Có nhiều nguyên nhân dẫn tới viêm gan mạn như nhiễm virus, do rượu, hóa chất hoặc nguyên nhân tự miễn trong đó nguyên nhân do virus là nguyên nhân thường gặp. Sinh lý bệnh học của viêm gan mạn tính, đặc biệt trong trường hợp do virus, có sự tham gia của nhiều quá trình như quá trình tổn thương hoại tử tế bào gan, xơ hóa gan và quá trình đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với virus [2].

Cơ chế đáp ứng miễn dịch và các rối loạn gây ra do đáp ứng miễn dịch là nguyên nhân quan trọng hàng đầu đóng góp vào tổn thương gan dẫn tới xơ gan, đặc biệt là các đáp ứng miễn dịch đối với các nguyên nhân gây viêm gan mạn do virus [2]. Ngược lại, quá trình xơ hóa gan và đáp ứng miễn dịch kéo dài với tác nhân gây bệnh dần dần dẫn tới suy giảm hệ thống miễn dịch tại gan và của cả cơ thể [2],[3]. Hạn chế quá trình xơ hóa gan là một yếu tố quan trọng trong điều trị bệnh lý viêm gan mạn tính, đặc biệt viêm gan do virus. Do vậy, một trong những hướng đi trong nghiên cứu phát triển thuốc mới trong điều trị viêm gan mạn do virus là tìm ra các sản phẩm có khả năng nâng cao khả năng đáp ứng miễn dịch của cơ thể hoặc có khả năng hạn chế quá trình diễn tiến dẫn tới xơ gan.

Các nghiên cứu thực nghiệm trên bệnh lý gan cho thấy nhiều điều thú vị và gợi mở các hướng nghiên cứu mới, cách đặt câu hỏi nghiên cứu từ nhiều phía cho những sản phẩm mong muốn có tác dụng điều trị bệnh gan. Trong những sản phẩm đó, Livganic là sản phẩm phối hợp 2 vị thuốc đã được biết đến trước đó có tác dụng bảo vệ gan (cao Cà gai leo và cao Mật nhân), tuy nhiên chưa được nghiên cứu kỹ lưỡng tác dụng trên bệnh lý gan khi phối hợp,

nhất là với các bệnh lý gan mạn tính. Trong quá trình nghiên cứu tại Bộ môn Dược lý Trường Đại học Y Hà Nội, bước đầu trên thực nghiệm đã xác định được tác dụng sơ bộ của Livganic trên bệnh lý viêm gan cấp tính [4]. Bên cạnh đó, một thử nghiệm trên nhóm nhỏ bệnh nhân viêm gan cho thấy dường như Livganic có hiệu quả trong việc điều trị viêm gan virus B (VGB) mạn tính (số liệu chưa công bố). Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng kiệt quệ và suy giảm đáp ứng miễn dịch của cơ thể với virus dẫn tới sự tồn tại phát triển của virus viêm gan B trong viêm gan mạn tính, gây ra xơ hóa tổ chức gan, suy giảm chức năng gan [3],[5]. Như vậy, một câu hỏi nghiên cứu đặt ra là: Livganic có tác dụng gì lên hệ thống miễn dịch và hạn chế quá trình xơ hóa gan trong viêm gan mạn tính hay không? Xuất phát từ một số kết quả nghiên cứu ban đầu và câu hỏi nghiên cứu đó, đồng thời để làm nền móng cho việc thử nghiệm lâm sàng trên nhóm bệnh nhân VGB mạn tính đủ lớn trong tương lai, đề tài nghiên cứu trên thực nghiệm này được tiến hành với hai mục tiêu:

1. Đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic trên thực nghiệm.

2. Đánh giá tác dụng chống viêm gan mạn của viên nén Livganic trên thực nghiệm.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Bệnh lý viêm gan

1.1.1. Sơ lược về giải phẫu, mô học và chức năng của gan

- Sơ lược về giải phẫu, mô học của gan:

Gan chiếm 2 – 3% trọng lượng trung bình của cơ thể và là cơ quan lớn nhất. Gan được phân loại thuộc hệ tiêu hóa, chia làm nhiều thùy, mỗi thùy gan được tạo thành bởi những khối nhỏ gọi là tiểu thùy. Mỗi tiểu thùy của gan được coi là một đơn vị cấu tạo và chức năng [6]. Gan được cấu tạo bởi nhiều loại tế bào gồm tế bào gan, tế bào biểu mô đường mật, tế bào hình sao, tế bào Kupffer và tế bào biểu mô xoang gan. Mỗi tế bào có chức năng riêng biệt nhằm điều hòa các hoạt động của gan: Tế bào gan là tế bào chủ yếu của gan, thực hiện nhiều chức năng của gan; tế bào đường mật là tế bào phổ biến thứ hai tại gan, có chức năng tạo nên mật; tế bào hình sao là tế bào chức năng có thể tồn tại ở trạng thái yên lặng hoặc ở dạng hoạt hóa, tế bào hình sao dự trữ vitamin A ở trạng thái yên lặng, tổn thương tế bào gan dẫn tới hoạt hóa tế bào hình sao và hình thành collagen, góp phần gây ra tình trạng xơ gan; tế bào Kupffer đóng vai trò là các đại thực bào tại gan [7].

- Chức năng sinh hóa của gan:

- Chuyển hóa glucid: Gan có tác dụng tổng hợp glycogen và chuyển glycogen thành glucose để cung cấp cho cơ thể hoặc sau đó chuyển glucose thành acid glucuronic để tham gia vào quá trình khử độc của gan [8].

- Chuyển hóa lipid: Gan sản xuất muối mật để nhũ tương hóa lipid giúp tiêu hóa và hấp thu lipid qua thức ăn. Ngoài ra gan còn tham gia vào quá trình tổng hợp, thoái hóa lipid.

- Chuyển hóa acid amin – protein: Gan tổng hợp toàn bộ albumin và một phần globulin, các yếu tố đông máu (fibrinogen, prothrombin).

- Chức năng khử độc và tác dụng bảo vệ của gan:

Chức năng khử độc của gan được thực hiện theo 2 cơ chế:

- Cơ chế hóa học: Diễn ra theo 2 pha:

+ Pha I: Gồm các phản ứng oxy hóa, phản ứng khử, phản ứng thủy phân. Quan trọng nhất trong pha này là phản ứng oxy hóa xảy ra ở microsom gan thông qua họ enzym CYP P450. Họ enzym này gồm nhiều isoenzym khác nhau. Trong đó CYP3A4 và CYP2E1 có vai trò quan trọng trong chuyển hóa thuốc, hóa chất. Trong số các thuốc, các chất được chuyển hóa qua CYP này có paracetamol [9].

+ Pha II: Các phản ứng của pha II gồm phản ứng liên hợp với acid glucuronic, acid sulfuric, glycolic, glutathion,... Sản phẩm của các chất chuyển

hóa qua pha này là những chất không có hoạt tính, có tính phân cực mạnh và tan tốt trong nước [9].

- Chức năng bài tiết mật:

Mật được tiết ra từ những tế bào gan đưa xuống túi mật qua ống dẫn mật. Tác dụng chính của mật là nhũ tương hóa lipid của thức ăn. Khi bài tiết mật xuống ruột sẽ kéo theo những chất độc được gan giữ lại và đào thải qua đường mật xuống ruột. Nếu gan bị tổn thương sẽ ảnh hưởng đến quá trình tạo mật và bài xuất mật, ảnh hưởng đến quá trình tiêu hóa, hấp thu lipid, các vitamin tan trong dầu và đào thải một số chất độc qua đường mật [6].

- Chức năng tạo và phá hủy hồng cầu:

Gan trong thời kỳ bào thai có khả năng tạo máu. Gan là nơi sản xuất protein, cần thiết cho việc cấu tạo nên hồng cầu, là nơi dự trữ sắt lớn nhất trong cơ thể. Ngoài ra gan còn dự trữ vitamin B12, vitamin K. Mặt khác, tổ chức võng nội mô của gan là nơi phân hủy hồng cầu [10].

1.1.2. Bệnh lý viêm gan cấp tính

Viêm gan cấp là bệnh lý gan xảy ra cấp tính, biểu hiện đặc trưng bằng phản ứng viêm và rối loạn một số chức phận gan. Bệnh lý gan cấp tính có thể gây ra do 3 nguyên nhân chính: virus, do thuốc hoặc do nhiễm độc.

Bệnh lý viêm gan cấp do virus là bệnh lý hay gặp ở các nước đang phát triển như Việt Nam. Bệnh lý viêm gan cấp do virus có thể gây ra bởi các chủng virus viêm gan khác nhau bao gồm: virus viêm gan A, B, C, D, E và G. Trong đó viêm gan B, C, D có thể tiến triển âm thầm, dẫn tới viêm gan mạn, xơ gan và ung thư gan [11].

Viêm gan cấp do thuốc có thể xảy ra sau khi thuốc được chuyển hóa qua gan tạo thành các chất gây độc cho gan như paracetamol, isoniazid, halothan. Paracetamol là thuốc hạ sốt giảm đau ở liều điều trị thường không tai biến trên gan, tuy nhiên với liều cao paracetamol có thể gây viêm gan cấp tính vì khi chuyển hóa qua gan làm tăng tạo NAPQI là chất gây tổn thương tế bào gan [12].

Viêm gan cấp còn có thể do nguyên nhân khác là nhiễm độc các loại hóa chất. Các chất gây độc bao gồm thuốc trừ sâu, các hợp chất hydrocarbua đa vòng, nhiễm độc thực phẩm, điển hình là hóa chất công nghiệp carbon tetrachlorid (CCl_4). Carbon tetrachlorid chính là chất được sử dụng để gây mô hình viêm gan trên thực nghiệm, đặc biệt là viêm gan mạn tính. Trong quá trình chuyển hóa, carbon tetrachlorid tạo ra các gốc tự do, dẫn tới tổn thương tế bào gan [13].

1.1.3. Bệnh lý viêm gan mạn tính

1.1.3.1. Khái niệm viêm gan mạn

Thuật ngữ viêm gan mạn (chronic hepatitis): Viêm gan mạn là một trong những hình thái bệnh lý thường gặp ở gan do nhiều nguyên nhân gây ra với biểu hiện viêm và hoại tử ở gan kéo dài ít nhất là 6 tháng [14],[15],[16].

Viêm gan mạn có thể là hậu quả của viêm gan cấp, mặc dù ở nhiều trường hợp bệnh tiến triển một cách âm thầm và chỉ thể hiện ở giai đoạn mạn tính. Tiến triển của viêm gan mạn có thể dẫn tới xơ gan và ung thư tế bào gan nguyên phát, là nguyên nhân gây tử vong ở bệnh nhân viêm gan.

Có nhiều nguyên nhân dẫn tới viêm gan mạn tính, thường gặp nhất là do virus viêm gan, ngoài ra còn do rượu, do hóa chất, do thuốc hoặc nguyên nhân tự miễn [14],[16].

1.1.3.2. Phân loại viêm gan mạn

Phân loại theo nguyên nhân:

- Viêm gan mạn do virus: Các virus viêm gan B (HBV), viêm gan C (HCV) và viêm gan do HBV + HDV là những virus dễ tiến triển đến viêm gan mạn thường gặp nhất.

- Viêm gan mạn tự miễn: Dựa vào chẩn đoán huyết thanh người ta phân ra các type 1, 2, 3.

- Viêm gan mạn do thuốc và nhiễm độc (đặc biệt là viêm gan mạn do rượu).

- Viêm gan mạn không rõ nguyên nhân hay viêm gan mạn có nguồn gốc ẩn.

Phân loại theo mức độ:

Dựa trên đánh giá về mô bệnh học qua sinh thiết gan tức là dựa vào mức độ viêm và hoại tử.

- Viêm khoảng cửa.

- Viêm xâm lấn cả vào tiểu thụ gan (thâm nhiễm các tế bào viêm) và hoại tử xung quanh khoảng cửa (hoại tử mối gặm).

- Hoại tử từ khoảng cửa đến tĩnh mạch trung tâm tạo thành các cầu nối (hoại tử cầu nối - bridging necrosis).

Để có thể đánh giá một cách chi tiết hơn người ta dùng chỉ số hoạt tính mô học (Histologic Activity Index- HAI) do Knodell- Ishak đề ra bằng cách cho điểm.

1.1.3.3. Sơ bộ cơ chế bệnh sinh của viêm gan mạn

Trong viêm gan mạn và xơ hóa gan, quá trình tiến triển của mô gan xảy ra từ từ thông qua sự hủy hoại tế bào gan gây ra bởi viêm gan. Tế bào hình sao, một loại tế bào giàu vitamin A, được cho là đóng vai trò then chốt trong quá trình xơ gan [18],[19]. Quá trình này gây ra tăng sinh và di chuyển tế bào hình sao, tạo ra nhiều collagen, thay thế các tế bào nhu mô gan gây ra xơ gan [20]. Hiện nay, đáp ứng miễn dịch được xem là cơ chế bệnh sinh chủ yếu của quá trình gây xơ hóa tế bào gan. Nhiều tế bào, cytokin của hệ thống miễn dịch tham gia hoạt hóa tế bào hình sao tham gia vào quá trình viêm gan mạn và dẫn tới xơ gan [16],[20]. Quá trình đáp ứng miễn dịch dẫn tới bệnh lý xơ gan không chỉ xảy ra ở các trường hợp viêm gan do virus mà còn xảy ra ở cả viêm gan do rượu, viêm gan nhiễm mỡ, viêm gan tự miễn. Càng ngày các nhà nghiên cứu càng thấy phản ứng miễn dịch tế bào đóng vai trò quan trọng trong bệnh sinh các viêm gan mạn (xin xem chi tiết ở mục 1.1.3.5).

Quá trình viêm gan mạn tính thường dẫn tới hậu quả là xơ hóa gan hay bệnh cảnh xơ gan. Diễn tiến xơ gan là diễn tiến chậm qua nhiều năm, nhiều khi nguyên nhân đã mất nhưng bệnh vẫn tiếp tục tiến triển.

1.1.3.4. Triệu chứng và chẩn đoán viêm gan mạn

Đối với viêm gan mạn giai đoạn ban đầu hoặc chưa có xơ gan, hoặc có xơ gan nhưng chức năng gan còn bù, rất ít triệu chứng lâm sàng có thể được

phát hiện. Bệnh nhân có thể có các triệu chứng cơ năng không điển hình như chán ăn, mệt mỏi, buồn nôn, rối loạn tiêu hóa. Ở giai đoạn này chẩn đoán viêm gan mạn tính chủ yếu dựa trên các xét nghiệm xác định nguyên nhân (như viêm gan do virus, do rượu hoặc do tự miễn) và xét nghiệm xác định mức độ tổn thương gan thông qua các chỉ số enzym gan (ALT, AST), bilirubin, albumin hoặc đánh giá mức độ xơ hóa gan thông qua biện pháp xâm lấn (sinh thiết gan) hoặc không xâm lấn (chất chỉ điểm, đo độ đàn hồi gan) [14].

Đối với các tình trạng viêm gan mạn tính đã có xơ hóa gan mất bù, triệu chứng lâm sàng rõ ràng và điển hình hơn, có thể rầm rộ và thậm chí dẫn tới tử vong. Bệnh nhân biểu hiện các hội chứng nặng nề như hội chứng tăng áp lực tĩnh mạch cửa gây xuất huyết thực quản, hội chứng suy gan: Chán ăn, ăn chậm tiêu, đầy bụng, rối loạn kinh nguyệt, liệt dương, vú to, chảy máu chân răng, chảy máu cam, chảy máu dưới da, rụng lông tóc, móng tay khum mặt kính đồng hồ, ngón tay dùi trống gập trong xơ gan mật, mặt ngực và chi trên gầy, 2 chân phù mềm, da vàng nhẹ, thiếu máu, nốt giãn mạch hình sao ở ngực và lưng, hồng ban lòng bàn tay, môi đỏ, lưỡi bóng đỏ, teo tinh hoàn, viêm thần kinh ngoại biên, gan nhỏ lại [14].

Chẩn đoán viêm gan mạn tính thường trải qua các bước quan trọng: Xác định tình trạng có viêm mạn (thông qua các xét nghiệm về ALT/AST, chẩn đoán hình ảnh (siêu âm, chụp cắt lớp hoặc chụp cộng hưởng từ gợi ý tình trạng thay đổi cấu trúc gan) hoặc sinh thiết gan thấy sự thâm nhiễm các tế bào viêm tại khoảng cửa), xác định nguyên nhân viêm gan, xác định mức độ tổn thương gan sử dụng các thang phân loại như Knodell, Ishak-Knodell, Metavir (xem bảng 3.1) [17].

Bảng 1.1. Giai đoạn xơ hóa gan theo các thang điểm [17]

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

1.1.3.5. Đáp ứng miễn dịch trong viêm gan mạn**Liên quan giữa viêm gan mạn và đáp ứng miễn dịch**

Viêm gan mạn là một quá trình viêm mạn tính gây ra do nhiều nguyên nhân xảy ra tại gan. Đáp ứng miễn dịch của cơ thể chống lại các nguyên nhân gây bệnh tại gan có thể mang lại hiệu quả đối với kháng nguyên bệnh lý đó, tuy nhiên cũng có thể gây ra những biến đổi về cấu trúc hoặc chức năng của gan, đặc biệt là xơ hóa gan.

Trong viêm gan mạn và xơ hóa gan, quá trình tiến triển của mô gan xảy ra từ từ thông qua sự hủy hoại tế bào gan gây ra bởi viêm gan. Tế bào hình sao, một loại tế bào giàu vitamin A, được cho là đóng vai trò then chốt trong quá trình xơ gan [18]. Quá trình này gây ra tăng sinh và di chuyển tế bào hình sao, tạo ra nhiều collagen, thay thế các tế bào nhu mô gan gây ra xơ gan [20]. Hiện nay, đáp ứng miễn dịch được xem là cơ chế bệnh sinh chủ yếu của quá trình gây xơ hóa tế bào gan. Nhiều tế bào, cytokin của hệ thống miễn dịch gây ra hoạt hóa tế bào hình sao tham gia vào quá trình viêm gan mạn và dẫn tới xơ gan [16],[20]. Quá trình đáp ứng miễn dịch dẫn tới bệnh lý xơ gan không chỉ

xảy ra ở các trường hợp viêm gan do virus mà còn xảy ra ở cả viêm gan do rượu, viêm gan nhiễm mỡ, viêm gan tự miễn.

Suy giảm miễn dịch trong các bệnh lý viêm gan dẫn tới tình trạng giảm đáp ứng và chống chọi của cơ thể với tác nhân gây bệnh, dần dần gây xơ hóa gan và bùng phát hoặc tái phát bệnh. Xơ gan liên quan tới suy giảm miễn dịch là một hiện tượng thường gặp, phối hợp bởi cả suy giảm miễn dịch và tăng phản ứng viêm hệ thống và có thể là nguyên nhân của 30% số trường hợp tử vong [2].

Hệ thống miễn dịch và gan

Hệ thống miễn dịch bẩm sinh bao gồm cả thành phần miễn dịch dịch thể và tế bào như: thụ thể nhận diện kiểu mẫu (pattern recognition receptors: PRR), các peptid kháng khuẩn, tế bào miễn dịch (đại thực bào, tế bào NK, ..), các cytokin. Hệ thống miễn dịch bẩm sinh chứa những PRR trên bề mặt màng và trong tế bào để nhận biết các dấu hiệu nguy hiểm của bệnh nguyên thông qua nhận biết các kiểu mẫu phân tử liên quan tới bệnh nguyên (pathogen-associated molecular patterns: PAMP), kiểu mẫu phân tử liên quan tới tổn thương (danger-associated molecular patterns: DAMP), kiểu mẫu phân tử liên quan tới vi sinh vật (Microbial-associated molecular patterns: MAMP). PAMP là cấu trúc được bảo tồn quan trọng đối với bệnh nguyên, nhưng không thể bị đột biến bởi bệnh nguyên nhằm trốn thoát khỏi miễn dịch bẩm sinh. DAMP biểu thị tổn thương tế bào của vật chủ, gây ra nguy hiểm cho cơ thể [2].

PRR có ở các tế bào miễn dịch, cũng như ở các tế bào nhu mô gan. Sự nhận biết bất cứ phân tử bệnh nguyên nào bởi PRR cũng dẫn tới hoạt hóa dòng bỏ thể, cytokin, các peptid kháng khuẩn và tế bào đuôi gai, dẫn tới một sự tương tác phức tạp của các phản ứng gây viêm và chống viêm, tăng miễn dịch và ức chế miễn dịch ở cơ thể vật chủ. Tế bào đại thực bào và tế bào đuôi gai là những tế bào đơn nhân có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân và là các tế bào biểu hiện kháng nguyên liên quan đến phức hợp hòa hợp mô chủ yếu -II

(MHC-II) của tế bào T trong hệ thống miễn dịch đặc hiệu. Ở gan, những tế bào này được gọi là tế bào Kupffer, hiện diện ở những xoang gan. Miễn dịch đặc hiệu phụ thuộc vào miễn dịch không đặc hiệu ở các hoạt động như biểu hiện kháng nguyên, sản xuất cytokin, không có những hoạt động này miễn dịch đặc hiệu bị bất hoạt. Tế bào đơn nhân là các tế bào trung gian trung tâm của đáp ứng miễn dịch và bài tiết interleukin -1 (IL-1) và yếu tố hoại tử u (TNF- α), những yếu tố này chịu trách nhiệm cho việc thu nhận các tế bào viêm [21].

Gan là nguồn cung cấp quan trọng PRR trong cơ thể, như protein C phản ứng (C-reactive protein), protein gắn lipopolysaccharide (LPS), protein nhận biết peptidoglycan, CD14 hòa tan. Gan cũng biểu hiện nhiều loại PRR như thụ thể giống Toll (Toll-like receptor: TLR), thụ thể giống NOD (nucleotide binding oligomerization), RNA helicase. TLR nhận biết các vi sinh vật ở trên bề mặt tế bào, hiện nay có 10 loại TLR được phát hiện trên người. Tại gan, nhiều loại tế bào biểu hiện TLR. Ngoài ra, gan còn là nơi tổng hợp chính hệ thống bổ thể, hệ thống chịu trách nhiệm điều hòa hệ miễn dịch, opsonin hóa và gây độc tế bào.

Miễn dịch đặc hiệu là miễn dịch thông qua các tế bào lympho (lympho B với miễn dịch dịch thể và lympho T với miễn dịch tế bào) để chống lại tác nhân gây bệnh. Gan chứa nhiều tế bào lympho từ nhu mô cho tới hệ thống tĩnh mạch cửa. Tại gan, tế bào T CD8+ thường gặp hơn T CD4+ [21].

Đáp ứng miễn dịch của cơ thể trong một số bệnh lý viêm gan mạn:

- Đáp ứng miễn dịch trong bệnh lý viêm gan do virus:

+ Viêm gan B:

Miễn dịch không đặc hiệu:

HBV lây nhiễm qua đường máu hoặc dịch cơ thể, chỉ một lượng nhỏ virus cũng đủ để lây nhiễm tế bào gan. Virus xâm nhập vào tế bào gan thông qua taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP), một thụ thể có ở màng

đáy tế bào. Sau khi protein vỏ hòa màng, capsid xâm nhập vào bào tương và DNA của virus được giải phóng vào nhân. Khi xâm nhập vào nhân, HBV có thể tích hợp với gen vật chủ hoặc có thể ở dạng DNA vòng (cccDNA) không tích hợp. cccDNA được sử dụng như khuôn mẫu để virus nhân lên dẫn tới lây nhiễm sang nhiều tế bào gan hơn, cccDNA có thể tồn tại dai dẳng sau khi HBsAg mất đi [22].

Hạn chế về kĩ thuật và khó khăn trong việc xác định bệnh nhân ở giai đoạn đầu tiên của bệnh làm giới hạn hiểu biết của con người đối với các đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cơ thể đối với HBV.

Cơ chế đề kháng virus nội bào được cảm nhận và điều chỉnh bởi các PRR như TLR màng tế bào và các thụ thể trong nguyên sinh chất như gen gây cảm ứng acid retinoic I (retinoic acid inducible gene I: RIG-I) và gen biệt hóa melanoma 5 (melanoma differentiation gene 5: MDA5). RNA virus được chứng minh là hoạt hóa thụ cảm RIG-I, gây ra tăng giải phóng IFN ở tế bào gan người, tuy nhiên những IFN này không bao gồm IFN typ I. Sự tăng giải phóng IFN tại tế bào gan và có thể ở những tế bào khác gây ra hoạt hóa hàng loạt gen có tác dụng chống lại virus, tuy nhiên phản ứng này yếu [23]. Do đáp ứng yếu của hệ thống miễn dịch không đặc hiệu với virus, HBV được coi là một virus “tàng hình” (steath virus) [24].

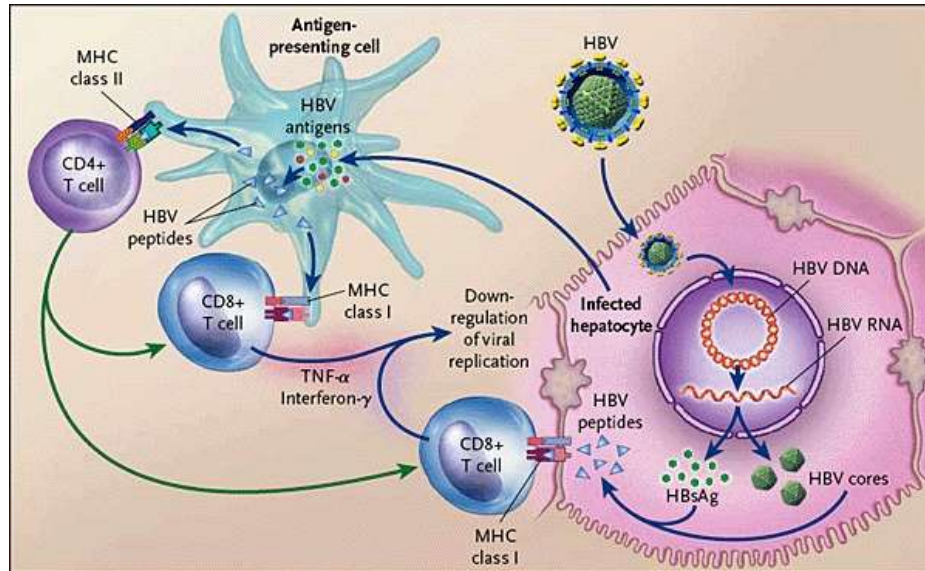
Mặc dù có sự đáp ứng yếu về IFN của hệ miễn dịch người với HBV, ở nhiều người lớn nhiễm bệnh, HBV vẫn có thể được cơ thể loại trừ. Điều này có thể là do các cơ chế đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu khác như hoạt hóa tế bào NK, tế bào đuôi gai, tế bào Kupffer, đồng thời là cơ sở trình diện kháng nguyên thông qua MHC cho đáp ứng miễn dịch đặc hiệu [25].

Miễn dịch đặc hiệu: Miễn dịch đặc hiệu đối với HBV thông qua cả tế bào B và tế bào T. Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với HBV xảy ra sau khi đáp

ứng ban đầu với miễn dịch không đặc hiệu và có thể được duy trì lâu dài, là cơ sở để tiêm vắc xin viêm gan B.

Miễn dịch dịch thể: Kháng thể kháng nguyên bề mặt HBV (anti-HBs) có tác dụng trung hòa virus và liên quan tới khả năng thải trừ virus. Globulin miễn dịch kháng HBV có thể được sử dụng sau khi phơi nhiễm hoặc dự phòng lây viêm gan B từ tạng ghép. Tuy nhiên, anti-HBs xuất hiện tương đối muộn và sự tăng lên của anti-HBs không đảm bảo chắc chắn loại trừ HBV. Đáp ứng miễn dịch dịch thể có vai trò quan trọng trong việc thải trừ dài hạn HBV và bảo vệ cơ thể khỏi nhiễm HBV.

Miễn dịch tế bào: Ba dạng cấu trúc khác nhau của protein virus (HBsAg, HBeAg, HBcAg) gây ra hoạt hóa các dòng tế bào T khác nhau. HbeAg có thể gây cảm ứng tế bào Th2, trong khi HbcAg gây cảm ứng tế bào Th1. Đáp ứng Th2 với HbeAg vượt trội hơn so với Th1 đáp ứng với HbcAg, dẫn tới sự suy giảm tế bào Th1 trong cơ thể [25]. Những đáp ứng này bao gồm cả hai phức hợp hòa hợp mô MHC lớp II với Th CD4+ và MHC lớp I với Tc CD8+ (hình 1.1) [26]. Đáp ứng miễn dịch thông qua tế bào có vai trò quan trọng trong việc thải trừ virus nhưng không làm ly giải các tế bào bị lây nhiễm. Có 2 con đường loại trừ virus: Thứ nhất Th1 hoạt hóa tế bào đại thực bào có tác dụng thải loại các hạt virus, thứ hai là tế bào Th2 hoạt hóa lympho B tạo kháng thể đặc hiệu, có tác dụng gắn với bề mặt các hạt virus và tạo ra quá trình opsonin hóa. Trong nhiễm HBV, cả hai loại tế bào CD4+ và CD8+ đều được hoạt hóa.



Hình 1.1. Đáp ứng miễn dịch tế bào với HBV [26]

HBV thoát miễn dịch:

Cơ chế của HBV thoát miễn dịch chưa được hiểu biết đầy đủ. Tuy nhiên, HBV thoát miễn dịch là hậu quả của nhiều yếu tố, bao gồm suy giảm miễn dịch chống HBV, do cccDNA và nhiễm trùng ở các vị trí đặc quyền miễn dịch. Virus có thể thoát miễn dịch bằng cách tồn tại những vị trí mà hệ miễn dịch không thể tác dụng tới. HBV mã hóa enzym sao chép ngược cho phép virus tích hợp với DNA trong tế bào vật chủ và trở nên không thể tiếp cận đối với hệ miễn dịch [27].

Một cách khác làm cho virus chống lại hệ miễn dịch là thông qua khả năng làm mất tính kháng nguyên. Đột biến gen lõi có thể dẫn tới mất biểu hiện kháng nguyên e (HBeAg), một loại kháng nguyên là đích quan trọng của hệ miễn dịch, điều này khiến virus “tàng hình”. Ở những bệnh nhân viêm gan B mạn tính, đáp ứng của CD4+ và CD8+ suy giảm, sự suy giảm này có liên quan tới tăng cao HbeAg, một loại kháng nguyên nucleocapsid. Mặc dù có đáp ứng thấp, tế bào CD8+ được tìm thấy ở gan và có thể gây ra phản ứng viêm nhưng lại thất bại trong việc thải trừ virus [28].

+ Viêm gan C:

HCV là một virus có vật chất di truyền RNA thuộc họ Flaviviridae. HCV RNA mã hóa một chuỗi polyprotein được xử lý đồng thời hoặc sau dịch mã bởi vật chủ và protease của virus để giải phóng hàng loạt protein trưởng thành khác. Những protein này bao gồm lõi (capsid), vỏ glycoprotein E1, E2, các protein không cấu trúc khác: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, và NS5B. Những protein này tạo ra phức hợp replicase và đồng thời tham gia vào tổ hợp virus. Sao chép RNA thông qua một phiên bản RNA âm, RNA polymerase phụ thuộc NS5B RNA của HCV thiếu hoạt tính đợc và rà soát do vậy virus thay đổi liên tục và lưu hành trong máu vật chủ dưới dạng các biến thể [29].

Miễn dịch không đặc hiệu:

Sau khi xâm nhập vào cơ thể người thông qua lây truyền theo đường máu, virus nhân lên tạo ra hàng loạt các kiểu mẫu phân tử liên quan tới bệnh nguyên (PAMP) và hoạt hóa IFN, biểu hiện gen kích hoạt tạo IFN (IFN-stimulated gene: ISG). ISG chi phối rất nhiều hoạt động kháng virus. Khi virus biểu hiện PAMP, hoạt động nhận diện thực hiện bởi protein gắn RNA trong nguyên sinh chất, gene cảm ứng acid retinocid I (RIG-I) được tạo thuận lợi. RIG-I gắn RNA xúc tác phản ứng ubiquitin và tạo ra phức hợp truyền tin, phức hợp này cuối cùng hoạt hóa protein tín hiệu kháng virus ti thể (mitochondrial antiviral signaling protein: MAVS). Quá trình hoạt hóa MAVS dẫn tới hoạt hóa con đường yếu tố đáp ứng interferon – 3 (IRF3) và NFκB, cần thiết cho quá trình tạo IFN. MAVS là con đường nhận biết HCV quan trọng bậc nhất trong tế bào gan nhằm kích thích gen biểu hiện IFNλ [30]. RIG-I có thể nhận biết bất kỳ RNA nào của HCV trước khi sao chép và dịch mã.

Sự sao chép HCV RNA đòi hỏi cần tạo ra một RNA trung gian kép (dsRNA). DsRNA liên kết và kích hoạt thụ thể giông Toll 3 (TLR3), sự tham gia của TLR3 kích thích sự biểu hiện gen IFN [31].

HVC kích thích miễn dịch không đặc hiệu ở cả trường hợp viêm gan cấp hoặc mạn tính với sự tham gia tích cực của hệ thống IFN và ISG. Tế bào gan có thể biểu hiện cả IFN type I (IFN α/β) hoặc IFN type III (IFN λ) và đáp ứng với các IFN type 2 (IFN γ). Ngoài ra, các tế bào khác cũng tham gia sản xuất IFN như tế bào đuôi gai (DC), tế bào NK, tế bào T.

Tế bào NK: Là một trong những tế bào tham gia miễn dịch không đặc hiệu sớm nhất tại gan khi cơ thể nhiễm HCV, tuy nhiên vai trò của tế bào này chưa được biết rõ ràng. Tế bào NK có lẽ tham gia vào bài tiết các cytokin bao gồm IFN và điều phối biểu hiện ISG, ức chế sao chép virus, kích thích DC trưởng thành và giải phóng các chemokin nhằm huy động các tế bào khác như tế bào lympho và tế bào viêm. Tế bào NK có thể kích thích miễn dịch đặc hiệu thông qua tiêu diệt kháng nguyên và trình diện, hoạt hóa T CD4+ [32].

Tế bào DC: Ảnh hưởng tới kết quả của nhiễm HCV thông qua sản xuất IFN và các cytokin khác ảnh hưởng trực tiếp tới sự nhân lên của virus và hoạt hóa tế bào T, thông qua trình diện mạnh mẽ kháng nguyên với tế bào T. Tế bào DC có thể bị giảm trong máu ở những bệnh nhân nhiễm HCV mạn tính do huy động quá nhiều tại gan [33].

Các tế bào khác như tế bào mono, đại thực bào, tế bào Kupffer: Những tế bào này được cho là có vai trò chủ yếu trong quá trình viêm xảy ra tại gan. Những tế bào này biểu hiện rất nhiều loại thụ thể có thể xác định PAMP. Tế bào Kupffer người có thể sản xuất các cytokin gây viêm: IL – 1, IL – 18. Tế bào Kupffer, mono và đại thực bào ở gan có thể kích thích phản ứng viêm và xơ hóa gan thông qua giải phóng hàng loạt các cytokin bao gồm IL – 10, IL – 6, IL – 12, TNF [34].

Miễn dịch đặc hiệu:

Miễn dịch dịch thể: Mặc dù kháng thể kháng HCV đã được quan sát thấy ở người nhiễm HCV nhưng vai trò của những kháng thể này còn tranh

cãi. Đáp ứng miễn dịch dịch thể xảy ra tương đối chậm ở người nhiễm HCV cấp tính so với các loại virus khác. Thanh thải virus có thể xảy ra khi không có mặt kháng thể kháng HCV và kháng thể kháng HCV có thể suy giảm hoặc biến mất khi tự khỏi hoặc khỏi sau điều trị. Hầu hết các kháng thể kháng HCV là kháng thể trung hòa glycoprotein E1, đặc biệt là E2 [29].

Miễn dịch tế bào: Miễn dịch thông qua tế bào T đóng vai trò ở cả việc bảo vệ cơ thể khỏi HBV và đồng thời vai trò sinh lý bệnh. Tế bào T kiểm soát HCV thông qua sản xuất IFN γ và tiêu diệt các tế bào nhiễm HCV. Cả tế bào CD4 $^{+}$ và CD8 $^{+}$ đều tham gia miễn dịch đặc hiệu chống lại HCV. IFN γ kích thích các hoạt động kháng virus tại tế bào gan, ức chế sao chép HCV mà không tiêu diệt tế bào, tuy nhiên các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên tiêu diệt tế bào T nhiễm HCV. Trong những trường hợp nhiễm HCV dai dẳng, tế bào T trở nên kiệt quệ trong khi hoạt tính của IFN γ vẫn còn duy trì [35].

Trong khi các tế bào gan nhiễm HCV có thể giảm thời gian sống, nhưng HCV không được cho là gây tổn thương trực tiếp tế bào. Tế bào T có thể đóng vai trò quan trọng hơn trong việc phá hủy tế bào T trong giai đoạn nhiễm virus cấp hơn. Trong giai đoạn mạn tính, hầu hết các tế bào T tại gan không đặc hiệu đối với HCV, những tế bào này chủ yếu góp phần vào việc gây phản ứng viêm [36].

HCV thoát miễn dịch và suy giảm miễn dịch trong viêm gan C mạn:

Virus viêm gan C có thể gây ra tình trạng viêm gan mạn ở 80% người mắc nếu không được điều trị. Như vậy trong rất nhiều trường hợp, HCV thoát khỏi sự kiểm soát và tiêu diệt của hệ thống miễn dịch.

Cần chú ý rằng ngay cả trong các trường hợp nhiễm HCV mạn tính thì quá trình xâm nhập, nhận diện, sản sinh ISG và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu vẫn xảy ra. HCV và ISG RNA có thể tìm thấy trong cùng một tế bào.

Biểu hiện ISG ở gan liên quan tới sự giảm rõ ràng nồng độ virus. Điều này gợi ý rằng, miễn dịch không đặc hiệu có vai trò quan trọng trong cơ chế kiểm soát HCV giai đoạn cấp tính, nhưng đồng thời cũng đặt ra một câu hỏi: IFN nội sinh và ISG không hoàn toàn tiêu diệt được virus. Điều này cũng được khẳng định khi hiệu quả điều trị bằng liệu pháp IFN rất thấp nếu trước đó có sự biểu hiện ISG cao. Có nhiều cơ chế liên quan tới hiện tượng này, bao gồm: HCV có thể tắt sự dịch mã ISG của vật chủ mà không ảnh hưởng tới sự nhân lên của virus, một số protein của virus như E2 và NS5A có thể tương tác với tín hiệu IFN và ức chế vai trò của ISG. Ngoài ra, sự sụt giảm số lượng HCV có thể có lợi cho virus vì điều này hạn chế biểu hiện kháng nguyên do đó ức chế hoạt tính tế bào T [29].

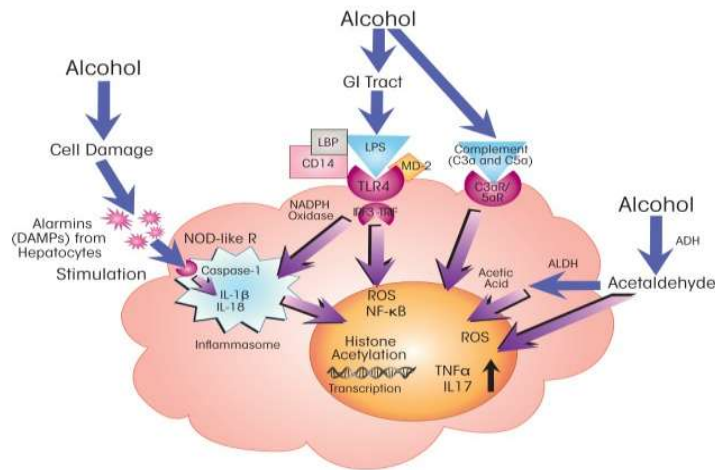
Đáp ứng miễn dịch đối với HCV xảy chậm kể cả trong trường hợp được cải thiện bởi điều trị thuốc. Sự trì hoãn này có thể liên quan một phần với đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu. Khi sự nhiễm HCV trở nên dai dẳng thì đáp ứng của tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ cũng bị suy yếu, góp phần làm cho HCV thoát miễn dịch [37]. Cơ chế của việc suy giảm đáp ứng miễn dịch của tế bào T trong nhiễm HCV chưa rõ ràng, tuy nhiên được cho là sự suy kiệt của tế bào T CD4⁺ dẫn tới giảm hiệu quả của tế bào T CD8⁺. Mặc dù sự suy yếu của tế bào T góp phần làm virus HCV tồn tại dai dẳng nhưng điều này cũng góp phần làm giảm tổn thương tế bào gan gây ra do đáp ứng miễn dịch thông qua tế bào [35].

Một cơ chế khác dẫn tới sự thất bại của đáp ứng miễn dịch là hiện tượng thoát miễn dịch do cơ chế sao chép lỗi của HCV. Cơ chế sao chép không được kiểm soát này của HCV có thể tạo ra rất nhiều thay đổi trong chuỗi acid amin của virus, điều này dẫn tới sự tiến hóa virus nhanh chóng dưới áp lực đáp ứng miễn dịch của vật chủ [38].

- Viêm gan do rượu:

Rượu là hóa chất có thể gây ra ảnh hưởng nhiều mặt của hệ miễn dịch dẫn tới suy giảm miễn dịch. Tại gan, nhiều bằng chứng cho thấy phản ứng viêm đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của bệnh gan do rượu (ALD). Bên cạnh sự tham gia rất lớn của hệ thống miễn dịch không đặc hiệu, bệnh lý ALD còn có sự tham gia của miễn dịch đặc hiệu.

Nhiều tế bào của hệ thống miễn dịch không đặc hiệu tham gia và thể hiện vai trò trong việc khởi phát và tiến triển của ALD. Quá trình giáng hóa oxy hóa rượu tại gan bởi dehydrogenase và hệ thống cytochrome P450 có thể dẫn tới tổn thương protein, lipid và thậm chí các cấu trúc tế bào. Mặt khác, sản phẩm chuyển hóa của quá trình giáng hóa rượu là acetaldehyde có thể cũng gây tổn thương tế bào gan [39]. Những sự tổn thương này diễn ra tại gan dẫn tới khởi phát đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, sau đó tới các phản ứng viêm kéo dài, thậm chí khi không còn sự xuất hiện của rượu trong cơ thể [40]. Kết quả của những quá trình này dẫn tới sự nhận diện của những thụ thể đối với kiểu mẫu phân tử liên quan tới tổn thương (DAMP). DAMP được giải phóng ra từ những tế bào bị tổn thương, sự lặp lại liên tục quá trình này dẫn tới hoạt hóa kéo dài hệ thống miễn dịch không đặc hiệu và gây viêm mạn tính tại gan. Bên cạnh đó, tiêu thụ quá nhiều rượu có thể dẫn tới những thay đổi tại ruột như làm giảm mức độ liên kết giữa những tế bào tại ruột, giải phóng các yếu tố gây đáp ứng miễn dịch như lipopolysaccharide (LPS). Những yếu tố này cũng tham gia khởi động miễn dịch không đặc hiệu tại gan (hình 1.2) [41].



Hình 1.2. Tác dụng của rượu lên phản ứng miễn dịch không đặc hiệu tại gan [41]

Tế bào Kupffer và hệ thống bổ thể đóng vai trò rất quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của rượu trong viêm gan mạn do rượu. LPS kích hoạt tế bào Kupffer thông qua thụ thể TLR4 và gây ra tăng bài tiết các cytokin bao gồm TNF, IL-6, IL-1 và các chất hóa ứng động. Sự bài tiết các chất này dẫn tới khởi động quá trình tiền viêm và viêm ở mô gan, ví dụ như yếu tố hoại tử u TNF bài tiết bởi tế bào Kupffer có thể gây tương tác với thụ thể TNF ở tế bào gan dẫn tới hoại tử, chết theo chương trình. Bên cạnh tế bào Kupffer, hàng loạt tế bào khác của hệ thống miễn dịch không đặc hiệu của bị ảnh hưởng và hoạt hóa bởi rượu như tế bào giết tự nhiên NK, tế bào DC [41].

Phơi nhiễm ngắn hạn hoặc dài hạn với rượu đều có thể dẫn tới sự hoạt hóa hệ thống miễn dịch đặc hiệu, bao gồm sự trình diện kháng nguyên để hoạt hóa tế bào T và tế bào B. Tế bào DC tại gan là một trong những tế bào có khả năng trình diện kháng nguyên mạnh nhất [42]. Những nghiên cứu trên bệnh nhân ALD giai đoạn đầu đã xác định được kháng thể trong vòng tuần hoàn có đích tác dụng là tế bào gan tự thân bị biến đổi bởi rượu, bên cạnh đó ở những bệnh nhân nghiện rượu cho thấy rằng có sự tăng cao sản xuất gamma globulin. Kháng thể kháng phospholipid có thể quan sát thấy ở 80% bệnh

nhân viêm gan hoặc xơ gan do rượu, nhưng không phổ biến ở những người uống rượu mà không có tổn thương gan nặng nề [43]. Những bằng chứng về giải phẫu bệnh học cho thấy tổ chức gan ở người có bệnh gan do rượu giàu thành phần bạch cầu, bao gồm cả lympho T CD8+ và CD4+ [44].

Suy giảm đáp ứng miễn dịch trong bệnh lý xơ gan

Bệnh lý xơ gan là bệnh lý mạn tính xảy ra do rất nhiều nguyên nhân, tuy nhiên khi xơ gan xảy ra có thể dẫn tới thay đổi đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu do sự suy giảm của cả hệ thống miễn dịch tại chỗ ở gan hoặc miễn dịch hệ thống, xơ gan gây ra tình trạng suy giảm miễn dịch [2],[45],[46]. Xơ gan liên quan tới suy giảm miễn dịch là một hiện tượng thường gặp, phối hợp bởi cả suy giảm miễn dịch và tăng phản ứng viêm hệ thống, và là nguyên nhân của 30% số trường hợp tử vong [2].



Hình 1.3. Suy giảm miễn dịch trong xơ gan [46].

- Suy giảm đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu:

Xơ gan ảnh hưởng tới miễn dịch không đặc hiệu bằng cách làm suy giảm tổng hợp và chức năng của các PRR và nhiều loại protein được sản xuất tại gan, điều này dẫn tới suy giảm khả năng chống lại bệnh tật của cơ thể. Sự thay đổi của các PRR và những con đường tín hiệu của chúng là nguyên nhân chính dẫn tới suy giảm chức năng của hệ thống miễn dịch không đặc hiệu

trong xơ gan, hiện tượng này có thể do sự tiếp xúc kéo dài với kháng nguyên (như PAMP), do chất độc (như rượu) và tổn thương tế bào gan [47].

Suy giảm chức năng của các tế bào đơn nhân tại gan cũng là nguyên nhân dẫn tới suy giảm miễn dịch trong xơ gan. Suy giảm chức năng những tế bào này dẫn tới giảm hóa ứng động, giảm các hoạt động thực bào, giáng hóa và giảm sản xuất enzym của lysosom. Suy giảm miễn dịch đặc trưng bởi tăng các cytokin chống viêm như IL-6, IL-10 và suy giảm các cytokin gây viêm như IL-1, TNF- α [2]. Tế bào bạch cầu đa nhân trung tính là tế bào hàng đầu trong chống nhiễm khuẩn cũng bị tổn thương trong bệnh lý xơ gan, dẫn tới giảm sự phân phối tế bào này tới vị trí nhiễm khuẩn cũng như giảm hoạt tính thực bào.

Gan là nơi phá hủy nhiều loại cytokin như IL-1, IL-3, TNF- α , IFN, ... tuy nhiên trong bệnh lý xơ gan, gan không có khả năng loại trừ những cytokin này dẫn tới sự hoạt hóa quá mức các loại tế bào miễn dịch gây ảnh hưởng tới chức năng như di chuyển và thực bào.

- Suy giảm đáp ứng miễn dịch đặc hiệu:

Suy giảm miễn dịch đặc hiệu cũng phổ biến trên các bệnh nhân xơ gan. Suy giảm các tế bào lympho B và T ở những bệnh nhân có bệnh lý gan do rượu (ALD) đã được biết đến và được mô tả nhiều trong y văn.

Suy giảm chức năng tế bào B có liên quan mạnh mẽ tới xơ gan và/hoặc tăng áp lực tĩnh mạch cửa, độc lập với các nguyên nhân gây xơ gan [45]. Hơn nữa, nghiên cứu đã chỉ ra rằng ở những bệnh nhân xơ gan, giảm sản xuất IgG, TNF- β , giảm đáp ứng miễn dịch với vắc xin và tăng nhạy cảm với nhiễm khuẩn có liên quan tới suy giảm lympho B, đặc biệt là CD27+ [48].

Tỷ lệ Th1/Th2 rất quan trọng vì Th1 biểu hiện các cytokin chống xơ hóa và Th2 biểu hiện các cytokin gây xơ hóa. Ở bệnh nhân xơ gan, CD8+

tăng dẫn tới giảm tỷ lệ CD4+/CD8+. Sự hoạt hóa kéo dài các tế bào lympho T là kết quả của sự kích thích kháng nguyên kéo dài trong xơ gan, hoạt hóa của những tế bào này dẫn tới gia tăng quá trình chết theo chương trình và hủy hoại tế bào gan [21]. So với những người khỏe mạnh, bệnh nhân xơ gan biểu thị dấu ấn CD95+ chết theo chương trình cao hơn trong quần thể tế bào ghi nhớ. Những tế bào T nhớ này không thể phát triển sau khi có sự xâm nhập của kháng nguyên mới, dẫn tới suy giảm miễn dịch thứ phát do sự quá tải của hệ thống miễn dịch đặc hiệu.

1.1.3.6. Điều trị viêm gan mạn tính

Mục tiêu điều trị

Mục tiêu điều trị viêm gan mạn phụ thuộc vào nguyên nhân gây bệnh và giai đoạn bệnh. Đối với trường hợp phổ biến như viêm gan B và viêm gan C, mục tiêu điều trị là: Giảm nguy cơ bệnh tiến triển tới các bệnh lý gan mạn tính, giảm lây nhiễm cho người khác và giảm nguy cơ tiến triển tới các biến chứng dài hạn như xơ gan, ung thư gan và tử vong [14]. Đối với bệnh lý viêm gan mạn do miễn dịch, mục tiêu điều trị là đạt được bệnh thuyên giảm hoàn toàn và phòng ngừa bệnh gan tiến triển [49]. Đối với các viêm gan mạn khác do rượu hoặc do hóa chất, mục tiêu quan trọng nhất là kiêng rượu hoặc tránh phơi nhiễm với tiếp xúc, sau đó là kiểm soát các biến chứng của quá trình xơ gan [50].

Điều trị viêm gan mạn

- Điều trị triệu chứng viêm gan mạn và các biến chứng của viêm gan mạn:

Về cơ bản, cần phòng ngừa và giải quyết nguyên nhân gây viêm gan mạn và giảm tiến triển dẫn tới xơ gan. Bệnh nhân xơ gan cần có chế độ ăn cân hợp lý với đầy đủ năng lượng và protein nếu có ứ đọng dịch thì nên hạn chế natri. Suy dinh dưỡng, thiếu vitamin, các yếu tố vi lượng là các vấn đề gặp phải ở người xơ gan giai đoạn cuối. Do vậy, điều trị cần chú ý tới các yếu tố này.

Việc điều trị các triệu chứng và biến chứng liên quan đến viêm gan mạn, xơ gan có thể bao gồm các vấn đề: Cổ trướng và phù, hội chứng gan – thận, bệnh não do gan, thiếu máu, dễ chảy máu, xuất huyết do giãn tĩnh mạch thực quản, hội chứng gan – phổi.

- Điều trị nguyên nhân gây viêm gan mạn:

Đối với viêm gan do thuốc và do rượu, việc điều trị nguyên nhân chủ yếu bao gồm loại trừ hoặc tránh phơi nhiễm với nguyên nhân và điều trị tình trạng xơ gan. Đối với các viêm gan mạn gây ra do virus và viêm gan tự miễn, điều trị nguyên nhân trở nên đặc biệt quan trọng, giúp hạn chế diễn biến của quá trình xơ gan và gây ra các biến chứng.

Đối với các tình trạng nhiễm virus viêm gan:

+ Viêm gan B mạn tính:

Mục tiêu của việc điều trị nguyên nhân viêm gan B mạn tính là làm giảm bệnh tật và tử vong liên quan đến HBV. Thành công trong việc duy trì giảm tải lượng HBV liên quan mật thiết tới bình thường hóa ALT huyết thanh, mất HBeAg cùng hoặc không cùng với phát hiện kháng thể kháng HBe và cải thiện về mặt giải phẫu bệnh [54]. Khởi về virus học tức là ức chế virus trong máu, giảm kháng nguyên, ổn định sinh hóa dù ngưng điều trị.

Theo hướng dẫn của Bộ y tế Việt Nam (2019), việc điều trị được chỉ định khi bệnh nhân được xác định là đang mắc HBV miễn dịch hoạt động (immune – active), tức là:

- ALT tăng trên 2 lần giá trị bình thường hoặc có bằng chứng xác nhận có xơ hóa gan tiến triển/xơ gan bất kể ALT ở mức nào. Và
- HBV-DNA $\geq 10^5$ copies/ml (20.000 IU/ml) nếu HBeAg (+) hoặc HBV-DNA $\geq 10^4$ copies/ml (2.000 IU/ml) nếu HBeAg (-).

Cũng theo hướng dẫn điều trị này, điều trị cụ thể bao gồm: Tenofovir (300mg/ngày) hoặc entecavir (0,5 mg/ngày). Lamivudine (100mg/ngày) sử

dụng cho người bệnh xơ gan mất bù, phụ nữ mang thai. Adefovir dùng phối hợp với lamivudine khi có kháng thuốc. Đối với interferon (IFN) và peg-interferon (Peg-IFN): Peg-IFN α , IFN α (Peg-IFN α -2a liều 180mcg/tuần; Peg-IFN α -2b liều 1,5mcg/kg/tuần; IFN α liều 5 triệu IU/ngày hoặc 10 triệu IU/lần - 3 lần/tuần, tiêm dưới da từ 6-12 tháng. Cần theo dõi tác dụng không mong muốn của thuốc để xử trí kịp thời) ưu tiên sử dụng trong trường hợp phụ nữ muốn sinh con, đồng nhiễm viêm gan virus D, không dung nạp hoặc thất bại điều trị với thuốc ức chế sao chép HBV đường uống [51].

Xem xét ngừng thuốc ức chế sao chép HBV uống khi: Trường hợp HBeAg (+): sau 6-12 tháng có chuyển đổi huyết thanh HBeAg và HBV-DNA dưới ngưỡng phát hiện. Trường hợp HBeAg (-): HBV-DNA dưới ngưỡng phát hiện trong 3 lần xét nghiệm liên tiếp cách nhau mỗi 6 tháng.

+ Viêm gan C mạn tính:

Mục tiêu của việc điều trị HCV là ngăn ngừa tiến triển của bệnh, giảm nguy cơ diễn biến thành xơ gan và ung thư gan, dự phòng lây nhiễm trong cộng đồng. Về mặt virus học, mục tiêu là loại trừ virus ra khỏi cơ thể tức là tải lượng virus RNA dưới ngưỡng phát hiện ở tuần thứ 12 (SVR 12) hoặc SVR 24 đối với phác đồ có Peg-interferon (Peg-IFN) [52].

Theo hướng dẫn điều trị viêm gan C của Bộ y tế Việt Nam (2016), bệnh nhân sẽ được điều trị khi:

- HCV RNA (+) và anti-HCV dương tính
- Điều trị dựa trên xét nghiệm kiểu gen, chống chỉ định, tương tác thuốc và bệnh đi kèm
- Nếu không xác định được kiểu gen thì sử dụng phác đồ cho kiểu gen 6.

Điều trị tiêu chuẩn bao gồm sử dụng các thuốc kháng virus trực tiếp (DAA), các phác đồ có Peg-IFN nên là lựa chọn thay thế [52].

Hướng dẫn đã đưa ra các loại thuốc bao gồm DAA mới và các phác đồ chi tiết, như bảng dưới đây (bảng 1.2):

Bảng 1.2. Các thuốc sử dụng để điều trị viêm gan C tại Việt Nam

Tên thuốc	Dạng bào chế	Liều dùng
Peginterferon (PegIFN) α 2a	Bơm dung dịch 0,5ml chứa 180 μ g, 135 μ g, 90 μ g	180 μ g/lần/tuần, tiêm dưới da bụng, 12-24 tuần (giảm liều nếu có tác dụng bất lợi)
Peginterferon (PegIFN) α 2b	Lọ bột hoặc bơm tiêm chứa 100 μ g, 80 μ g, 50 μ g	1,5 μ g/kg/lần/tuần, tiêm dưới da bụng, 12-24 tuần (giảm liều nếu có tác dụng bất lợi)
Ribavirin (RBV)	Viên nang 200, viên nén 400 và 500mg	1000 mg cho người dưới 75kg; 1200mg cho người trên 75kg; uống hàng ngày trong 12, 24 tuần tùy phác đồ (giảm liều nếu có tác dụng bất lợi)
Sofosbuvir (SOF)	Viên nén 400mg	1 viên/ngày, uống, buổi sáng (không sử dụng cho người bệnh có mức lọc cầu thận <30ml/phút/1,73m ²).
Daclatasvir (DCV)	Viên nén 30mg, 60mg	1 viên/ngày, uống, buổi sáng
Sofosbuvir/ Ledipasvir (LDV)	Viên nén chứa 400mg SOF /90mg LDV	1 viên/ngày, uống, buổi sáng, tránh các thuốc kháng a xít
Sofosbuvir/ Velpatasvir (VEL)	Viên nén chứa 400mg SOF /100mg VEL	1 viên/ngày, uống, buổi sáng
Paritaprevir (PTV)/ Ombitasvir (OBV)/ Ritonavir	Viên nén chứa: 75mg PTV/12,5mgOBV/ 50mg ritonavir	2 viên/ngày, uống, buổi sáng, uống trong bữa ăn
Dasabuvir (DSV)	Viên nén 250mg	2 viên/ngày, uống, 1 viên buổi sáng, 1 viên buổi chiều, uống trong bữa ăn.
Simeprevir (SMV)	Viên nang 150 mg	1 viên/ngày, uống trong bữa ăn
Grazoprevir (GZR)/elbasvir (EBR)	Viên nén chứa Grazoprevir 100mg /elbasvir 50mg	1 viên/ngày

Bảng 1.3. Phác đồ điều trị người bệnh viêm gan C không xơ gan

Kiểu gen	SOF/LDV	SOF + DCV	SOF +RBV	GZR/EBR	SOF/VEL	SMV + SOF	PTV/OB V /r + DSV	PTV/OBV / r	PegIFN + RBV+SOF
1a	12 tuần	12 tuần	Không	12 tuần	12 tuần	12 tuần	12 tuần (+RBV)	Không	12 tuần
1b	12 tuần	12 tuần	Không	12 tuần	12 tuần	12 tuần	12 tuần	Không	12 tuần
2	Không	12 tuần	12 tuần	Không	12 tuần	Không	Không	Không	12 tuần
3	Không	12 tuần	24 tuần	Không	12 tuần	Không	Không	Không	12 tuần
4	12 tuần	12 tuần	Không	12 tuần	12 tuần	12 tuần	Không	12 tuần (+RBV)	12 tuần
5,6	12 tuần	12 tuần	Không	Không	12 tuần	Không	Không	Không	12 tuần

Bảng 1.4. Phác đồ điều trị viêm gan C ở bệnh nhân xơ gan còn bù (Child Pugh A)

Kiểu gen	SOF/LDV	SOF + DCV	SOF +RBV	GZR/EBR	SOF/VE L	SMV + SOF	PTV/OB V /r + DSV	PTV/OBV / r	PegIFN + RBV+SOF
1a	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	Không	12 tuần	12 tuần	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	24 tuần (+RBV)	Không	12 tuần
1b	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	Không	12 tuần	12 tuần	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	12 tuần (+RBV)	Không	12 tuần
2	Không	12 tuần	16 - 20 tuần	Không	12 tuần	Không	Không	Không	12 tuần
3	Không	24 tuần ± RBV	Không	Không	12 tuần	Không	Không	Không	12 tuần
4	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	Không	12 tuần	12 tuần	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	Không	24 tuần (+RBV)	12 tuần
5,6	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	Không	Không	12 tuần	Không	Không	Không	12 tuần

Bảng 1.5. Phác đồ điều trị viêm gan C ở bệnh nhân xơ gan mất bù

	SOF+RBV	SOF/LDV	SOF/DCV	SOF/VEL
Kiểu gen 1,4,5,6		24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)
Kiểu gen 2	16-20 tuần	Không	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	
Kiểu gen 3		Không	24 tuần hoặc 12 tuần (+RBV)	

Một số thuốc y học cổ truyền, nguồn gốc dược liệu để điều trị viêm gan mạn và kích thích miễn dịch:

Các thuốc y học cổ truyền hoặc có nguồn gốc dược liệu ít hoặc không được đề cập trong các hướng dẫn chính thức về điều trị các bệnh lý viêm gan mạn do virus hoặc do các nguyên nhân khác theo y học hiện đại.

Theo y học cổ truyền, bệnh viêm gan mạn được khái quát trong phạm trù các chứng Hoàng đản, Hiệp thống đi cùng với các rối loạn tiêu hóa mà nguyên nhân có thể do: Dịch độc ngoại cảm hoặc tà khí thấp nhiệt, chính khí bất túc dẫn tới khí cơ uất trệ, dịch đờm không thông tiết sinh ra chứng Hoàng đản. Một số bài thuốc được sử dụng theo y học cổ truyền như “Tiêu dao tán” chứa các vị Sài hồ, Uất kim, Bạch truật, Đương qui, Phục linh, Bạch linh, ... bài thuốc “Sài thực lục quân tử thang” chứa các vị Sài hồ, Bạch truật, Thương truật, Trần bì, Phục linh, ... [56].

Hiện nay, nghiên cứu các nguồn nguyên liệu từ thảo dược là xu hướng trên thế giới nhằm tìm ra các dược liệu có tác dụng điều trị các bệnh lý viêm gan hoặc xơ gan. Silymarin là dược chất chiết xuất từ thảo dược được nghiên cứu và sử dụng rất rộng rãi tại Việt Nam và trên thế giới để hỗ trợ điều trị các bệnh lý viêm gan do tác dụng bảo vệ tế bào gan [57]. Nghiên cứu lâm sàng của Nguyễn Thị Minh Hồng và cộng sự đánh giá tác dụng của viên XG1 (chứa các dược liệu như Nhân trần, Bạch truật, Quế chi, Ngũ vị tử, Thổ phục

linh, Bạch linh, Tru linh, Trạch tả, Uất kim, Ngũ gia bì, Xuyên quy) trên bệnh nhân xơ gan Child – Pugh B do rượu cho thấy viên XG1 có tác dụng làm giảm enzym gan ALT, AST, giảm chỉ số Fibroscan sau 1 tháng điều trị [57]. Nhiều nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Thu và cộng sự cho thấy tác dụng của cây cà gai leo (*Solanum hainanense* Hance) trên bệnh lý viêm gan mạn do virus viêm gan B [58].

Bên cạnh các bài thuốc, vị thuốc đã được nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ gan nhiều dược liệu, vị thuốc cũng đã được nghiên cứu đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch. Tại Việt Nam, nghiên cứu tìm ra các thuốc từ dược liệu có tác dụng kích thích miễn dịch là một hướng đi mới của nhiều nhà nghiên cứu. Các dược liệu đã được đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch tại Việt Nam có thể kể đến như: Cây tầm gửi, một số loại cây họ đậu, hạ khô thảo, hoàng bì, trinh nữ hoàng cung, rễ và cây quả nhàu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của cao trái nhàu (*Morinda citrifolia*.) trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng cyclophosphamid cho thấy với liều 6 g dược liệu/kg/ngày trong 5 ngày liên tục đã làm tăng trọng lượng lách và tuyến ức tương đối, tăng số lượng bạch cầu lympho, mono, diệt tự nhiên [59].

Tác dụng kích thích miễn dịch của chế phẩm giàu ecdysteroid từ cây lược vàng (*Callisia fragrans*) đã được đánh giá trên mô hình suy giảm miễn dịch sử dụng cyclophosphamid. Kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm giàu ecdysteroid làm tăng cả tác dụng kích thích miễn dịch tế bào và miễn dịch chung [60].

Tác dụng của cây xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*) trên hệ miễn dịch được đánh giá trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. Kết quả nghiên cứu cho thấy tác dụng kích thích miễn dịch thông qua các chỉ số như làm tăng trọng lượng tuyến ức tương đối, tổng số bạch cầu và TNF- α [61].

Một số chất sau đã được chứng minh có liên quan tới tác dụng kích thích miễn dịch từ dược liệu:

+ Glycosid: Nhiều loại glycosid được nghiên cứu cho thấy có tiềm năng tác dụng kích thích miễn dịch, ví dụ iridoid glycosid từ cây *Picrorhiza scrophulariiflora* và anthraquinon từ cây *Andrographis paniculata*. Dendroside A và dendronobiloside A, B là 3 loại sesquiterpen glycosid mới được phân lập từ cây *Dendrobium nobile* (cây thạch斛 tía). Những chất này được cho là kích thích tăng trưởng tế bào lympho B và lympho T [62].

+ Flavonoid: Một số loại flavonoid tìm thấy ở cây *Terminalia arjuna* (cây chiêu liêu) đã được chứng minh tác dụng kích thích miễn dịch.

+ Sapogenin: Triterpenoid saponin và diterpen biểu hiện phạm vi tác dụng kích thích miễn dịch rộng. Ví dụ các loại cây sau: *Gymnema sylvestre*, *Chlorophytum borivilianum*, *Boswellia spp.* và *Randia dumetorum* [62].

+ Ngoài ra các chất khác như alkaloid, thiosulfinat, terpenoid, polysaccharid cũng đã được tìm thấy ở nhiều loại thực vật có tác dụng kích thích miễn dịch [62],[63].

1.2. Mô hình dược lý gây suy giảm miễn dịch và viêm gan mạn, xơ gan

1.2.1. Mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm

Suy giảm miễn dịch là tình trạng một phần của hệ thống miễn dịch bị khuyết thiếu hoặc mất chức năng. Hậu quả của suy giảm miễn dịch dẫn tới khả năng nhiễm khuẩn nặng hơn và kéo dài hơn thông thường. Suy giảm miễn dịch cũng có thể gây ra tình trạng mắc một số bệnh ác tính [64].

Các thuốc có tác dụng kích thích thường không biểu hiện tác dụng rõ ràng trên cơ thể khỏe mạnh có hệ miễn dịch bình thường [65]. Do vậy việc đánh giá tác dụng ức chế miễn dịch thường phải dựa trên xây dựng mô hình suy giảm miễn dịch thực nghiệm khi thực hiện các nghiên cứu tiền lâm sàng.

Nguyên lý chung của các mô hình suy giảm miễn dịch thực nghiệm là sử dụng tác động ngoại lai (hoá chất, tia xạ, thuốc, virus, ...) để gây suy giảm chức năng các thành phần của hệ miễn dịch. Tác động ngoại lai thường gây ra tình trạng thay đổi nhiều cấu trúc sinh học và quá trình của hệ miễn dịch bao gồm cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào.

Động vật được sử dụng trong mô hình suy giảm miễn dịch thực nghiệm:

Nhiều loại động vật được sử dụng trong các mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm bao gồm: chuột nhắt, chuột cống, thỏ, cừu, ...

- **Chuột nhắt:** Là loại được sử dụng nhiều nhất trong các động vật được gây suy giảm miễn dịch. Chuột nhắt trắng khoẻ mạnh chủng *Swiss* là loài được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu. Rokeya (2011) sử dụng chuột nhắt trắng cả hai giống đực cái 8 tuần tuổi, trọng lượng từ 20 – 25 g để nghiên cứu trên mô hình sử dụng cyclophosphamid [66]. Arshad và cộng sự (2013) sử dụng chuột nhắt trắng cả hai giống đực cái nhưng trọng lượng từ 25 – 30 g, không nói rõ tuần tuổi [67]. Wang và cộng sự (2014) sử dụng chuột nhắt trắng giống cái trọng lượng 18 – 22 g, 8 – 12 tuần tuổi để nghiên cứu [68]. Nhiều tác giả khác cũng sử dụng chuột nhắt trắng trọng lượng trong khoảng 20 g để nghiên cứu trên mô hình cyclophosphamid. Chuột nhắt trắng được sử dụng trên nhiều loại mô hình suy giảm miễn dịch như suy giảm miễn dịch do cyclophosphamid, do xạ trị hoặc do virus.

Tuy nhiên, ngoài chuột nhắt trắng khoẻ mạnh chủng *Swiss* thì chuột nhắt Balb/c cũng hay được sử dụng để gây suy giảm miễn dịch [69]. Ưu điểm của chuột Balb/c là chuột đã biểu hiện suy giảm miễn dịch sẵn, ít có sự chênh lệch giữa giống đực và giống cái. Chuột Balb/c là chuột hàng đầu để nghiên cứu về ung thư và miễn dịch tuy nhiên hiện nay chủng chuột này không sẵn có ở Việt Nam.

- **Chuột cống trắng:** Một số nghiên cứu sử dụng chuột cống trắng để tiến hành gây mô hình suy giảm miễn dịch [70]. Kyakulaga và cộng sự (2013) sử dụng chuột cống trắng trưởng thành khoẻ mạnh chủng Wistar 10 tuần tuổi trong mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm bằng CY 10 mg/kg trong 28 ngày liên tục. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng chiếu xạ toàn thân trên chuột cống trắng là mô hình quan trọng trong nghiên cứu thuốc chống ung thư trên thực nghiệm [71].

- **Các động vật khác:** Ngoài chuột nhắt và chuột cống trắng, một số loài động vật khác cũng được sử dụng để nghiên cứu. Kimberly và cộng sự (2013) sử dụng thỏ để gây suy giảm miễn dịch bằng cytarabin và prednisolon để gây nhiễm nấm *Aspergillus*, kết quả cho thấy sự giảm bạch cầu máu ngoại vi rõ rệt và kéo dài trên thỏ. Li và cộng sự (2013) sử dụng cừu cái, trọng lượng cơ thể 35 – 50 kg để gây suy giảm miễn dịch bằng 3 thuốc: tacrolimus, corticosteroid và mycophenolate mofetil, sau đó làm giảm lượng tế bào T bằng globulin kháng tuyến ức [72].

Mô hình suy giảm miễn dịch thực nghiệm:

- Mô hình sử dụng hoá chất gây suy giảm miễn dịch:

Hóa chất thường được sử dụng để gây suy giảm miễn dịch gồm cyclophosphamid (CY), corticoid, kháng purin, methotrexat ... trong đó mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY được sử dụng nhiều, chủ yếu trên chuột nhắt trắng hoặc chuột cống trắng [73],[74],[75],[65]. Cyclophosphamid là chất gây độc tế bào được sử dụng nhiều nhất trong nhóm alkyl hóa để điều trị ung thư [76]. Đích tác dụng chủ yếu của CY là DNA, bằng cách alkyl hóa sợi DNA dẫn tới ức chế phân bào. Do vậy, tác dụng CY mạnh nhất lên các mô có tốc độ phân chia nhanh như tủy xương. Tuy nhiên, CY cũng có tác dụng lên các mô khác có tốc độ phân chia chậm hơn (ví dụ gan, thận, tổ chức lympho trưởng thành như lách, tuyến ức) [76]. Có nhiều cách sử dụng

cyclophosphamid trong việc gây mô hình suy giảm miễn dịch. CY có thể được sử dụng ở một liều cao hoặc nhiều liều nhỏ kéo dài để gây suy giảm miễn dịch. Phan Thị Phi Phi và cộng sự nghiên cứu mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY đã kết luận: dùng CY liều duy nhất 200 mg/kg là tối ưu nhất [trích dẫn từ [65]]. Một số nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng CY nhiều liều nhỏ để gây tình trạng suy giảm miễn dịch kéo dài trên động vật. Vigila và cộng sự (2008) sử dụng CY liều 20 mg/kg trong 10 ngày liên tục để gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng, kết quả cho thấy có sự suy giảm tỷ lệ lympho bào T và B trong máu ngoại vi [77]. Chen và cộng sự (2012) sử dụng CY liều 80 mg/kg trong 3 ngày liên tục để gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng, đánh giá sau 10 ngày, kết quả cho thấy sự giảm trọng lượng tương đối lách, làm giảm IL-2, IL-6, IFN- γ [78]. Kyakulaga và cộng sự (2013) sử dụng CY liều 10 mg/kg đường uống trong 30 ngày để gây suy giảm miễn dịch kéo dài trên chuột cống trắng [79].

Do sự phù hợp về đặc điểm bệnh học và được nhiều nghiên cứu trên thế giới sử dụng một cách rộng rãi, mô hình suy giảm miễn dịch CY trên chuột nhắt trắng được sử dụng trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, nhằm đánh giá đầy đủ hơn đặc điểm tác dụng kích thích miễn dịch, mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY một liều và nhiều liều nhỏ đã được tiến hành.

- Mô hình sử dụng bức xạ gây suy giảm miễn dịch

Một phương pháp khác để gây suy giảm miễn dịch cũng được áp dụng là tia xạ. Tia xạ tác động lên các bộ phận của cơ thể thông qua năng lượng bức xạ, dẫn tới biến đổi các cấu trúc sinh học, phân hủy tạo ra các gốc tự do trong mô và tế bào. Các gốc tự do sinh ra có thể tạo ra các gốc tự do thứ cấp khác và tiếp tục tấn công các tổ chức, gây chết tế bào. Tác dụng của tia xạ tác động lên hầu hết các cơ quan trong cơ thể, tuy nhiên máu và cơ quan tạo máu là tổ chức đầu tiên bị ảnh hưởng bởi tia xạ, gây ra tình trạng suy giảm miễn

dịch [80],[65]. Tia γ (gamma) là tia bức xạ có khả năng đâm xuyên lớn nhất, do vậy thường được sử dụng trong các mô hình suy giảm miễn dịch. Có thể sử dụng tia γ để gây suy giảm miễn dịch chọn lọc trên hệ lympho hoặc không chọn lọc bằng đường chiếu toàn thân. Phạm Thị Vân Anh (2011) sử dụng thành công tia γ liều 1Gy trong 6 ngày liên tục (tổng liều là 6Gy) trên chuột nhắt trắng để gây suy giảm miễn dịch [65].

- Mô hình sử dụng virus gây suy giảm miễn dịch:

Một số ít tác giả trên thế giới sử dụng virus để gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm. Ritsuko Koga và cộng sự (2010) sử dụng virus sởi để gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm trên chuột nhắt đột biến SLAM, kết quả cho thấy virus sởi có khả năng gây suy giảm miễn dịch thể hiện qua thay đổi thành phần lympho của lách và giảm số lượng T CD4⁺ và một số interleukin [81].

1.2.2. Mô hình gây viêm gan mạn tính, xơ gan

Nhiều phương pháp được mô tả trên thế giới để tiến hành gây mô hình viêm gan mạn tính, xơ gan thực nghiệm trên các loài động vật khác nhau. Nhìn chung, có thể chia ra 3 nhóm phương pháp:

Thứ nhất, gây tắc đường mật (ví dụ bằng cách thắt ống mật chủ): Phương pháp này có ưu điểm là gây ra tình trạng xơ gan mô tả các bệnh lý đường mật như hội chứng xơ gan mật tiên phát. Tuy nhiên, phương pháp này có nhiều nhược điểm như thời gian gây xơ kéo dài, cần phải thực hiện thủ thuật xâm lấn nặng cho động vật, đặc điểm của xơ gan không có nhiều nét tương đồng với viêm gan mạn tính do virus dẫn tới xơ gan trên người, tỷ lệ gây chết động vật cao [82],[83]. Do đó, mô hình xơ gan bằng cách thắt ống mật chủ không được chọn để áp dụng trong nghiên cứu này.

Thứ hai là mô hình gây viêm gan bằng các chủng virus, điển hình là virus viêm gan B (Hepatitis B virus – HBV). Đối với virus viêm gan B người (Human hepatitis B virus – HHBV), do có tính đặc hiệu khi xâm nhập vào vật

chủ nên trên thực tế có rất ít động vật có thể sử dụng để làm mô hình viêm gan do HHBV. Nghiên cứu trên tinh tinh hoặc chuột biến đổi gen được các nhà khoa học trên thế giới áp dụng để gây mô hình viêm gan do HHBV [84],[85],[86], những mô hình này khó có khả năng áp dụng thực tiễn ở Việt Nam. Do tính hạn chế và khó khăn của việc sử dụng HHBV gây mô hình nghiên cứu được lý, nhiều nhà khoa học trên thế giới sử dụng chủng HBV khác có nhiều đặc tính gây bệnh giống HHBV là virus viêm gan B trên vịt (Duck hepatitis B virus – DHBV) [87],[88]. Đây là loại mô hình có tính khả thi cao hơn, mang nhiều đặc điểm tổn thương giống HHBV trên người và cho thấy tác dụng của hầu hết các nhóm thuốc điều trị thực tiễn lâm sàng [89], tuy nhiên ở Việt Nam chưa có báo cáo nghiên cứu nào ứng dụng mô hình nghiên cứu được lý sử dụng DHBV.

Hóa chất có tác dụng gây tình trạng viêm gan mạn dẫn tới xơ gan là biện pháp được sử dụng phổ biến nhất để nghiên cứu tác dụng của thuốc điều trị viêm gan mạn tính trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Các hóa chất được dùng như: carbon tetrachlorid (CCl_4), ethanol, diethoxycarbonyl dihydrocollidine (DDC), alpha – naphthyl-isothiocyanate (ANIT), ... trong đó CCl_4 là chất được sử dụng nhiều hơn cả. Cơ chế của CCl_4 gây viêm gan thông qua quá trình chuyển hóa ở gan, sinh ra nhiều gốc tự do như CCl_3^* , quá trình này nếu diễn ra nhiều ngày sẽ dẫn tới tổn thương viêm gan kéo dài và gây xơ gan. Ưu điểm của CCl_4 là gây ra được tình trạng xơ gan sau khi có tổn thương gan mạn tính, có nhiều điểm tương đồng với tình trạng bệnh lý trên người [83]. Tuy nhiên nhược điểm lớn nhất của CCl_4 là tỷ lệ gây chết động vật rất cao, có thể từ 40 – 100% [83]. Điều này dẫn tới nhiều nghiên cứu sử dụng CCl_4 với các mức độ liều khác nhau và có thể phải dò liều trước khi tiến hành [90].

Tại Việt Nam, một số tác giả đã thực hiện đánh giá tác dụng chống xơ gan trên mô hình viêm gan mạn bằng CCl_4 , tuy nhiên liều lượng và cách dùng CCl_4 có sự khác nhau. Trương Hai Nhung và cộng sự (2014, 2016) thực hiện

ngiên cứu sử dụng nhiều mức độ liều CCl_4 khác nhau trên chuột nhắt trắng chủng Swiss. Kết quả nghiên cứu cho thấy CCl_4 gây xơ gan rõ rệt, liều 1,0 mL/kg là tối ưu nhất [90],[91].

1.3. Viên nén Livganic

Viên nén Livganic bào chế dưới dạng viên nén bao phim của công ty TNHH Tuệ Linh. Một viên Livganic gồm có 250 mg cao Cà gai leo (*Solanum hainanense* Hance) và 250 mg cao Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack).

1.3.1. Cây Cà gai leo

Cây Cà gai leo có tên khoa học là *Solanum hainanense* Hance (*Solanum Procumbens* Lour), thuộc họ cà *Solanaceae*, mọc ở nhiều nơi tại Việt Nam. Tùy từng địa phương mà có những tên gọi khác nhau như cà quạnh, cà gai dây, cà quỳnh, cà vạch, chẻ nan.

Trên thế giới Cà gai leo được phân bố ở vùng nhiệt đới của châu Á như Trung Quốc, Việt Nam, Campuchia và Thái Lan. Ở Việt Nam Cà gai leo phân bố rải rác từ đồng bằng ven biển đến trung du và vùng núi thấp nhưng tập trung nhiều ở các tỉnh phía Bắc và Thanh Hóa, Nghệ An và Hà Tĩnh [58].

Cà gai leo thuộc loại cây nhỡ leo, thân dài 0,60 – 1 m, rất nhiều gai, cành xòe rộng, trên phủ lông hình sao. Lá hình trứng hay thuôn, phía gốc là hình rìu hay hơi tròn, mép nguyên hay hơi lượn và khía thùy, hai mặt, nhất là mặt dưới phủ lông trắng nhạt, phiến dài 3 – 4 cm, rộng 12 – 20mm, có gai, cuống dài 4 – 5mm. Hoa tím nhạt, nhị vàng, hợp thành xim gồm 2 – 5 hoa. Quả hình cầu, khi chín có màu vàng, bóng, nhăn, đường kính 5 – 7mm. Hạt màu vàng, hình thận, có mạng, dài 4mm, rộng 2mm [92].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Thu (2002) và cộng sự đã công bố thành phần hóa học của Cà gai leo: Thân, lá, rễ và quả của Cà gai leo có những thành phần chủ yếu như alkaloid, saponin, flavonoid, phytosterol, chất béo, carotenoid, coumarin, acid hữu cơ, acid amin. Tuy nhiên glycoalkaloid là hoạt chất chính có tác dụng ức chế phát triển xơ, chống viêm và bảo vệ gan [58].

Gần đây, Nguyễn Xuân Hải (2018) công bố thêm 6 hoạt chất lần đầu tiên được phát hiện trong Cà gai leo gồm: ziganein, benzoic acid, salicylic acid, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillic acid và indole-3-carbaldehyde [93].



Hình 1.4. Cây cà gai leo [94]

Độc tính và tác dụng của cây Cà gai leo:

Độc tính: Cũng theo nhóm tác giả Nguyễn Thị Bích Thu và cộng sự, cao Cà gai leo có độ an toàn cao thể hiện qua độc tính cấp: chuột nhắt uống liều gấp 500 lần liều tương đương tính trên người vẫn không tính được LD₅₀; nghiên cứu độc tính bán trường diễn cho thấy trên thỏ thực nghiệm liều gấp 5 lần liều tương đương trên người không gặp bất cứ độc tính nào.

Tác dụng bảo vệ gan và ức chế quá trình xơ gan: Ở Việt Nam Cà gai leo đã được nghiên cứu nhiều trên thực nghiệm về khả năng bảo vệ gan và chống xơ gan. Nguyễn Minh Khai và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng của Cà gai leo trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm bằng CCl₄ và đưa ra kết quả cây Cà gai leo đã làm giảm mức độ xơ rõ rệt ở lô dùng thuốc với lô không dùng thuốc trên đại thể và vi thể gan và dịch chiết cây Cà gai leo còn có tác dụng làm giảm hàm lượng collagen trong tổ chức gan. Trên nghiên cứu *in vitro* tác giả thấy dịch chiết cây Cà gai leo có tác dụng hoạt hóa enzym collagenase ở nồng độ 1/6 [96],[95]. Nguyễn Phúc Hải và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết cây Cà gai leo trên mô hình gây tổn thương gan chuột nhắt trắng bằng trinitrotoluen. Kết quả nghiên cứu cho thấy lô dùng

dịch chiết cây Cà gai leo có tác dụng làm hạn chế tăng trọng lượng gan, ngăn chặn thoái hóa mỡ và hiện tượng chảy máu vi thể trong nhu mô gan, làm giảm sự hủy hoại và hoại tử tan rã nhu mô gan [100]. Nguyen Phuc Thai và cộng sự (1998) chứng minh tác dụng bảo vệ gan của Cà gai leo trên mô hình gây độc gan bằng trinitrotoluen [99].

Tác dụng chống viêm: Nguyễn Thị Bích Thu và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng chống viêm của cao lỏng cây Cà gai leo trên mô hình gây viêm mạn tính bằng amiant theo kỹ thuật của Ducrot và Julou, nghiên cứu tác dụng ức chế xơ gan của cao lỏng cây Cà gai leo trên mô hình gây xơ gan thực nghiệm. Kết quả cho thấy cao lỏng dạng chiết toàn phần của cây Cà gai leo làm giảm trọng lượng u trên mô hình u hạt thực nghiệm là 42,2%, làm giảm hàm lượng collagen trên mô hình gây xơ gan là 27% [58].

Tác dụng trên hệ miễn dịch: Theo Nguyễn Thị Bích Thu (2002), dịch chiết của cây Cà gai leo có tác dụng kích thích sự tăng sinh của các tế bào lympho T, do vậy kết luận Cà gai leo có tác dụng làm tăng cường miễn dịch cho cơ thể, là cơ sở để giải thích tác dụng chống viêm gan do virus viêm gan B. Tuy nhiên đây chỉ là đánh giá sơ bộ ban đầu, cần có thêm nhiều nghiên cứu để khẳng định chắc chắn vấn đề này [58].

Hoạt tính chống oxy hóa: Nhiều nghiên cứu cho thấy dịch chiết cây Cà gai leo có hoạt tính chống oxy hóa. Nguyễn Quang Vinh và cộng sự nghiên cứu thành phần và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết nước toàn phần của Cà gai leo cho thấy mức độ ức chế DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) là 22,3% [98]. Nguyễn Thị Bích Thu và cộng sự cũng đã chứng minh tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết toàn phần Cà gai leo, theo đó những kết quả thu được góp phần giải thích cơ chế tác dụng bảo vệ gan của Cà gai leo [58].

Các thử nghiệm trên lâm sàng: Trịnh Thị Xuân Hòa và cộng sự (1996) đã nghiên cứu hiệu quả bước đầu của Cà gai leo được bào chế dưới dạng viên

nén có tên biệt dược là Haina ở 30 bệnh nhân được chẩn đoán là viêm gan virus B mạn hoạt động tại bệnh viện 103. Kết quả nghiên cứu cho thấy ở những bệnh nhân dùng Cà gai leo so với nhóm bệnh nhân dùng giả dược có thời gian các triệu chứng lâm sàng giảm hoặc trở về bình thường nhanh hơn, số bệnh nhân có transaminase về bình thường nhiều hơn và nhanh hơn so với nhóm bệnh nhân dùng giả dược. Sau điều trị, trong nhóm bệnh nhân dùng Cà gai leo có tới 24% có HBeAg âm tính và chuyển đảo huyết thanh, có 23,3% bệnh nhân có HBsAg về âm tính sau 2 tháng điều trị. Đồng thời nghiên cứu trên còn ghi nhận thấy không có một tác dụng phụ nào do thuốc gây ra [101], [102].

1.3.2. Cây Mật nhân

Cây mật nhân có tên khoa học là *Eurycoma longifolia* Jack (*Crassula pinnata* Lour) thuộc họ Thanh thất *Simaroubaceae*, bộ Cam Rutales, phân lớp Hoa hồng Rosidae, lớp Ngọc Lan Magnoliopsida, ngành Ngọc lan Magnoliophyta, phân giới thực vật bậc cao Kormobionta [92]. Ở Việt Nam cây mật nhân còn có tên khác là bá bệnh, chực bệnh, bách bệnh, lồng bẹt, hậu phác nam.

Cây mọc hoang trong rừng, phân bố rộng rãi ở các nước vùng Đông Nam Á như Việt Nam, Malaysia, Thái Lan... Là loại cây nhỡ, cao 2 – 4 m khi mọc ở vùng đồi, 5 – 15 m khi mọc dưới tán rừng ẩm, thân ít phân cành, lá kép lông chim lẻ, mọc so le, gồm 21 – 25 lá chét không cuống, hình mác hoặc bầu dục, gốc thuôn, đầu nhọn, mép nguyên, mặt trên nhẵn màu xanh sẫm bóng, mặt dưới nhạt có lông mịn màu trắng xám, cuống lá kép màu nâu đỏ [103].



Hình 1.5. Hình ảnh cây mật nhân [104]

Các nghiên cứu về thành phần hóa học của cây mật nhân cho thấy tùy từng bộ phận của cây mà có các thành phần khác nhau. Cụ thể: Lá mật nhân chứa 7 loại quassinoid trong đó chủ yếu 14, 15 β – dihydroxyklaineannone, rễ mật nhân chứa 65 hoạt chất ví dụ: Eurycomanon, eurycomalacton, longilacton, canthin – 6 – on, pasakbumin. Vỏ và gỗ mật nhân chứa nhiều loại Quassinoid, Triterpen và Alcaloid Cacbonlin như eurico – malacton, 2 – 6 dimethoxybenzoquinon [105], [106].

Theo kinh nghiệm dân gian vỏ thân và rễ mật nhân được dùng trong các trường hợp ăn uống khó tiêu, nôn mửa, đầy bụng, tiêu chảy, chữa sốt rét, giải độc do uống rượu nhiều, chữa đau lưng mỏi gối do thấp. Quả mật nhân dùng để chữa kiết lỵ, đau bụng dưới ở phụ nữ, tẩm trị ghẻ, lở ngứa [92]. Ở Việt Nam cây mật nhân được tập trung nghiên cứu chủ yếu vào tác dụng lên chức năng sinh sản mà chưa có nghiên cứu đến chức năng bảo vệ gan của cây mật nhân. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm của cây mật nhân. Trong nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của cây mật nhân trên mô hình gây tổn thương tế bào gan ở chuột cống bằng CCl_4 của Hamoud Hussein Al – FAQEH và cộng sự, kết quả nghiên cứu cho thấy lô chuột dùng mật nhân ở liều trung bình và liều cao (750 mg/kg, 1500 mg/kg) làm giảm ALP (Alkaline phosphatase), ALT và ở liều trung bình (750 mg/kg) làm giảm AST có ý nghĩa so với lô gây độc bằng CCl_4 [107]. Nghiên cứu trên đã chứng minh tác dụng bảo vệ gan rõ rệt của cây mật nhân trên mô hình gây độc tế bào gan bằng CCl_4 .

Các nghiên cứu trên thế giới chủ yếu tập trung vào tác dụng trên hệ sinh sản và chống vi sinh vật, ký sinh trùng của cây Mật nhân [104]. Có rất ít nghiên cứu đánh giá tác dụng của cây Mật nhân trên miễn dịch. Tee và cộng sự (2007) đánh giá tác dụng của đoạn F16 chiết xuất từ cây Mật nhân cho thấy có tác dụng làm tăng quá trình apoptosis (chết theo chương trình), do vậy

kết luận cây Mật nhân có thể có tác dụng trên miễn dịch hoặc lên quá trình ung thư [97]. Nghiên cứu của Hnin Ei Thu và cộng sự (2018) chỉ ra rằng các chất có trong cây Mật nhân làm cảm ứng quá trình chết theo chương trình thông qua cơ thể điều hòa biểu hiện của p53 (protein ức chế khối u), protein pro-apoptotic (Bax) và điều hòa biểu hiện của protein chống chết theo chương trình [108]. Thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng trên 84 bệnh nhân tuổi trung niên có tình trạng suy giảm miễn dịch cho thấy sử dụng dịch chiết nước từ rễ cây Mật nhân có tác dụng làm tăng cường đáp ứng miễn dịch, đặc biệt là làm tăng số lượng tế bào TCD4+, cơ chế có thể thông qua hoạt tính chống oxy hóa của rễ cây Mật nhân [109].

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Động vật thực nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống, 6 tuần tuổi, cân nặng 25 ± 2 g, do viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp.

Động vật thực nghiệm được nuôi 3 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu bằng thức ăn dành riêng cho chuột nhắt tại phòng thí nghiệm của bộ môn Dược lý – Trường Đại học Y Hà Nội.

2.2. Chất liệu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với chế phẩm viên nén Livganic với các đặc điểm kể dưới.

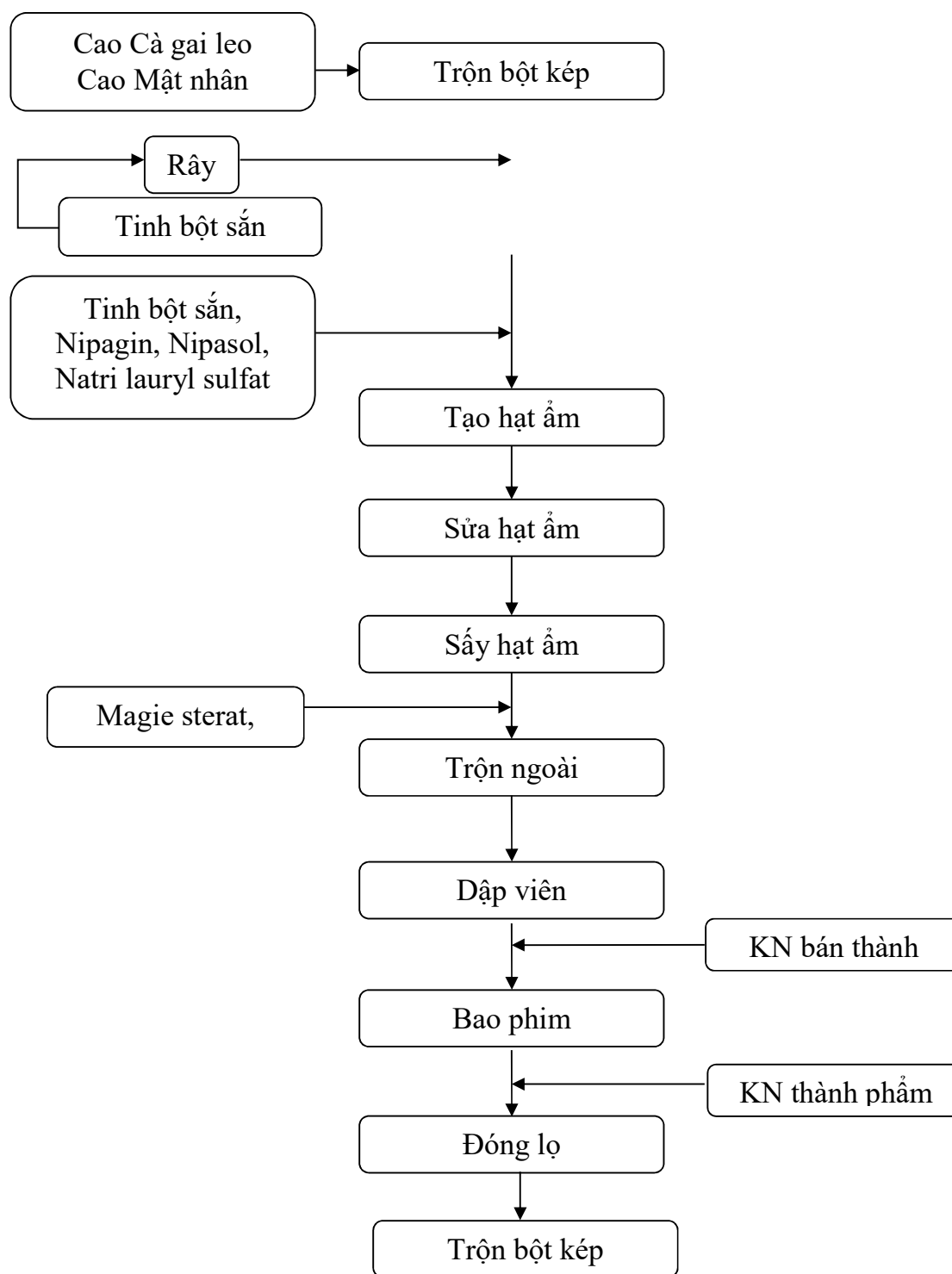
2.2.1. Nguồn gốc

Viên nén Livganic được cung cấp bởi công ty TNHH Tuệ Linh, mỗi viên gồm 250 mg cao Mật nhân và 250 mg cao Cà gai leo.

2.2.2. Quy trình tạo thuốc nghiên cứu

Theo quy trình đạt tiêu chuẩn cơ sở.

Quy trình sản xuất viên nén Livganic như hình dưới (hình 1.6) (chi tiết về mô tả quy trình sản xuất viên nén Livganic xin xem ở Phụ lục I):



Hình 1.6. Quy trình sản xuất viên nén Livganic

Tiêu chuẩn cơ sở: Xin xem ở Phụ lục II.

2.2.3. Chuẩn bị dung dịch sản phẩm nghiên cứu

Livganic được nghiền mịn nhỏ trong cối, sau đó pha với vừa đủ lượng nước cần thiết để phục vụ mục đích của mỗi nghiên cứu.

Sản phẩm nghiên cứu được cho chuột uống bằng kim đầu tù, đảm bảo uống thuốc không gây hại đối tới thực quản chuột và làm thuốc vào phổi.

Trước khi cho mỗi chuột nghiên cứu uống sản phẩm nghiên cứu, khuấy đều hỗn hợp đã pha nhằm đảm bảo sự đồng đều, tránh lắng cặn.

2.3. Hóa chất, dụng cụ phục vụ nghiên cứu

2.3.1. Hóa chất phục vụ nghiên cứu

- Cyclophosphamid: dạng thuốc bột, biệt dược Endoxan lọ 500mg của hãng ASTA Medica, Đức

- Levamisol dạng bột trắng, hàm lượng 98,6% của hãng Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ.

- Nhũ dịch OA (Ovalbumin + Al(OH)₃): dùng làm kháng nguyên gây miễn cảm cho chuột.

- Hồng cầu cừu (HCC): máu tĩnh mạch cừu được lấy trong điều kiện vô trùng, bảo quản trong dung dịch alsever (glucose 24,6g, natricitrat 9,6g, natriclorid 5,05g, nước cất vừa đủ 1200 ml, pH 6,1), ở nhiệt độ 40C, sử dụng trong thời hạn 2 tuần. Sản phẩm của công ty Dược phẩm Nam Khoa.

- Legalon (silymarin) viên nén 70 mg của hãng MADAUS GmbH, Đức.

- Kít định lượng các enzym và chất chuyển hóa trong máu: AST, ALT, bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol của hãng DIALAB.

- Các hóa chất sử dụng cho máy dòng chảy tế bào.

- Các hóa chất làm tiêu bản mô bệnh học do Trung tâm chẩn đoán và phát triển sớm ung thư cung cấp.

- Carboxy methylcellulose (CMC), dầu olive ... đúng tiêu chuẩn phòng thí nghiệm.

- Hóa chất nhuộm Van Gieson được cung cấp bởi Viện 69 – Bộ Tư Lệnh Lãng.

- Hóa chất và máy huyết học tự động ABC (Animal Blood Counter)

- Kít định lượng IgG, IL-2, TNF- α , IFN của hãng Invitrogen, Hoa Kỳ.

- Kháng thể kháng CD3, CD4, CD8, CD19 của Hãng Invitrogen, Hoa Kỳ.

2.3.2. Dụng cụ, máy móc phục vụ nghiên cứu

- Máy xét nghiệm sinh hóa bán tự động XC – 55 chemistry analyzer.

- Máy quang phổ ELISA Lx 800 (Hoa Kỳ).

- Máy phân tích miễn dịch dòng chảy tế bào (Flow Cytometer) FACS Canto II của hãng BD, Hoa Kỳ.

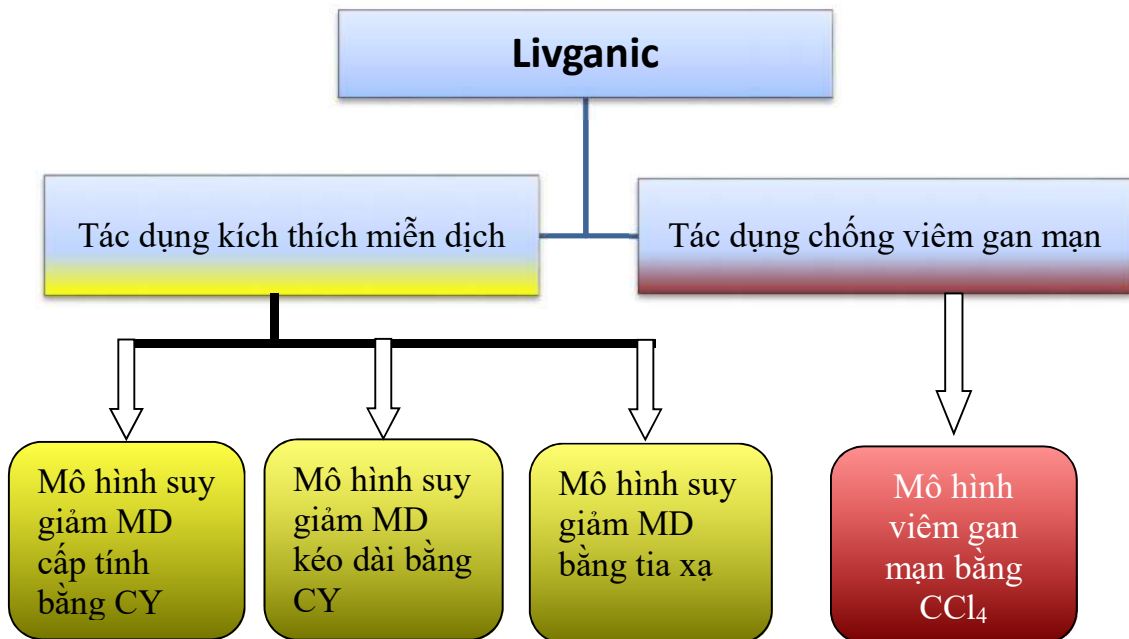
- Máy chiếu tia gamma: Máy Chicobalt – Picker của Tiệp Khắc, sử dụng nguồn cobalt 60.

- Máy đo quang phổ tử ngoại – khả kiến Specord 210 (Đức)

- Kính hiển vi quang học Nikon (Nhật Bản)

2.4. Mô hình nghiên cứu và đánh giá tác dụng của viên nén Livganic

Sơ đồ quá trình nghiên cứu:



2.4.1. Tác dụng của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch

2.4.1.1. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid

➤ Tác dụng của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY

Tiêm màng bụng cyclophosphamid liều duy nhất 200 mg/kg thể trọng để gây suy giảm miễn dịch cấp tính [65].

Chuột thí nghiệm được chia thành 5 lô:

- **Lô 1 (chứng sinh học) (n = 8):** Chuột được tiêm màng bụng NaCl 0,9% 0,1ml/10g hàng ngày, uống nước cất 0,2 ml/10g thể trọng hàng ngày.

- **Lô 2: Mô hình (tiêm CY) (n = 8):** Chuột được tiêm màng bụng CY với liều 200 mg/kg, uống nước cất 0,2 ml/10 g thể trọng hàng ngày.

- **Lô 3: Chứng dương (tiêm CY + levamisol) (n = 8):** Chuột được tiêm màng bụng CY với liều 200 mg/kg, đồng thời uống levamisol liều 100 mg/kg hàng ngày.

- **Lô 4: Livganic liều thấp (tiêm CY + Livganic 0,6 g/kg) (n = 8):** Chuột được tiêm màng bụng CY với liều 200 mg/kg, đồng thời uống Livganic liều 0,6 g/kg hàng ngày (liều tương đương với liều dùng trên lâm sàng, hệ số quy đổi là 12 trên chuột nhất trắng).

- **Lô 5: Livganic liều cao (tiêm CY + Livganic 1,8 g/kg) (n = 8):** Chuột được tiêm màng bụng CY với liều 200 mg/kg, đồng thời uống Livganic liều 1,8 g/kg hàng ngày (liều gấp 3 lần liều tương đương với liều dùng trên lâm sàng, hệ số quy đổi là 12 trên chuột nhất trắng).

Sau khi tiêm màng bụng cyclophosphamid liều 200 mg/kg ở các lô 2, 3, 4, 5, vào ngày tiếp theo các lô chuột được uống nước cất và các thuốc liên tục trong 6 ngày. Ngày thứ 7, giết chuột, lấy máu và các tổ chức lympho để làm xét nghiệm.

Sơ đồ nghiên cứu:

Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2 đến ngày 5	Ngày 6	Ngày 7
Tiêm màng bụng CY 200 mg/kg cho lô 2, 3, 4, 5.	Uống nước cất, levamisol, Livganic 2 liều tùy từng lô			
Tiêm nước muối sinh lý cho lô 1.	Mẫn cảm Tiêm OA, HCC		Phát hiện Tiêm OA gan bàn chân.	Giết chuột, lấy máu và tổ chức lympho.

Trên mô hình nghiên cứu, chuột phải trải qua ba giai đoạn: ức chế miễn dịch, mẫn cảm kháng nguyên và điều trị thuốc thử.

» *Ức chế miễn dịch:*

Dùng tác nhân kinh điển gây tổn thương hệ miễn dịch, tạo máu là CY. CY được sử dụng với liều 200 mg/kg để gây tổn thương hệ thống miễn dịch của chuột.

» *Mẫn cảm kháng nguyên:*

- Kháng nguyên OA tiêm mũi duy nhất dọc sống lưng chuột liều 0,1 ml/chuột và HCC dung dịch 5%, tiêm màng bụng, thể tích duy nhất 0,5 ml/chuột (nhóm chứng dương).
- Tiêm phát hiện: Kháng nguyên OA và dung dịch NaCl 0,9% được tiêm vào hai gan bàn chân chuột với thể tích 0,05ml một ngày trước khi giết chuột làm xét nghiệm.

» *Điều trị thuốc thử:*

- Chuột ở lô 3 được sử dụng levamisol 100 mg/kg làm thuốc đối chứng dương.
- Chuột ở các lô 4,5 được uống thuốc thử. Thời gian uống thuốc thử là 6 ngày.

Xét nghiệm chức năng miễn dịch:

Chuột ở tất cả các lô được đánh giá thông qua các chỉ số:

» *Các chỉ số chung:*

- Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối: được tính là trọng lượng lách, tuyến ức tương ứng với thể trọng chuột.

$$\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức tương đối (\%)} = \frac{\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức (mg)}}{\text{Thể trọng chuột (g)}}$$

Chuột được giết bằng cách kéo đứt đốt sống cổ, mổ bụng để bộc lộ lách, tuyến ức. Bóc tách lấy toàn bộ lách và tuyến ức và ngâm ngay vào dung dịch nuôi tế bào. Lọc sạch các tổ chức xung quanh, dùng gạc thấm khô rồi đem cân. Ghi lại trọng lượng lách, tuyến ức của từng chuột. Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối bằng tỷ lệ trọng lượng các cơ quan này so với trọng lượng của từng chuột tương ứng.

- Số lượng bạch cầu chung, bạch cầu đa nhân trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu mônô và bạch cầu NK ở máu ngoại vi.
- Làm giải phẫu vi thể lách và tuyến ức. Xét nghiệm giải phẫu vi thể được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu và chẩn đoán sớm Ung thư, do PGS.TS. Lê Đình Roanh đọc và nhận định kết quả.

» *Các thông số đánh giá miễn dịch dịch thể và qua trung gian tế bào:*

- Đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua phản ứng quá mẫn chậm ở gan bàn chân chuột với kháng nguyên OA. Trước khi đo kết quả phản ứng quá mẫn chậm với kháng nguyên OA, tiêm 50 μ l kháng nguyên OA (liều phát hiện) vào một bên gan bàn chân chuột, bên còn lại tiêm thể tích tương tự dung dịch BSA. Sau 24 giờ tiêm kháng nguyên phát hiện, đo bề dày hai gan bàn chân chuột bằng thước palmer.

- Định lượng IgG, cytokin IL₂ và TNF- α ở máu ngoại vi bằng phương pháp ELISA.

➤ **Tác dụng của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch kéo dài bằng CY**

Mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính được thực hiện bằng cách tiêm CY liều 50 mg/kg tiêm màng bụng trong thời gian 10 ngày.

Chuột được chia thành 5 lô:

- **Lô 1 (chứng sinh học) (n = 10):** Chuột được tiêm màng bụng NaCl 0,9% 0,1ml/10g hàng ngày, uống nước cất 0,2 ml/10g thể trọng hàng ngày.

- **Lô 2: Mô hình (tiêm CY) (n = 10):** chuột được tiêm màng bụng CY với liều 50mg/kg hàng ngày trong 10 ngày, uống nước cất 0,2 ml/10 g thể trọng hàng ngày.

- **Lô 3: Chứng dương (tiêm CY + levamisol) (n = 10):** Chuột được tiêm màng bụng CY với liều 50 mg/kg hàng ngày trong 10 ngày, đồng thời uống levamisol liều 50 mg/kg hàng ngày.

- **Lô 4: Livganic liều thấp (tiêm CY + Livganic 0,6 g/kg) (n = 10):** Chuột được tiêm màng bụng CY với liều 50 mg/kg hàng ngày trong 10 ngày, đồng thời uống Livganic liều 0,6 g/kg hàng ngày (liều tương đương với liều dùng trên lâm sàng, hệ số quy đổi là 12 trên chuột nhất trắng).

- **Lô 5: Livganic liều cao (tiêm CY + Livganic 1,8 g/kg) (n = 10):** Chuột được tiêm màng bụng CY với liều 50 mg/kg hàng ngày trong 10 ngày, đồng thời uống Livganic liều 1,8 g/kg hàng ngày (liều gấp 3 lần liều tương đương với liều dùng trên lâm sàng, hệ số quy đổi là 12 trên chuột nhất trắng).

Vào ngày thứ 11, giết chuột, lấy tổ chức gan, lách, tuyến ức và máu động mạch cảnh để làm xét nghiệm.

Sơ đồ nghiên cứu:

Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3 đến ngày 9	Ngày 10	Ngày 11
Tiêm màng bụng CY 50 mg/kg cho lô 2, 3, 4, 5				Giết chuột, lấy máu và tổ chức lympho.
Uống nước cất, levamisol, Livganic 2 liều tùy từng lô				
	Mẫn cảm Tiêm OA, HCC		Phát hiện Tiêm OA gan bàn chân	

Quy trình nghiên cứu:

Mô hình suy giảm miễn dịch trải qua 3 giai đoạn: Gây suy giảm miễn dịch
→ Gây miễn cảm kháng nguyên → Điều trị thuốc thử.

Gây suy giảm miễn dịch: Như mô tả ở trên.

Gây miễn cảm kháng nguyên: Chuột được gây miễn cảm kháng nguyên bằng cách tiêm màng bụng 1 mũi duy nhất hồng cầu cừu (HCC) 0,5 ml/chuột và kháng nguyên OA (ovalbumin) độc sống lung 0,1 ml/chuột vào ngày thứ 1 sau khi gây suy giảm miễn dịch (ngày thứ 2 của nghiên cứu).

Điều trị thuốc thử: Levamisol được sử dụng làm thuốc đối chứng với liều 50 mg/kg. Livganic được sử dụng ở 2 liều 0,6 g/kg (tương đương với điều trị trên người) và 1,8 g/kg (gấp 3 lần liều tương đương) cho tất cả các nghiên cứu.

Các chỉ số đánh giá kết quả nghiên cứu:**Các chỉ số chung:**

- Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối: được tính là trọng lượng lách, tuyến ức tương ứng với thể trọng chuột.

$$\frac{\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức tương đối (\%)}}{\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức (mg)}} = \frac{\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức (mg)}}{\text{Thể trọng chuột (g)}}$$

Chuột được giết bằng cách kéo đứt đốt sống cổ, mở bụng để bộc lộ lách, tuyến ức. Bóc tách lấy toàn bộ lách và tuyến ức và ngâm ngay vào dung dịch nuôi tế bào. Lọc sạch các tổ chức xung quanh, dùng gạc thấm khô rồi đem cân. Ghi lại trọng lượng lách, tuyến ức của từng chuột. Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối bằng tỷ lệ trọng lượng các cơ quan này so với trọng lượng của từng chuột tương ứng.

- Số lượng bạch cầu chung, bạch cầu đa nhân trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu mônô và bạch cầu NK ở máu ngoại vi.

- Làm giải phẫu vi thể lách và tuyến ức.

Miễn dịch dịch thể:

- Xác định nồng độ IgG trong máu.

Đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào:

- Phản ứng quá mẫn chậm ở gan bàn chân chuột với kháng nguyên OA. Trước khi đo kết quả phản ứng quá mẫn chậm với kháng nguyên OA, tiêm 50 μ l kháng nguyên OA (liều phát hiện) vào một bên gan bàn chân chuột, bên còn lại tiêm thể tích tương tự dung dịch NaCl 0,9%. Sau 24 giờ tiêm kháng nguyên phát hiện, đo bề dày hai gan bàn chân chuột bằng thước palmer. Lấy hiệu số bề dày phản ứng quá mẫn chậm của chuột với kháng nguyên OA và NaCl 0,9% được chỉ số phản ứng với kháng nguyên OA.

- Định lượng 2 cytokin: IL-2 và IFN - α ở trong máu ngoại vi bằng phương pháp ELISA.

- Định lượng số lượng các lympho bào CD4, CD8a, CD19 trên máy dòng chảy tế bào và tính tỷ lệ CD4/CD8a.

2.4.1.2. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ

Sử dụng tia gamma chiếu toàn thân để gây suy giảm miễn dịch. Suất liều 1Gy/ngày, liên tục trong 6 ngày, tổng liều chiếu xạ cho cả đợt là 6 Gy [65].

Địa điểm thực hiện chiếu xạ: Khoa Y học hạt nhân - Bệnh viện 103.

Chuột thí nghiệm được chia thành 5 lô:

- **Lô 1 (chứng sinh học) (n = 10):** Chuột không được chiếu xạ, uống nước cất 0,2 ml/10g thể trọng hàng ngày.

- **Lô 2: Mô hình (Chiếu xạ) (n = 10):** Chuột được chiếu xạ, uống nước cất 0,2 ml/10 g thể trọng hàng ngày.

- **Lô 3: Chứng dương (Chiếu xạ + levamisol) (n = 10):** Chuột được chiếu xạ, đồng thời uống thuốc chứng dương levamisol 50 mg/kg hàng ngày.

- **Lô 4: Livganic liều thấp (Chiếu xạ + Livganic 0,6 g/kg) (n = 10):** Chuột được chiếu xạ, đồng thời uống Livganic liều 0,6 g/kg hàng ngày

(liều tương đương với liều dùng trên lâm sàng, hệ số quy đổi là 12 trên chuột nhất trắng).

- **Lô 5: Livganic liều cao (Chiếu xạ + Livganic 1,8 g/kg) (n = 10):** Chuột được chiếu xạ, đồng thời uống Livganic liều 1,8 g/kg hàng ngày (liều gấp 3 lần liều tương đương với liều dùng trên lâm sàng, hệ số quy đổi là 12 trên chuột nhất trắng).

Vào ngày thứ 7 của nghiên cứu, chuột bắt đầu được uống levamisol và thuốc thử Livganic như trên trong 7 ngày. Ngày thứ 14, tiến hành giết chuột lấy máu và các tổ chức lympho để làm xét nghiệm.

Sơ đồ nghiên cứu:

Ngày 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Xạ 1Gy	Xạ 1Gy	Xạ 1Gy	Xạ 1Gy	Xạ 1Gy	Xạ 1Gy	Uống Livganic, levamisol hoặc nước cất						Giết chuột	
	Mẫn cảm												Phát hiện

Trên mô hình nghiên cứu, chuột phải trải qua ba giai đoạn: ức chế miễn dịch, mẫn cảm kháng nguyên và điều trị thuốc thử.

» **Ức chế miễn dịch:**

Dùng tác nhân kinh điển gây tổn thương hệ miễn dịch là tia xạ gamma; chuột được chiếu xạ toàn thân liều hàng ngày là 1Gy trong 6 ngày để gây tổn thương hệ thống miễn dịch của chuột.

» **Mẫn cảm kháng nguyên:**

- Kháng nguyên OA tiêm mũi duy nhất dọc sống lưng chuột liều 0,1 ml/chuột và HCC dung dịch 5%, tiêm màng bụng, thể tích duy nhất 0,5 ml/chuột (nhóm chứng dương).

- Tiêm phát hiện: Kháng nguyên OA và dung dịch NaCl 0,9% được tiêm vào hai gan bàn chân chuột với thể tích 0,05ml một ngày trước khi giết chuột làm xét nghiệm.

» **Điều trị thuốc thử:**

- Chuột ở lô 3 được sử dụng levamisol 100 mg/kg làm thuốc đối chứng dương.
- Chuột ở các lô 4,5 được uống thuốc thử. Thời gian uống thuốc thử là 6 ngày.

Các chỉ số đánh giá kết quả nghiên cứu:

» Các chỉ số chung:

- Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối: được tính là trọng lượng lách, tuyến ức tương ứng với thể trọng chuột.

$$\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức tương đối (\%)} = \frac{\text{Trọng lượng lách hoặc tuyến ức (mg)}}{\text{Thể trọng chuột (g)}}$$

Chuột được giết bằng cách kéo đứt đốt sống cổ, mổ bụng để bộc lộ lách, tuyến ức. Bóc tách lấy toàn bộ lách và tuyến ức và ngâm ngay vào dung dịch nuôi tế bào. Lọc sạch các tổ chức xung quanh, dùng gạc thấm khô rồi đem cân. Ghi lại trọng lượng lách, tuyến ức của từng chuột. Trọng lượng lách, tuyến ức tương đối bằng tỷ lệ trọng lượng các cơ quan này so với trọng lượng của từng chuột tương ứng.

- Số lượng bạch cầu chung, bạch cầu đa nhân trung tính, bạch cầu lympho, bạch cầu mônô và bạch cầu NK ở máu ngoại vi.

- Làm giải phẫu vi thể lách và tuyến ức. Xét nghiệm giải phẫu vi thể được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu và chẩn đoán sớm Ung thư, do PGS.TS. Lê Đình Roanh đọc và nhận định kết quả.

» Các thông số đánh giá miễn dịch dịch thể và qua trung gian tế bào:

- Đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua phản ứng quá mẫn chậm ở gan bàn chân chuột với kháng nguyên OA. Trước khi đo kết quả phản ứng quá mẫn chậm với kháng nguyên OA, tiêm 50 µl kháng nguyên OA (liều phát hiện) vào một bên gan bàn chân chuột, bên còn lại tiêm thể tích tương tự dung dịch BSA. Sau 24 giờ tiêm kháng nguyên phát hiện, đo bề dày hai gan bàn chân chuột bằng thước palmer.

- Định lượng IgG, cytokin IL₂ và IFN- α ở máu ngoại vi bằng phương pháp ELISA.

2.4.2. Tác dụng của Livganic trên mô hình viêm gan mạn

Mô hình viêm gan mạn tính được thực hiện bằng cách tiêm màng bụng carbon tetrachlorid 1 mL/kg (pha trong dầu oliu), hàng tuần, mỗi tuần 2 lần cách nhau 3 ngày [83],[91], trong 18 tuần.

Chuột được chia thành 5 lô như sau:

- **Lô 1 (chứng sinh học) (n = 10):** Chuột được tiêm màng bụng dầu oliu 1,0 mL/kg 2 lần/tuần, cách nhau 3 ngày, uống nước cất 0,1 mL/10g thể trọng hàng ngày.

- **Lô 2: Mô hình (tiêm CCl₄) (n = 16):** Chuột được tiêm màng bụng CCl₄ 1,0 mL/kg 2 lần/tuần, cách nhau 3 ngày, uống nước cất 0,1 ml/10 g thể trọng hàng ngày.

- **Lô 3: Chứng dương (tiêm CCl₄ + silymarin) (n = 16):** Chuột được tiêm màng bụng CCl₄ 1,0 mL/kg 2 lần/tuần, cách nhau 3 ngày, đồng thời uống thuốc chứng dương silymarin 200 mg/kg hàng ngày.

- **Lô 4: Livganic liều thấp (tiêm CCl₄ + Livganic 0,6 g/kg) (n = 16):** Chuột được tiêm màng bụng CCl₄ 1,0 mL/kg 2 lần/tuần, cách nhau 3 ngày, đồng thời uống Livganic liều 0,6 g/kg hàng ngày (liều tương đương với liều dùng trên lâm sàng, hệ số quy đổi là 12 trên chuột nhất trắng).

- **Lô 5: Livganic liều cao (tiêm CY + Livganic 1,8 g/kg) (n = 16):** Chuột được tiêm màng bụng CCl₄ 1,0 mL/kg 2 lần/tuần, cách nhau 3 ngày, đồng thời uống Livganic liều 1,8 g/kg hàng ngày (liều gấp 3 lần liều tương đương với liều dùng trên lâm sàng, hệ số quy đổi là 12 trên chuột nhất trắng).

Các chỉ số đánh giá kết quả nghiên cứu:

- Tỷ lệ chuột chết: Số chuột chết xảy ra trong quá trình nghiên cứu tới thời điểm kết thúc được ghi chép và so sánh giữa các lô.

- Hoạt độ ALT, AST, bilirubin toàn phần, cholesterol toàn phần, albumin trong máu được định lượng bằng máy hóa sinh.

- Định lượng công thức máu (đánh giá số lượng bạch cầu, số lượng hồng cầu, lượng hemoglobin).

- Định lượng hydroxyprolin trong gan: Định lượng hydroxyprolin toàn phần bằng phương pháp của Stegemann thông qua máy đo quang phổ tử ngoại – khả kiến [110].

- Định lượng collagen typ IV: Định lượng collagen thông qua phương pháp nhuộm Van Gieson, sau đó sử dụng phần mềm ImageJ để tính toán phần trăm diện tích vùng được nhuộm (collagen) trên vi trường [111].

- Hình ảnh đại thể gan và nhuộm vi thể HE.

2.4.3. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập và xử lý bằng phương pháp và thuật toán thống kê y sinh học trên phần mềm SPSS 16.

Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SE$. Kiểm định các giá trị bằng T –test và test trước sau (Avant – Apres). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tác dụng của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch

3.1.1. Mô hình suy giảm miễn dịch cấp bằng cyclophosphamid

Các chất có tác dụng kích thích và điều hòa miễn dịch hầu như không tác dụng trên súc vật có hệ miễn dịch bình thường, vì vậy để nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của một chất bắt buộc phải tiến hành trên súc vật đã bị gây suy giảm miễn dịch.

3.1.1.1. Kết quả đánh giá tình trạng chung của hệ miễn dịch

» Trọng lượng lách tương đối

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng lách tương đối

Lô	n	Trọng lượng lách tương đối ($\bar{X} \pm SE, 1:1000, \text{mg/g}$)
Lô 1: Chứng sinh học	8	8,83 \pm 0,63
Lô 2: Mô hình CY	8	14,60 \pm 1,32*
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	7,56 \pm 1,09 ^{△△△}
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	8	12,10 \pm 1,41
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	8	10,32 \pm 0,82 [△]

Chú thích: *: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$

[△]: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

^{△△△}: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,001$

Kết quả trình bày ở bảng 3.1 cho thấy:

CY làm tăng trọng lượng lách tương đối ở chuột nhắt trắng. Lemamisol làm giảm trọng lượng lách tương đối rất rõ rệt so với lô mô hình. Livganic ở liều 1,8 g/kg có tác dụng hạn chế có ý nghĩa thống kê sự gia tăng trọng lượng lách tương đối gây ra do CY ($p < 0,05$).

» Trọng lượng tuyến ức tương đối

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng tuyến ức tương đối

Lô	n	Trọng lượng tuyến ức tương đối ($\bar{X} \pm SE$, 1:1000, mg/g)
Lô 1: Chứng sinh học	8	4,17 \pm 0,22
Lô 2: Mô hình CY	8	2,39 \pm 0,22***
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	1,89 \pm 0,30***
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	8	1,52 \pm 0,24*** ^Δ
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	8	1,88 \pm 0,27***

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$.

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$.

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy: Trọng lượng tuyến ức tương đối ở lô mô hình (lô 2) giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học (lô 5) với $p \leq 0,001$. Trọng lượng tuyến ức tương đối ở lô uống Livganic 0,6 g/kg thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình, trọng lượng tuyến ức tương đối ở lô uống Livganic 1,8 g/kg tương đương với lô dùng levamisol không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

» Số lượng bạch cầu:

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của thuốc thử lên số lượng bạch cầu

Lô	n	Số lượng bạch cầu ($\bar{X} \pm SE$, G/l)
Lô 1: Chứng sinh học	8	2,34 \pm 0,12
Lô 2: Mô hình CY	8	1,21 \pm 0,20***
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	3,17 \pm 0,63 ^{ΔΔ}
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	8	0,75 \pm 0,15***
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	8	0,79 \pm 0,24***

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

^{ΔΔ}: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,01$

Kết quả trình bày ở bảng 3.3 cho thấy: CY làm giảm rõ rệt số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi của chuột. Levamisol có tác dụng làm tăng bạch cầu máu ngoại vi so với lô mô hình nhưng Livganic cả 2 liều không có tác dụng làm tăng bạch cầu máu ngoại vi so với lô mô hình ($p > 0,05$).

» Công thức bạch cầu

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của thuốc thử lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi

Thông số	Số lượng tuyệt đối các loại BC (G/l)				
	Lô 1 Chứng trắng n = 8	Lô 2 Mô hình n = 8	Lô 3 Levamisol n = 8	Lô 4 Livganic 0,6 g/kg n = 8	Lô 5 Livganic 1,8 g/kg n = 8
BC lympho	1,634 ± 0,151	0,368 ± 0,066***	1,235 ± 0,281 ^Δ	0,175 ± 0,047 ^{Δ***}	0,344 ± 0,138***
BCTT	0,676 ± 0,106	0,820 ± 0,152	1,816 ± 0,361 ^{Δ***}	0,416 ± 0,130 ^Δ	0,414 ± 0,104 ^Δ
BC NK	0,015 ± 0,005	0,010 ± 0,004	0,183 ± 0,054 ^{ΔΔ**}	0,004 ± 0,002	0,015 ± 0,008
BC acid	0,015 ± 0,007	0,010 ± 0,006	0,014 ± 0,009	0,005 ± 0,003	0,014 ± 0,005
BC mono	0,007 ± 0,004	0,005 ± 0,003	0,018 ± 0,012	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001

Chú thích: **: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,01$

***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

^{ΔΔ}: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,01$

BC: Bạch cầu; BCTT: Bạch cầu đa nhân trung tính.

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy:

CY làm giảm rõ rệt số lượng bạch cầu lympho trong máu ngoại vi. Levamisol làm tăng số lượng bạch cầu lympho và bạch cầu trung tính so với lô mô hình. Lô dùng Livganic liều 0,6 g/kg, số lượng bạch cầu lympho và bạch cầu trung tính giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Ở lô Livganic liều 1,8 g/kg, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về số lượng lympho so với lô mô hình, số lượng bạch cầu trung tính giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Ở cả hai lô uống Livganic, số lượng bạch cầu NK, bạch cầu acid và bạch cầu mono không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình và với lô chứng trắng.

3.1.1.2. Kết quả đánh giá miễn dịch dịch thể

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của thuốc thử lên nồng độ IgG máu ngoại vi

Lô	n	Nồng độ IgG ($\bar{X} \pm SE$, mg/mL)
Lô 1: Chứng sinh học	8	84,98 \pm 0,55
Lô 2: Mô hình CY	8	77,20 \pm 1,14***
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	81,47 \pm 0,62*** Δ
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	8	82,87 \pm 0,50* $\Delta\Delta\Delta$
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	8	83,35 \pm 1,20 $\Delta\Delta$

Chú thích: *: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$

***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

Δ : Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

$\Delta\Delta$: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,01$

Kết quả bảng 3.5 cho thấy: CY làm giảm rõ rệt nồng độ IgG máu ngoại vi so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Levamisol làm tăng nồng độ IgG máu ngoại vi so với lô mô hình. Livganic cả 2 liều cũng có tác dụng làm tăng nồng độ IgG máu ngoại vi tương đương với levamisol so với lô mô hình với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.1.1.3. Kết quả đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào

» Phản ứng bì với kháng nguyên OA:

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của thuốc thử đến phản ứng bì với kháng nguyên OA

Lô	n	Phản ứng bì: chiều dày bàn chân chuột ($\bar{X} \pm SE$, mm)
Lô 1: Chứng sinh học	8	2,95 \pm 0,07
Lô 2: Mô hình CY	8	3,04 \pm 0,10
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	2,93 \pm 0,11
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	8	3,27 \pm 0,16
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	8	3,48 \pm 0,09*** $\Delta\Delta\Delta$

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

$\Delta\Delta\Delta$: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,001$

Kết quả trình bày ở bảng 3.6 cho thấy: Livganic liều cao 1,8 g/kg làm tăng chiều dày bàn chân chuột so với lô mô hình và lô chứng dương levamisol ($p < 0,001$). Livganic liều 0,6 g/kg không làm tăng có ý nghĩa thống kê chiều dày bàn chân chuột so với lô mô hình.

» Định lượng các cytokin trong máu

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IL - 2

Lô	n	Nồng độ IL - 2 ($\bar{X} \pm SE$, pg/ml)
Lô 1: Chứng sinh học	8	7,73 \pm 0,23
Lô 2: Mô hình CY	8	2,97 \pm 0,46***
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	7,21 \pm 1,51 Δ
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	8	5,61 \pm 0,78*** $\Delta\Delta$
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	8	7,46 \pm 0,98 $\Delta\Delta$

Chú thích: **: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,01$

***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

Δ : Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

$\Delta\Delta$: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,01$

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.7 cho thấy:

CY gây ra tình trạng giảm rõ rệt nồng độ IL-2 trong máu ngoại vi. Levamisol có tác dụng làm tăng nồng độ IL – 2 so với lô mô hình. Livganic 0,6 g/kg có tác dụng làm tăng nồng độ IL -2 so với lô mô hình ($p < 0,05$), nhưng vẫn thấp hơn so với nhóm chứng sinh học. Livganic 1,8 g/kg có tác dụng làm tăng rõ rệt nồng độ IL -2 so với lô mô hình, nồng độ IL -2 ở lô Livganic 1,8 g/kg tương đương với levamisol và không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ TNF - α

Lô	n	Nồng độ TNF - α ($\bar{X} \pm SE$, pg/ml)
Lô 1: Chứng sinh học	8	5,01 \pm 0,59
Lô 2: Mô hình CY	8	16,55 \pm 2,75***
Lô 3: Chứng dương levamisol	8	8,33 \pm 1,40* ^Δ
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	8	9,95 \pm 0,75*** ^Δ
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	8	10,53 \pm 0,88***

Chú thích: *: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$

***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

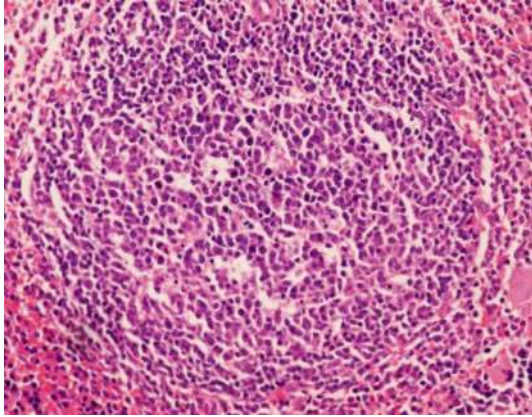
Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.8 cho thấy:

CY gây gia tăng rõ rệt nồng độ TNF – α trong máu ngoại vi của chuột nhắt. Levamisol có tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê TNF – α so với lô mô hình ($p < 0,05$). Livganic 0,6 g/kg làm giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ TNF – α so với lô mô hình. Livganic 1,8 g/kg không làm giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ TNF – α so với lô mô hình.

3.1.1.4. Giải phẫu vi thể lách và tuyến ức

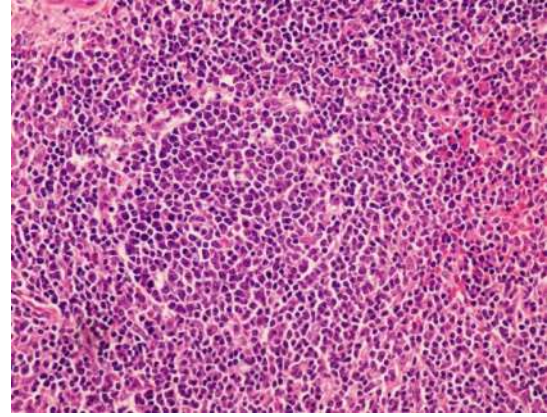
Bảng 3.9. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức.

Lô nghiên cứu	Lách	Tuyến ức
Lô 1: Chứng sinh học	Chuột số 2, số 3 và số 4: Các vùng tủy trắng của lách bình thường.	Chuột số 2, số 3 và số 4: Mô tuyến ức bình thường.
Lô 2: Mô hình CY	Chuột số 12, số 13 và số 14: Tủy trắng giảm số lượng và kích thước lympho bào.	Chuột số 12, số 13 và số 14: Giảm số lượng lympho bào tuyến ức.
Lô 3: Chứng dương levamisol 100 mg/kg	Chuột số 22: Tủy trắng giảm nhẹ kích thước, có tế bào thoái hóa. Chuột số 24: Tủy trắng có dấu hiệu phục hồi với số lượng và kích thước tế bào tăng. Chuột số 25: Các vùng tủy trắng của lách gần như bình thường hoặc giảm nhẹ.	Chuột số 22: Tuyến ức có giảm số lượng lympho bào. Chuột số 24: Tuyến ức có tăng lympho bào. Chuột số 25: Tuyến ức gần như bình thường.
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	Chuột số 61 và 62: Tủy trắng giảm nặng kích thước và giảm số lượng tế bào.	Chuột số 61 và 62: Tuyến ức có giảm số lượng lympho bào.
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	Chuột số 72 và 73: Tủy trắng giảm nặng kích thước và giảm số lượng tế bào.	Chuột số 72 và 73: Tuyến ức có giảm số lượng lympho bào



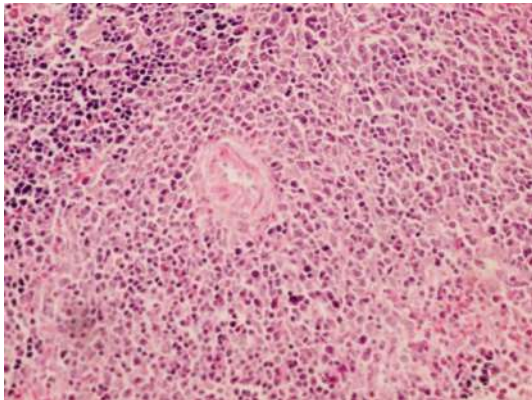
Ảnh 3.1: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô chứng sinh học (chuột số 2)
(HE × 4 00)

Lách bình thường



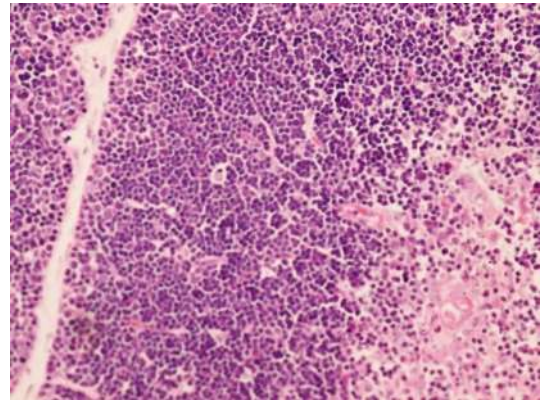
Ảnh 3.2: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô chứng sinh học (chuột số 2)
(HE × 400)

Tuyến ức bình thường



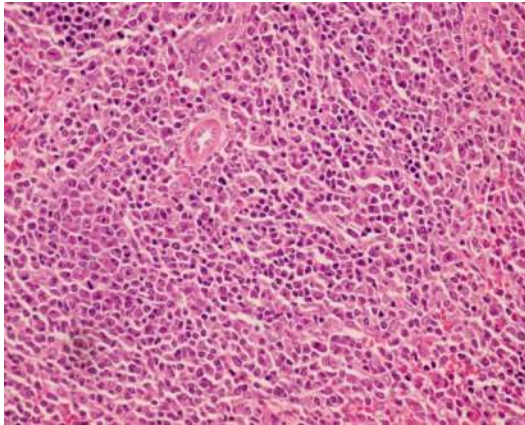
Ảnh 3.3: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô mô hình (chuột số 12)
(HE × 400)

*Tủy trắng giảm số lượng và kích
thước lympho bào*



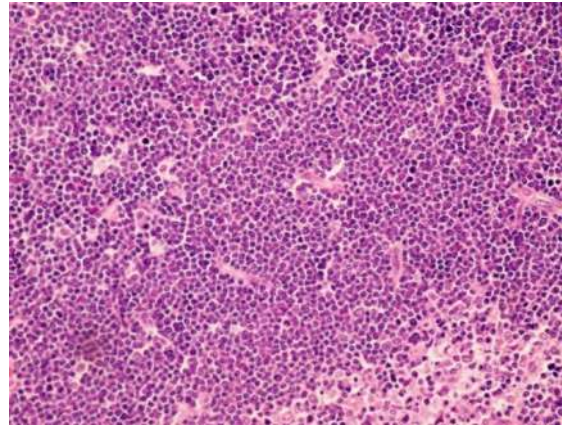
Ảnh 3.4: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô mô hình (chuột số 12)
(HE × 400)

Tuyến ức giảm số lượng lympho bào



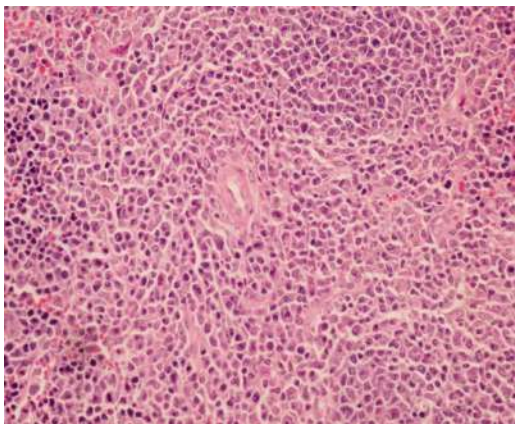
Ảnh 3.5: Hình ảnh vi thể lách
chuột lô uống levamisol
(chuột số 24) (HE × 400)

*Tủy trắng có dấu hiệu phục hồi với
kích thước và số lượng lympho bào
tăng*



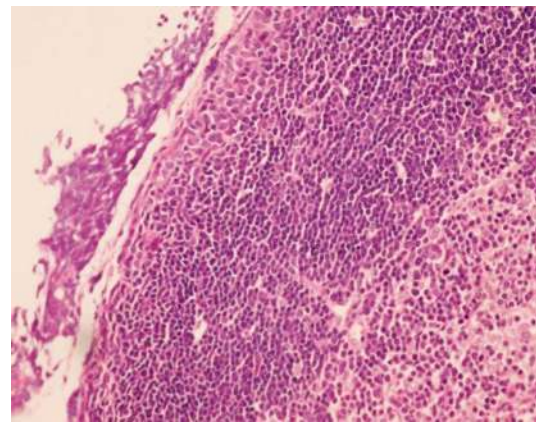
Ảnh 3.6: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống levamisol
(chuột số 24) (HE × 400)

Tuyến ức tăng số lượng lympho bào



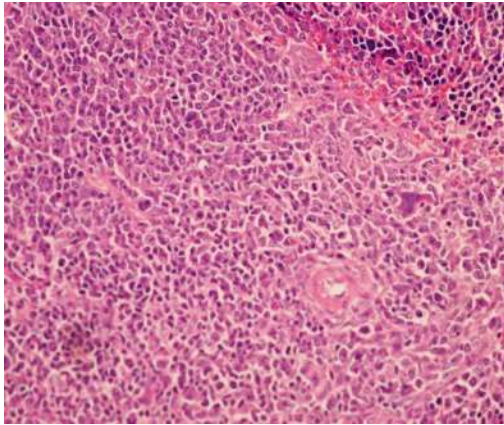
Ảnh 3.7: Hình ảnh vi thể lách
chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg
(chuột số 61) (HE × 400)

*Các vùng tủy trắng giảm nặng về
kích thước và số lượng lympho bào*



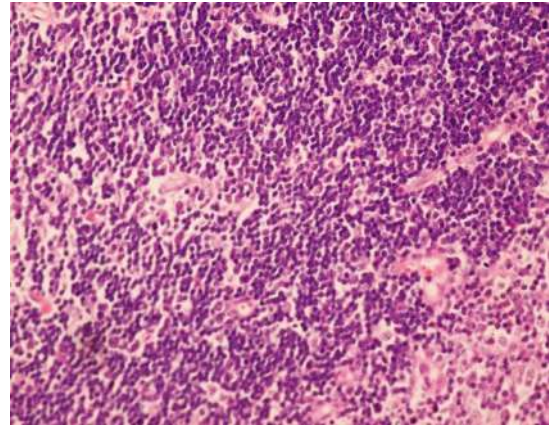
Ảnh 3.8: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg
(chuột số 61) (HE × 400)

Tuyến ức giảm nhẹ mật độ tế bào



Ảnh 3.9: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 73) (HE × 400)

Giảm nặng kích thước và số lượng lympho bào của vùng tủy trắng



Ảnh 3.10: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 73) (HE × 400)

Tuyến ức giảm số lượng lympho bào

Toàn bộ ảnh của các mẫu vi thể lách và tuyến ức trong nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY cấp tính được trình bày trong Phụ lục III.

Kết luận về giải phẫu bệnh: CY gây tổn thương rõ rệt ở cơ quan lympho trung ương là tuyến ức và lách. Levamisol có tác dụng hạn chế tổn thương gây ra do CY so với lô mô hình. Chưa có sự khác biệt giữa tổn thương hình ảnh vi thể lách và tuyến ức ở các lô dùng Livganic so với lô mô hình.

3.1.2. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY kéo dài

3.1.2.1. Kết quả đánh giá tình trạng chung của hệ miễn dịch

» Trọng lượng lách tương đối

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng lách tương đối

Lô	n	Trọng lượng lách tương đối ($\bar{X} \pm SE$, 1:1000, mg/g)
Lô 1: Chứng sinh học	10	4,88 ± 0,43
Lô 2: Mô hình	10	3,14 ± 0,61*
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	3,26 ± 0,60**
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	3,73 ± 0,39
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	3,04 ± 0,48**

Chú thích: *, **: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$; $0,01$

Kết quả trình bày ở bảng 3.10 cho thấy:

Cyclophosphamid liều 50 mg/kg trong 10 ngày liên tục làm giảm trọng lượng lách rõ rệt so với lô chứng sinh học. Levamisol 50 mg/kg, Livganic ở liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê trọng lượng lách tương đối so với lô mô hình. Tuy nhiên, ở lô Livganic liều 0,6 g/kg, trọng lượng lách tương đối không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học.

» **Trọng lượng tuyến ức tương đối**

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng tuyến ức tương đối

Lô	n	Trọng lượng tuyến ức tương đối ($\bar{X} \pm SE$, 1:1000, mg/g)
Lô 1: Chứng sinh học	10	2,85 \pm 0,25
Lô 2: Mô hình	10	1,22 \pm 0,15***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	1,04 \pm 0,07***
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	1,65 \pm 0,29**
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	1,37 \pm 0,13 ***

Chú thích: *, **, ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$; 0,01; 0,001

Kết quả ở bảng 3.11 cho thấy: Trọng lượng tuyến ức tương đối ở lô mô hình giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Levamisol không làm gia tăng trọng lượng tuyến ức tương đối. Livganic 0,6 g/kg và 1,8 g/kg làm tăng trọng lượng tuyến ức tương đối so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

» Số lượng bạch cầu:

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của thuốc thử lên số lượng bạch cầu

Lô	n	Số lượng bạch cầu ($\bar{X} \pm SE, G/l$)
Lô 1: Chứng sinh học	10	1,94 \pm 0,16
Lô 2: Mô hình	10	0,54 \pm 0,09***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	0,61 \pm 0,13***
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	0,68 \pm 0,14***
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	0,77 \pm 0,12***

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

Kết quả trình bày ở bảng 3.12 cho thấy:

Cyclophosphamid dùng kéo dài liên tục làm giảm rõ rệt số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi của chuột. Levamisol có tác dụng hạn chế sự giảm bạch cầu tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Livganic 0,6 g/kg và 1,8 g/kg làm hạn chế sự giảm bạch cầu tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

» Công thức bạch cầu

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của thuốc thử lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi

Thông số	Số lượng tuyệt đối các loại BC (G/l)				
	Lô 1 Chứng trắng n = 10	Lô 2 Mô hình n = 10	Lô 3 Levamisol n = 10	Lô 4 Livganic 0,6 g/kg n = 10	Lô 5 Livganic 1,8 g/kg n = 10
BC Trung tính	0,519 ± 0,078	0,179 ± 0,040**	0,155 ± 0,042**	0,159 ± 0,035***	0,217 ± 0,035**
BC Lympho	1,375 ± 0,116	0,344 ± 0,048***	0,437 ± 0,090***	0,496 ± 0,112***	0,527 ± 0,096***
BC Acid	0,008 ± 0,003	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,010 ± 0,005	0,009 ± 0,003
BC Base	0,014 ± 0,004	0,004 ± 0,002	0,001 ± 0,001**	0,001 ± 0,001**	0,002 ± 0,001
BC Mono	0,021 ± 0,007	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,003	0,007 ± 0,002	0,009 ± 0,002
NK	0,005 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,007 ± 0,002	0,008 ± 0,002	0,006 ± 0,002

Chú thích: **,***:Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,01$; $0,001$

BC: Bạch cầu; NK: Bạch cầu giết tự nhiên.

Kết quả ở bảng 3.13 cho thấy:

Cyclophosphamid nhiều liều nhỏ gây giảm rõ rệt bạch cầu trung tính và bạch cầu lympho.

Levamisol 50 mg/kg làm tăng số lượng bạch cầu trung tính và lympho so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Livganic 0,6 g/kg không làm thay đổi công thức bạch cầu có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

Livganic 1,8 g/kg làm tăng bạch cầu trung tính và lympho so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

3.1.2.2. Kết quả đánh giá miễn dịch dịch thể

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của thuốc thử lên nồng độ IgG máu ngoại vi

Lô	n	Nồng độ IgG ($\bar{X} \pm SE$, mg/mL)
Lô 1: Chứng sinh học	10	75,89 \pm 0,74
Lô 2: Mô hình CY	10	70,44 \pm 2,34*
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	76,97 \pm 1,09 ^d
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	76,07 \pm 0,86 ^d
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	73,53 \pm 1,46

Chú thích: *: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$

^d: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

Kết quả bảng 3.14 cho thấy:

Cyclophosphamid liều 50 mg/kg liên tục trong 10 ngày làm giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ IgG trong máu ở lô mô hình. Levamisol làm gia tăng nồng độ IgG có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Livganic liều 0,6 g/kg làm tăng có ý nghĩa thống kê nồng độ IgG máu. Livganic liều 1,8 g/kg có xu hướng làm tăng nồng độ IgG so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

3.1.2.3. Kết quả đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào

» Phản ứng bì với kháng nguyên OA:

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của thuốc thử đến phản ứng bì với kháng nguyên OA

Lô	n	Phản ứng bì: chiều dày bàn chân chuột ($\bar{X} \pm SE$, mm)
Lô 1: Chứng sinh học	10	2,68 \pm 0,06
Lô 2: Mô hình	10	2,49 \pm 0,04*
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	2,54 \pm 0,05*
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	2,68 \pm 0,07 ^d
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	2,53 \pm 0,06

Chú thích: *: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$

^d: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

Kết quả trình bày ở bảng 3.15 cho thấy:

Cyclophosphamid nhiều liều nhỏ làm giảm rõ rệt chiều dày bàn chân chuột so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$). Levamisol làm tăng chiều dày bàn chân chuột so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Livganic liều 0,6 g/kg làm gia tăng có ý nghĩa thống kê chiều dày chân chuột so với lô mô hình. Livganic liều 1,8 g/kg làm tăng chiều dày bàn chân chuột so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

» Định lượng các cytokin trong máu

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IL - 2

Lô	n	Nồng độ IL - 2 ($\bar{X} \pm SE$, pg/ml)
Lô 1: Chứng sinh học	10	74,89 \pm 6,96
Lô 2: Mô hình	10	99,48 \pm 13,60
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	152,14 \pm 27,42*
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	115,80 \pm 16,98*
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	125,78 \pm 37,18

Chú thích: *: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.16 cho thấy: Levamisol 50 mg/kg, Livganic 0,6 g/kg và 1,8 g/kg đều làm gia tăng nồng độ IL-2 so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IFN - α

Lô	n	Nồng độ IFN - α ($\bar{X} \pm SE$, pg/ml)
Lô 1: Chứng sinh học	10	389,92 \pm 29,77
Lô 2: Mô hình	10	591,16 \pm 50,59**
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	224,13 \pm 94,00 ^Δ
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	480,21 \pm 65,25
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	560,44 \pm 80,30*

Chú thích: *, **: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$; $0,01$

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.17 cho thấy:

Cyclophosphamid gây gia tăng rõ rệt nồng độ IFN - α trong máu ngoại vi của chuột nhắt ($P < 0,05$). Levamisol 50 mg/kg làm giảm sự gia tăng nồng độ IFN - α có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Livganic 0,6 g/kg và Livganic 1,8 g/kg đều làm giảm nồng độ IFN - α so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Số lượng tế bào CD4+, CD8a+ và CD19+

Kết quả được trình bày ở bảng 3.18:

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của Livganic lên các dấu ấn miễn dịch

Lô	n	CD19+	CD4+	CD8a+	Tỷ lệ CD4+/CD8a+
		($\bar{X} \pm SE$, G/l)			($\bar{X} \pm SE$)
Lô 1: Chứng sinh học	10	0,403 ± 0,056	0,719 ± 0,083	0,252 ± 0,022	2,96 ± 0,31
Lô 2: Mô hình	10	0,013 ± 0,004***	0,308 ± 0,045***	0,023 ± 0,003***	14,18 ± 1,97***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	0,029 ± 0,011***	0,393 ± 0,087*	0,016 ± 0,003***	26,84 ± 4,20***
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	0,028 ± 0,012***	0,439 ± 0,094*	0,029 ± 0,015***	31,69 ± 9,00** ^Δ
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	0,016 ± 0,005***	0,486 ± 0,092	0,024 ± 0,004***	21,78 ± 4,06***

Chú thích: *, **, ***: Khác biệt so với lô chứng với $p < 0,05$; $0,01$; $0,001$

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

Kết quả bảng 3.18 cho thấy:

Cyclophosphamid nhiều liều nhỏ làm giảm rõ rệt số lượng các dấu ấn miễn dịch CD4+, CD8a+, CD19+ trên chuột nhắt trắng ở lô mô hình. Cyclophosphamid làm gia tăng tỉ lệ CD4+/CD8a+ có ý nghĩa thống kê so với lô hình.

Thuốc chứng dương levamisol làm tăng CD4+ và CD19+ so với lô mô hình nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

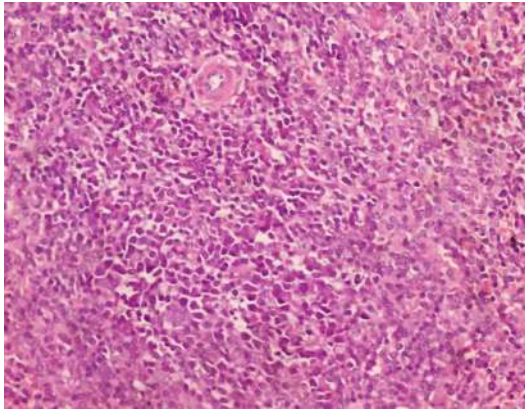
Livganic liều 0,6 g/kg làm tăng tất cả các chỉ số CD19+, CD4+ và CD8a so với lô mô hình nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Chỉ số CD4+/CD8a+ ở lô Livganic liều 0,6 g/kg tăng cao có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình cho thấy Livganic làm tăng CD4+ nhiều hơn CD8a+.

Livganic liều 1,8 g/kg không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê các chỉ số CD19+, CD8a+ và chỉ số CD4+/CD8a+ so với lô mô hình. Chỉ số CD4+ ở lô Livganic liều 1,8 g/kg không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học tuy nhiên không tăng có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

3.1.2.4. Giải phẫu vi thể lách và tuyến ức

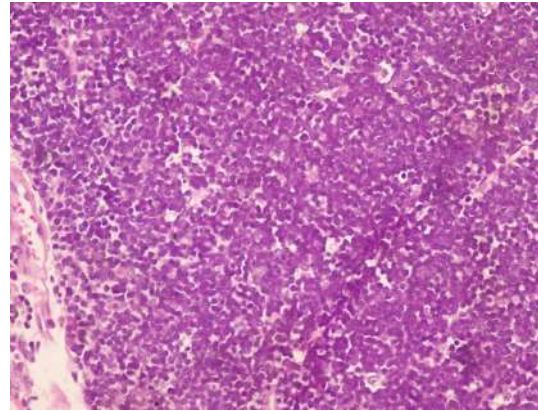
Bảng 3.19. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức.

Mã số chuột	Lách	Tuyến ức
1 (Lô 1: Chứng sinh học)	Lách bình thường	Tuyến ức bình thường
2 (Lô 1: Chứng sinh học)	Lách bình thường	Tuyến ức bình thường
3 (Lô 1: Chứng sinh học)	Lách bình thường	Tuyến ức bình thường
10 (Lô 2: Mô hình)	Lách teo nặng của tủy trắng	Tuyến ức chuyển dạng của tế bào lympho, teo nhỏ.
12 (Lô 2: Mô hình)	Lách teo nặng của tủy trắng	Tuyến ức: chuyển dạng của tế bào lympho, teo nhỏ.
13 (Lô 2: Mô hình)	Lách teo nặng của tủy trắng	Tuyến ức: teo nặng, còn rất ít lympho bào, có xâm nhập viêm gồm lympho bào và bạch cầu đa nhân.
20 (Lô 3: Chứng dương levamisol)	Teo nặng mô lympho của tủy trắng	Giảm nặng lympho bào
21 (Lô 3: Chứng dương levamisol)	Teo nặng mô lympho của tủy trắng, xuất hiện một số nguyên bào miễn dịch.	Mất các lympho bào thuần thực, xuất hiện các lympho bào chuyển dạng
23 (Lô 3: Chứng dương levamisol)	Có teo nặng mô lympho của tủy trắng	Có chuyển dạng của hầu hết các lympho bào tuyến ức, teo nặng của mô tuyến ức.
38 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Teo nặng mô lympho của tủy trắng	Teo nặng, có chuyển dạng của hầu hết các lympho bào.
39 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Teo nặng mô lympho của tủy trắng	Có giảm rất nặng các lympho bào thuần thực và xuất hiện nhiều lympho bào chuyển dạng.
43 (Lô 5: Livganic 0,6 g/kg)	Teo nặng mô lympho của tủy trắng	Có chuyển dạng của hầu hết các lympho bào.
45 (Lô 5: Livganic 1,8 g/kg)	Teo rất nặng mô lympho của tủy trắng	Teo nặng, có chuyển dạng của hầu hết lympho bào
50 (Lô 5: Livganic 1,8 g/kg)	Teo nặng mô lympho của tủy trắng	Teo và chuyển dạng của lympho



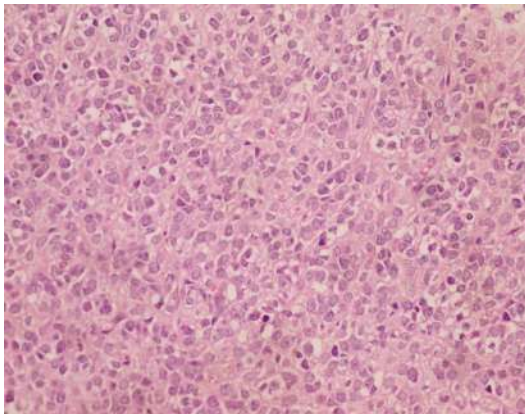
Ảnh 3.11: Hình ảnh vi thể lách
chuột lô chứng sinh học (chuột số
1)
(HE × 100)

Lách bình thường

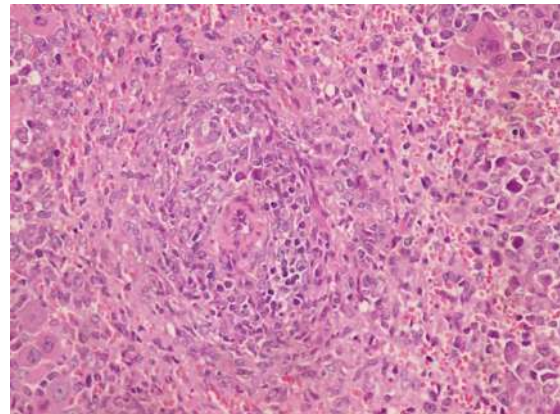


Ảnh 3.12: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô chứng sinh học (chuột số 1)
(HE × 100)

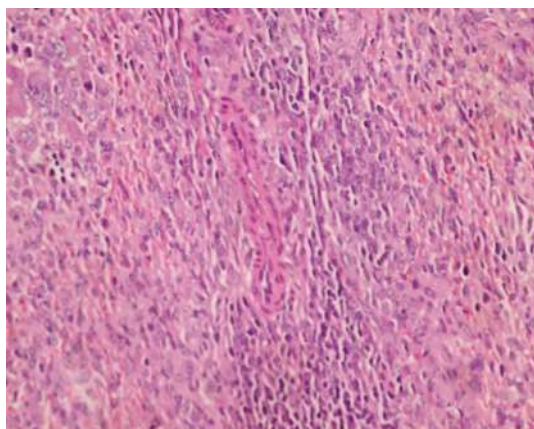
Tuyến ức bình thường



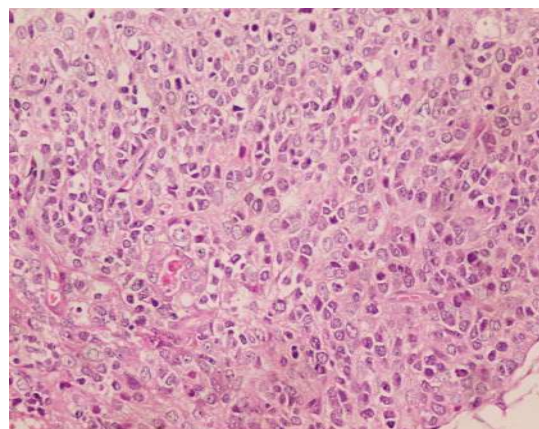
Ảnh 3.13: Hình ảnh vi thể lách
chuột lô mô hình
(chuột số 11) (HE × 100)
Tủy trắng teo nặng



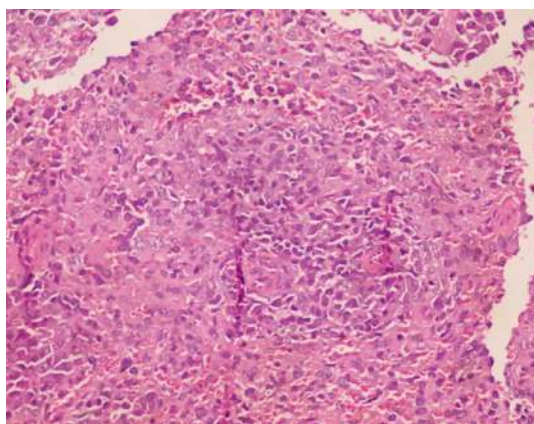
Ảnh 3.14: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô mô hình (chuột số 11)
(HE × 100): *Tuyến ức chuyển dạng
của tế bào lympho, teo nhỏ.*



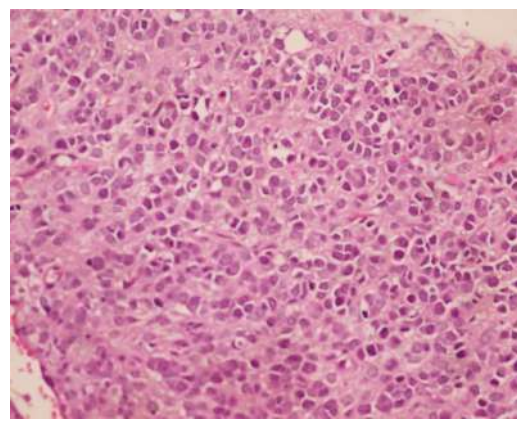
Ảnh 3.15: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống levamisol (chuột số 23) (HE × 100): *Có teo nặng mô lympho của tủy trắng*



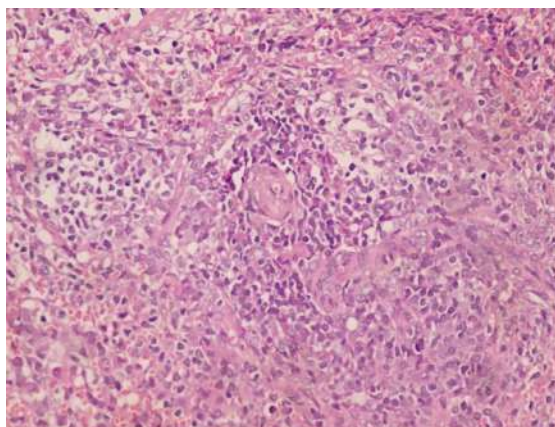
Ảnh 3.16: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống levamisol (chuột số 23) (HE × 100): *Có chuyển dạng của hầu hết các lympho bào tuyến ức, teo nặng của mô tuyến ức.*



Ảnh 3.17: Hình ảnh vi thể lách chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 38) (HE × 100)
Teo nặng mô lympho của tủy trắng

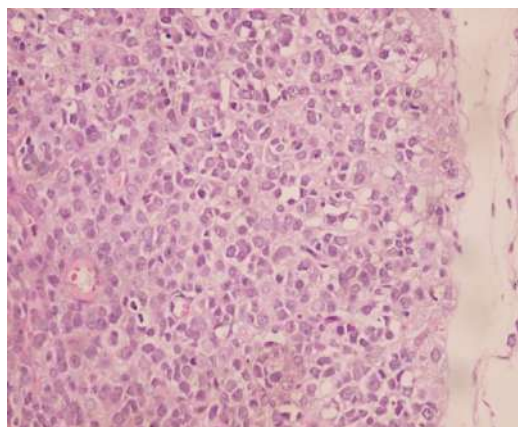


Ảnh 3.18: Hình ảnh vi thể tuyến ức chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 38) (HE × 100)
Teo nặng, có chuyển dạng của hầu hết các lympho bào



Ảnh 3.19: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số
45) (HE × 100)

***Teo rất nặng mô lympho của tủy
trắng***



Ảnh 3.20: Hình ảnh vi thể tuyến
ức chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg
(chuột số 45) (HE × 100)

***Teo nặng, có chuyển dạng của hầu
hết lympho bào***

Toàn bộ ảnh của các mẫu vi thể lách và tuyến ức trong nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY mạn tính được trình bày trong Phụ lục IV.

Kết luận về giải phẫu bệnh: Cyclophosphamid nhiều liều nhỏ gây tổn thương rõ ràng mô lách và tuyến ức trên hình ảnh giải phẫu bệnh ở lô mô hình. Levamisol 50 mg/kg, Livganic 0,6 g/kg và Livganic 1,8 g/kg không cho thấy sự thay đổi rõ ràng hình ảnh giải phẫu bệnh so với lô mô hình.

3.1.3. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ

3.1.3.1. Kết quả đánh giá tình trạng chung của hệ miễn dịch

» Trọng lượng lách tương đối

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng lách tương đối

Lô	n	Trọng lượng lách tương đối ($\bar{X} \pm SE, 1:1000, \text{mg/g}$)
Lô 1: Chứng sinh học	10	8,8 \pm 0,89
Lô 2: Mô hình	10	4,98 \pm 0,73**
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	3,66 \pm 0,32***
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	3,69 \pm 0,64***
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	3,66 \pm 0,32***

Chú thích: *, **: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05; 0,01$

Kết quả trình bày ở bảng 3.20 cho thấy:

Chiếu xạ làm giảm trọng lượng lách tương đối ở chuột nhất trắng. Lemamisol và Livganic ở liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê trọng lượng lách tương đối so với lô mô hình.

» Trọng lượng tuyến ức tương đối

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng tuyến ức tương đối

Lô	n	Trọng lượng tuyến ức tương đối ($\bar{X} \pm SE, 1:1000, \text{mg/g}$)
Lô 1: Chứng sinh học	10	3,29 \pm 0,18
Lô 2: Mô hình	10	2,48 \pm 0,22*
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	2,61 \pm 0,21*
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	2,30 \pm 0,26**
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	2,41 \pm 0,29*

Chú thích: *, **: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05; 0,01$.

Kết quả ở bảng 3.21 cho thấy: Trọng lượng tuyến ức tương đối ở lô mô hình khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học ($p < 0,05$). Levamisol, Livganic 0,6 g/kg và 1,8 g/kg không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê trọng lượng tuyến ức tương đối so với lô mô hình.

» **Số lượng bạch cầu:**

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của thuốc thử lên số lượng bạch cầu

Lô	n	Số lượng bạch cầu ($\bar{X} \pm SE, G/l$)
Lô 1: Chứng sinh học	10	$3,16 \pm 0,37$
Lô 2: Mô hình	10	$0,29 \pm 0,02^{***}$
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	$0,41 \pm 0,04^{*** \Delta}$
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	$0,37 \pm 0,05^{***}$
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	$0,38 \pm 0,03^{*** \Delta}$

Chú thích: ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

Kết quả trình bày ở bảng 3.22 cho thấy:

Chiều xạ làm giảm rõ rệt số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi của chuột. Levamisol có tác dụng rõ rệt làm tăng bạch cầu máu ngoại vi so với lô mô hình ($p < 0,05$). Livganic 1,8 g/kg có tác dụng rõ rệt làm tăng bạch cầu máu ngoại vi so với lô mô hình ($p < 0,05$), Livganic 0,6 g/kg không làm tăng có ý nghĩa thống kê số lượng bạch cầu máu ngoại vi so với lô mô hình.

» Công thức bạch cầu

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của thuốc thử lên công thức bạch cầu ở máu ngoại vi

Thông số	Số lượng tuyệt đối các loại BC (G/l)				
	Lô 1 Chứng trắng n = 10	Lô 2 Mô hình n = 10	Lô 3 Levamisol n = 10	Lô 4 Livganic 0,6 g/kg n = 10	Lô 5 Livganic 1,8 g/kg n = 10
BC lympho	2,3333 ± 0,2857	0,2214 ± 0,0156 ***	0,3244 ± 0,0350 *** ^Δ	0,2547 ± 0,0466 ***	0,2922 ± 0,0263 *** ^Δ
BCTT	0,7598 ± 0,0931	0,0602 ± 0,0066 ***	0,0898 ± 0,0099 *** ^Δ	0,0727 ± 0,0124 ***	0,0834 ± 0,0084 *** ^Δ
BC Mono	0.0080 ± 0.0053	0.0022 ± 0.0008	0.0036 ± 0.0013	0.0021 ± 0.0007	0.0022 ± 0.0009
BC acid	0,0223 ± 0,0106	0,0009 ± 0,0005	0,0009 ± 0,0005	0,0021 ± 0,0008	0,0024 ± 0,008
BC base	0,0070 ± 0,0046	0,0018 ± 0,0007	0,0009 ± 0,0005	0,0007 ± 0,0006	0,0020 ± 0,008
NK	0,0296 ± 0,0095	0,0029 ± 0,0005 *	0,0050 ± 0,0012 *	0,0025 ± 0,0008 **	0,0021 ± 0,009 *

Chú thích: *:Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$

**.:Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,01$

***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,001$

^Δ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$

BC: Bạch cầu; BCTT: Bạch cầu trung tính; NK: Bạch cầu giết tự nhiên.

Kết quả ở bảng 3.23 cho thấy:

Chiếu xạ làm giảm rõ rệt bạch cầu lympho và BCTT so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$);

Levamisol làm tăng bạch cầu lympho và BCTT so với lô mô hình. Levamisol không làm tăng có ý nghĩa thống kê số lượng bạch cầu acid, base, mono và NK so với lô mô hình.

Livganic liều 0,6 g/kg không làm tăng có ý nghĩa thống kê số lượng các loại bạch cầu so với lô mô hình.

Livganic liều 1,8 g/kg làm tăng bạch cầu lympho và BCTT so với lô mô hình. Livganic liều 1,8 g/kg không làm tăng có ý nghĩa thống kê số lượng bạch cầu acid, base, mono và NK so với lô mô hình.

3.1.3.2. Kết quả đánh giá miễn dịch dịch thể

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của thuốc thử lên nồng độ IgG máu ngoại vi

Lô	n	Nồng độ IgG ($\bar{X} \pm SE$, mg/mL)
Lô 1: Chứng sinh học	10	85,79 \pm 4,92
Lô 2: Mô hình CY	10	90,49 \pm 5,03
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	86,15 \pm 4,60
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	80,79 \pm 5,35
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	76,24 \pm 7,00

Kết quả bảng 3.24 cho thấy:

Nồng độ IgG máu không bị thay đổi có ý nghĩa thống kê do chiếu xạ. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô sử dụng levamisol và các lô sử dụng Livganic so với lô mô hình.

3.1.3.3. Kết quả đánh giá miễn dịch qua trung gian tế bào

» Phản ứng bì với kháng nguyên OA:

Bảng 3.25. Ảnh hưởng của thuốc thử đến phản ứng bì với kháng nguyên OA

Lô	n	Phản ứng bì: chiều dày bàn chân chuột ($\bar{X} \pm SE$, mm)
Lô 1: Chứng sinh học	10	2,70 \pm 0,10
Lô 2: Mô hình	10	2,21 \pm 0,06**
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	2,50 \pm 0,08 ^{ΔΔ}
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	2,43 \pm 0,07* ^Δ
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	2,29 \pm 0,09**

Chú thích: *, **: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$; $0,01$

^{Δ, ΔΔ}: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$; $0,01$

Kết quả trình bày ở bảng 3.25 cho thấy:

Chiều xạ làm giảm rõ rệt chiều dày bàn chân chuột so với lô chứng sinh học ($p < 0,01$). Levamisol làm tăng có ý nghĩa thống kê chiều dày bàn chân chuột so với lô mô hình ($p < 0,01$). Livganic liều 0,6 g/kg làm tăng chiều dày bàn chân chuột so với lô mô hình ($p < 0,05$). Livganic liều 1,8 g/kg không làm tăng có ý nghĩa thống kê chiều dày bàn chân chuột so với lô mô hình.

» Định lượng các cytokin trong máu

Bảng 3.26. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IL - 2

Lô	n	Nồng độ IL - 2 ($\bar{X} \pm SE$, pg/ml)
Lô 1: Chứng sinh học	10	79,73 \pm 7,43
Lô 2: Mô hình	10	91,14 \pm 7,09
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	90,35 \pm 3,37
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	85,76 \pm 7,34
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	97,88 \pm 6,93

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.26 cho thấy:

Nồng độ IL-2 máu không bị thay đổi có ý nghĩa thống kê do chiếu xạ. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa lô sử dụng levamisol và Livganic 0,6 g/kg so với lô mô hình. Livganic liều 1,8 g/kg làm tăng nồng độ IL-2 máu nhưng chưa có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

Bảng 3.27. Ảnh hưởng của thuốc thử đến nồng độ IFN - α

Lô	n	Nồng độ IFN - α ($\bar{X} \pm SE$, pg/ml)
Lô 1: Chứng sinh học	10	248,86 \pm 33,14
Lô 2: Mô hình	10	535,44 \pm 43,87***
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	440,66 \pm 52,37**
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	481,24 \pm 47,97**
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	482,14 \pm 47,48**

Chú thích: **, ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,01$; $0,001$

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.27 cho thấy:

Chiếu xạ gây gia tăng rõ rệt nồng độ IFN - α trong máu ngoại vi của chuột nhắt ($P < 0,001$). Levamisol không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê IFN - α so với lô mô hình. Livganic 0,6 g/kg và Livganic 1,8 g/kg có xu hướng làm giảm nhưng không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê nồng độ IFN - α so với lô mô hình.

3.1.3.4. Các dấu ấn miễn dịch CD4, CD8a và CD19

Kết quả được trình bày ở bảng 3.28

Bảng 3.28. Ảnh hưởng của Livganic lên các dấu ấn miễn dịch

Lô	n	CD19+	CD4+	CD8a+	Tỷ lệ CD4+/CD8a+
		($\bar{X} \pm SE$, G/l)			($\bar{X} \pm SE$)
Lô 1: Chứng sinh học	10	0,259 ± 0,061	0,770 ± 0,109	0,347 ± 0,076	2,61 ± 0,39
Lô 2: Mô hình	10	0,014 ± 0,003***	0,082 ± 0,015***	0,020 ± 0,003***	4,22 ± 0,35**
Lô 3: Chứng dương levamisol	10	0,015 ± 0,003	0,065 ± 0,006	0,021 ± 0,004	3,88 ± 0,75
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	10	0,009 ± 0,002	0,048 ± 0,010	0,012 ± 0,002	4,23 ± 0,45
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	10	0,011 ± 0,002	0,055 ± 0,007	0,023 ± 0,002	2,60 ± 0,46 ^Δ

Chú thích: **, ***: Khác biệt so với lô chứng với $p < 0,01$; $0,001$

^Δ: Khác biệt so với lô mô hình với $p < 0,05$

Kết quả bảng 3.28 cho thấy:

Chiếu xạ làm giảm rõ rệt số lượng các dấu ấn miễn dịch CD19+, CD4+ và CD8a+ trên chuột nhất trắng ở lô mô hình. Chiếu xạ làm gia tăng tỉ lệ CD4+/CD8a+ có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

Thuốc chứng dương levamisol chưa làm thay đổi có ý nghĩa thống kê số lượng các dấu ấn miễn dịch CD19+, CD4+, CD8a+ so với lô mô hình. Levamisol làm giảm tỉ lệ CD4+/Cd8a+ so với lô mô hình tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

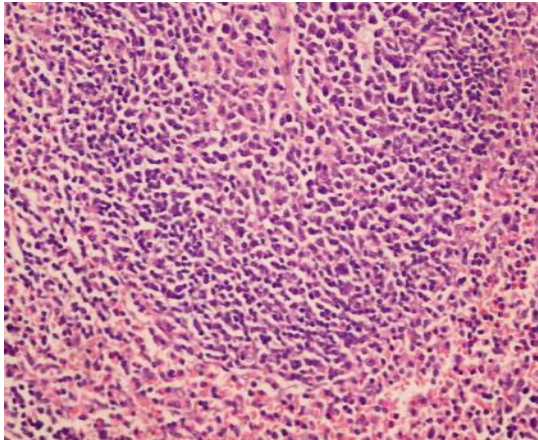
Livganic cả hai liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg không làm thay đổi có ý nghĩa thống kê các chỉ số CD19+, CD4+ và CD8a+. Tuy nhiên Livganic liều 1,8 g/kg làm giảm có ý nghĩa thống kê tỉ lệ CD4+/CD8a+ so với lô mô hình.

3.1.3.5. Giải phẫu vi thể lách và tuyến ức

Bảng 3.29. Kết quả giải phẫu vi thể lách và tuyến ức.

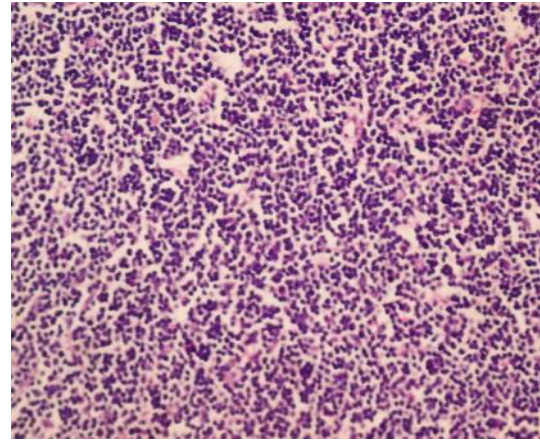
Mã số chuột	Lách	Tuyến ức
1 (Lô 1: Chứng sinh học)	Lách tủy trắng bình thường Kết luận: Mô lympho của lách bình thường	Tuyến ức bình thường Kết luận: Mô lympho của tuyến ức bình thường
6 (Lô 1: Chứng sinh học)	Lách tủy trắng bình thường Kết luận: Mô lympho của lách bình thường	Tuyến ức bình thường Kết luận: Mô lympho của tuyến ức bình thường
9 (Lô 1: Chứng sinh học)	Tủy trắng giảm kích thước và số lượng lympho bào. Kết luận: Lách có giảm kích thước và số lượng lympho bào	Giảm số lượng tế bào tuyến ức Kết luận: Giảm số lượng tế bào tuyến ức
21 (Lô 2: Mô hình)	Giảm kích thước và số lượng lymphobào của tủy trắng, xuất hiện các lympho bào thuần thực trong tủy trắng (resting lympho cytes) Kết luận: Lách có giảm kích thước và số lượng lympho bào	Tuyến ức gần như bình thường Kết luận: Tuyến ức trong giới hạn bình thường
13 (Lô 2: Mô hình)	Giảm kích thước và số lượng lymphobào của tủy trắng, xuất hiện các lympho bào thuần thực trong tủy trắng (resting lympho cytes) Kết luận: Lách có giảm kích thước và số lượng lympho bào	Giảm số lượng tế bào tuyến ức vùng vỏ Kết luận: Giảm số lượng tế bào
17 (Lô 2: Mô hình)	Giảm kích thước và số lượng lymphobào của tủy trắng, xuất hiện các lympho bào thuần thực trong tủy trắng (resting lympho cytes) Kết luận: Lách có giảm kích thước và số lượng lympho bào	Giảm số lượng tế bào tuyến ức vùng vỏ Kết luận: Giảm số lượng tế bào
25 (Lô 3: Levamisol)	Giảm kích thước và số lượng lympho bào của tủy trắng Kết luận: Lách giảm kích thước và số lượng lympho bào của tủy trắng	Tuyến ức trong giới hạn bình thường Kết luận: Tuyến ức trong giới hạn bình thường

Mã số chuột	Lách	Tuyến ức
31 (Lô 3: Levamisol)	Giảm kích thước và số lượng lymphobào của tủy trắng, xuất hiện các lympho bào thuần thực Kết luận: Lách giảm kích thước và số lượng lympho bào của tủy trắng	Tuyến ức không có thay đổi rõ rệt Kết luận: Tuyến ức không có thay đổi rõ rệt
33 (Lô 3: Levamisol)	Giảm nhẹ số lượng lympho bào vùng tủy trắng Kết luận: Lách giảm nhẹ số lượng lympho bào vùng tủy trắng	Tuyến ức không có thay đổi rõ rệt Kết luận: Tuyến ức không có thay đổi rõ rệt
36 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Số lượng lympho bào của tủy trắng gần như bình thường Kết luận: Lách gần như bình thường	Số lượng tế bào tuyến ức ở vùng vỏ gần như bình thường Kết luận: Tuyến ức gần như bình thường
41 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Có giảm kích thước và số lượng lympho bào của tủy trắng. Có xuất hiện các lympho bào thuần thực và tương bào trong vùng tủy trắng Kết luận: Giảm số lượng và kích thước lympho bào của tủy trắng lách	Có giảm số lượng tế bào của vùng vỏ Kết luận: Giảm số lượng tế bào vùng vỏ tuyến ức
49 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Các vùng tủy trắng có kích thước và số lượng lympho gần như bình thường Kết luận: Tủy trắng của lách gần như bình thường	Các tế bào vùng vỏ bình thường về số lượng và hình thái Kết luận: Tuyến ức bình thường
52 (Lô 4: Livganic 1,8 g/kg)	Có giảm rõ kích thước và số lượng lympho bào của tủy trắng Kết luận: Lách có giảm kích thước và số lượng lympho bào của tủy trắng	Có giảm số lượng tế bào vùng vỏ Kết luận: Giảm số lượng tế bào vùng vỏ của tuyến ức
54 (Lô 4: Livganic 1,8 g/kg)	Có giảm kích thước và số lượng lympho bào rõ rệt của tủy trắng Kết luận: Giảm rõ rệt kích thước và số lượng lympho bào của tủy trắng	Tuyến ức có giảm số lượng tế bào vùng vỏ Kết luận: Giảm số lượng tế bào vùng vỏ tuyến ức
61 (Lô 4: Livganic 1,8 g/kg)	Kích thước và số lượng lympho bào của tủy trắng gần như bình thường Kết luận: Mô lympho vùng tủy trắng gần như bình thường	Số lượng tế bào vùng vỏ gần như bình thường Kết luận: Số lượng tế bào vùng vỏ gần như bình thường



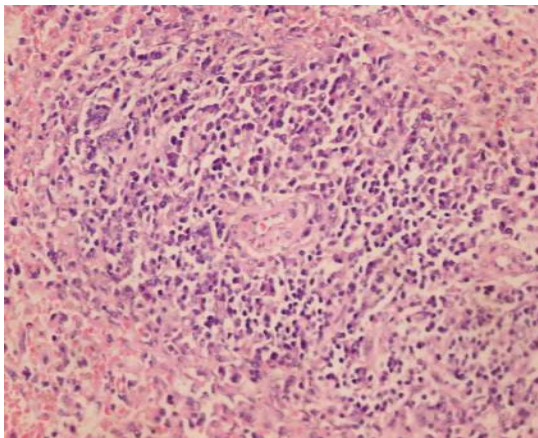
Ảnh 3.21: Hình ảnh vi thể lách
chuột lô chứng sinh học
(chuột số 2) (HE × 100)

Lách bình thường



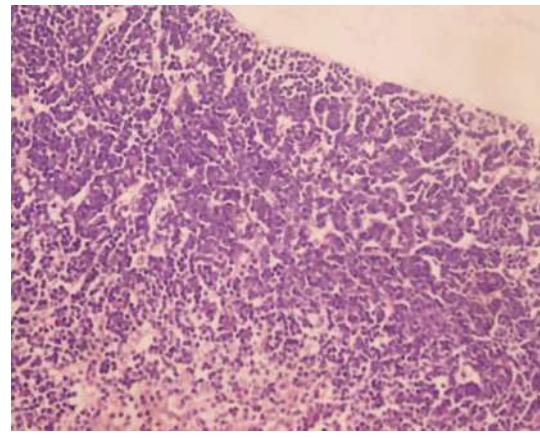
Ảnh 3.22: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô chứng sinh học
(chuột số 2) (HE × 100)

Tuyến ức bình thường



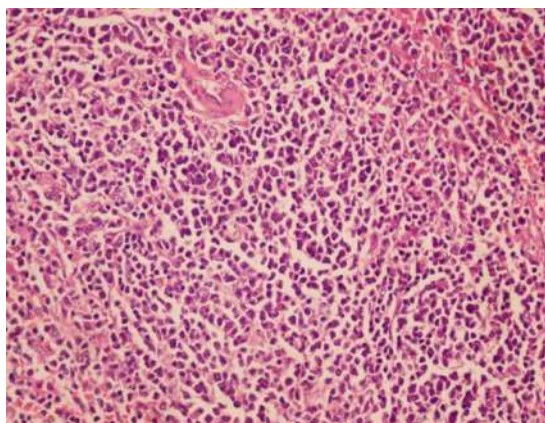
Ảnh 3.23: Hình ảnh vi thể lách
chuột lô mô hình (chuột số 13)
(HE × 100)

*Tủy trắng giảm số lượng và kích
thước lympho bào*



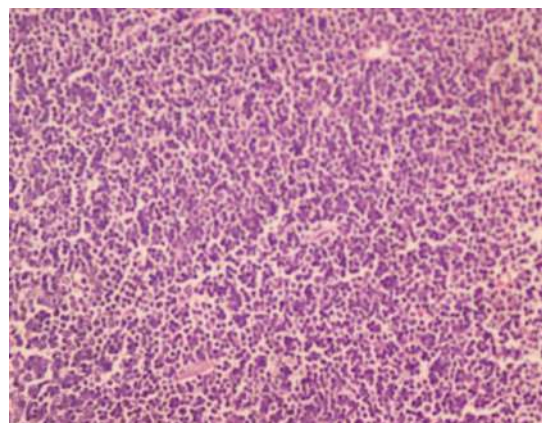
Ảnh 3.24: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô mô hình (chuột số 13)
(HE × 100)

Tuyến ức giảm số lượng lympho bào



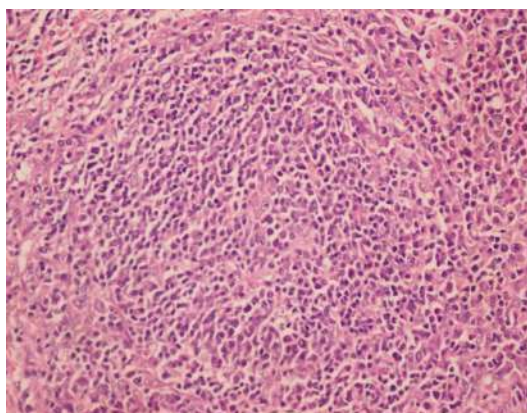
Ảnh 3.25: Hình ảnh vi thể lách chuột
lô uống levamisol (chuột số 33)
(HE × 100)

*Lách giảm nhẹ số lượng lympho bào
vùng tủy trắng*



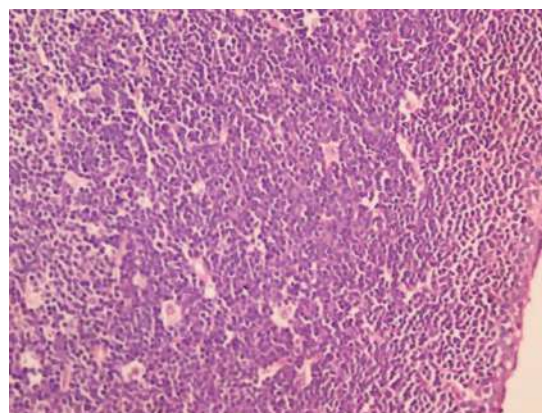
Ảnh 3.26: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống levamisol (chuột số 33)
(HE × 100)

Tuyến ức không có thay đổi rõ rệt



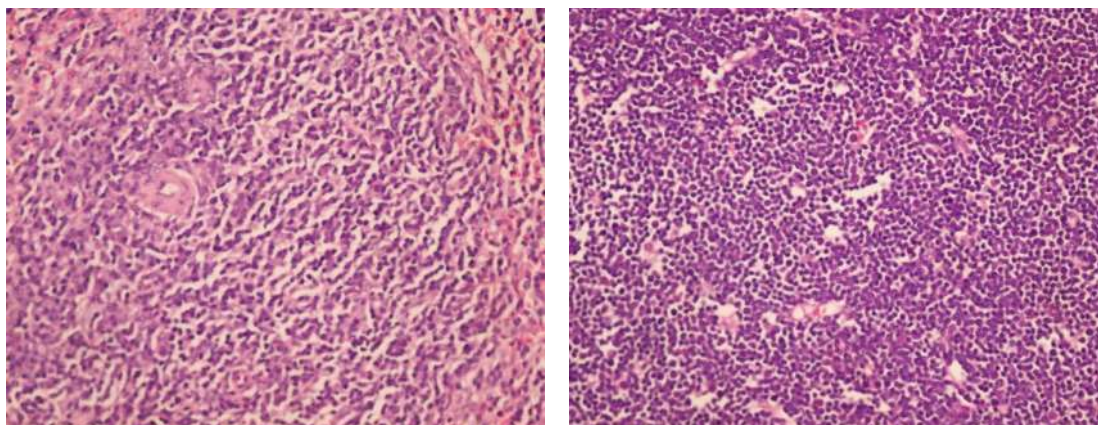
Ảnh 3.27: Hình ảnh vi thể lách
chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg
(chuột số 36) (HE × 100)

Lách gần như bình thường



Ảnh 3.28: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg
(chuột số 36) (HE × 100)

Tuyến ức gần như bình thường



**Ảnh 3.29: Hình ảnh vi thể lách
chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg
(chuột số 61) (HE × 100)**

***Mô lympho vùng tủy trắng gần như
bình thường***

**Ảnh 3.30: Hình ảnh vi thể tuyến ức
chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg
(chuột số 61) (HE × 100)**

***Số lượng tế bào vùng vỏ gần như
bình thường***

Toàn bộ ảnh của các mẫu vi thể lách và tuyến ức trong nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ được trình bày trong Phụ lục V.

Kết luận về giải phẫu bệnh: Chiếu xạ làm tổn thương rõ rệt cấu trúc của lách và tuyến ức trên hình ảnh vi thể. Levamisol có tác dụng rõ rệt cải thiện tổn thương của lách và tuyến ức gây ra do chiếu xạ trên hình ảnh vi thể. Livganic liều 0,6 g/kg có tác dụng cải thiện tổn thương của lách và tuyến ức gây ra do chiếu xạ (2/3 mẫu có hình ảnh vi thể lách và tuyến ức không có thay đổi rõ rệt hoặc gần như bình thường). Ở lô uống Livganic liều 1,8 g/kg, có 1/3 mẫu có hình ảnh vi thể lách và tuyến ức gần như bình thường.

3.2. Tác dụng của viên nén Livganic trên mô hình viêm gan mạn tính

3.2.1. Kết quả về ảnh hưởng tỷ lệ chuột chết, trọng lượng và hình thái gan

» Tỷ lệ chuột chết:

Bảng 3.30. Số lượng chuột chết sau 18 tuần

Lô	Số lượng chuột ban đầu	Số lượng chuột chết (tỷ lệ %)	Số lượng chuột còn sống (tỷ lệ %)
Lô 1: Chứng sinh học	10	0 (0%)	10
Lô 2: Mô hình	16	6 (37,5%)	10 (62,5%)
Lô 3: Chứng dương silymarin	16	6 (37,5%)	10 (62,5%)
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	16	3 (18,8%)	13 (81,2%)
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	16	0 (0%)	16 (100%)

Kết quả trình bày ở bảng 3.30 cho thấy sau 18 tuần, CCl₄ gây chết 37,5% (6/16) ở lô mô hình. Tỷ lệ chuột chết không được cải thiện ở lô sử dụng silymarin nhưng có sự cải thiện rõ rệt ở 2 lô chuột uống Livganic, thậm chí không có chuột chết ở lô uống Livganic liều 1,8 g/kg.

» Trọng lượng gan:

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của thuốc thử lên trọng lượng gan

Lô	n	Trọng lượng gan tuyệt đối ($\bar{x} \pm SE$, g)	Trọng lượng gan tương đối ($\bar{x} \pm SE$, % g/g)
Lô 1: Chứng sinh học	10	1,84 ± 0,13	3,69 ± 0,14
Lô 2: Mô hình	10	3,12 ± 0,26 ^{***}	6,28 ± 0,43 ^{***}
Lô 3: Chứng dương silymarin	10	2,56 ± 0,17 ^{**}	5,04 ± 0,18 ^{***Δ}
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	13	2,30 ± 0,12 ^{*ΔΔ}	4,56 ± 0,13 ^{***ΔΔΔ}
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	16	2,19 ± 0,18 ^{ΔΔ}	4,79 ± 0,19 ^{***ΔΔ}

Chú thích: *, **, ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$; $0,01$; $0,001$

Δ, ΔΔ, ΔΔΔ: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$; $0,01$; $0,001$

Kết quả trình bày ở bảng 3.31 cho thấy: CCl₄ làm gia tăng rõ rệt trọng lượng gan tuyệt đối và tương đối. Ở cả hai lô uống Livganic 0,6 g/kg và 1,8 g/kg, trọng lượng gan tuyệt đối và tương đối đều giảm có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 lô uống Livganic.

» **Hình thái đại thể gan:**

Ảnh 3.31: Hình ảnh đại thể gan lô Chứng sinh học (chuột số 1): Gan bình thường



Ảnh 3.32: Hình ảnh đại thể gan lô Chứng sinh học (chuột số 2): Gan bình thường



Ảnh 3.33: Hình ảnh đại thể gan chuột lô mô hình (chuột số 17): Hình ảnh xơ gan (nhạt màu, mất độ bóng, có khối xơ)



Ảnh 3.34: Hình ảnh đại thể gan chuột lô mô hình (chuột số 20): Hình ảnh xơ gan (nhạt màu, mất độ bóng, có khối xơ)



Ảnh 3.35: Hình ảnh đại thể gan chuột Lô Silymarin (chuột số 24): Gan gần như bình thường



Ảnh 3.36: Hình ảnh đại thể gan chuột Lô Silymarin (chuột số 25): Gan gần như bình thường



Ảnh 3.37: Hình đại thể gan chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 36): Gan gần như bình thường



Ảnh 3.38: Hình đại thể gan chuột lô uống Livganic 0,6 g/kg (chuột số 37): Gan nhạt màu, mất độ bóng



Ảnh 3.39: Hình đại thể gan chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 51): Gan gần như bình thường



Ảnh 3.40: Hình đại thể gan chuột lô uống Livganic 1,8 g/kg (chuột số 54): Gan gần như bình thường

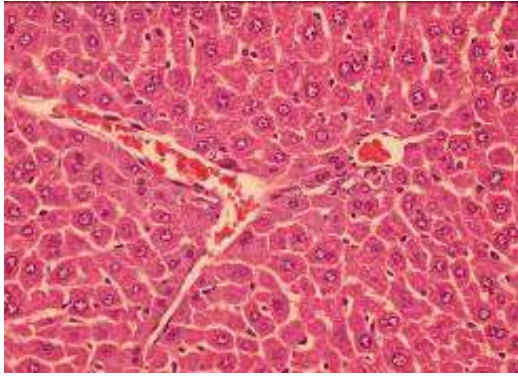
Kết quả đại thể gan cho thấy: Ở lô mô hình: Nhiều mẫu bệnh phẩm thể hiện rõ rệt tình trạng tổn thương gan theo kiểu xơ hóa gan (gan mất độ bóng, nhạt màu, nổi các khối xơ trên bề mặt). Ở các lô còn lại, hầu hết các mẫu bệnh phẩm đều cho hình ảnh gan ít tổn thương hơn so với lô mô hình, nhiều mẫu gan có hình ảnh đại thể gần như mẫu gan bình thường.

» **Hình thái vi thể gan**

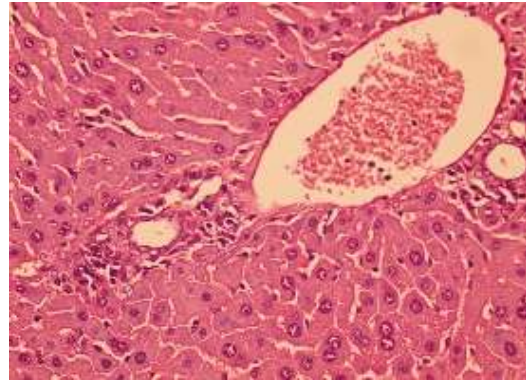
Bảng 3.32. Kết quả giải phẫu vi thể gan

Mã số chuột	Giải phẫu vi thể gan
1 (Lô 1: Chứng sinh học)	Hình ảnh gan bình thường
5 (Lô 1: Chứng sinh học)	Hình ảnh gan bình thường
6 (Lô 1: Chứng sinh học)	Hình ảnh gan bình thường
8 (Lô 1: Chứng sinh học)	Hình ảnh gan bình thường
10 (Lô 1: Chứng sinh học)	Hình ảnh gan bình thường
17 (Lô 2: Mô hình)	Xơ gan, xâm nhập viêm và thoái hóa gan mức độ vừa
19 (Lô 2: Mô hình)	Không thấy xơ gan, có phì đại nhân tế bào gan, thoái hóa tế bào gan
20 (Lô 2: Mô hình)	Xơ gan nhẹ, xâm nhập viêm và phì đại nhân tế bào gan
21 (Lô 2: Mô hình)	Xơ gan nhẹ, xâm nhập viêm lan tỏa và thoái hóa mức độ vừa của gan
24 (Lô 3: Levamisol)	Xơ gan nhẹ, xâm nhập viêm nặng khoảng cửa
25 (Lô 3: Levamisol)	Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm rất nhẹ ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan

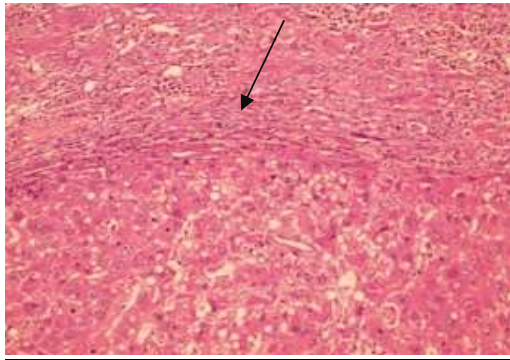
26 (Lô 3: Levamisol)	Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm rất nhẹ ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan
27 (Lô 3: Levamisol)	Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm rất nhẹ ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan
28 (Lô 3: Levamisol)	Xơ gan nhẹ cục bộ, xâm nhập viêm ở khoảng cửa và thoái hóa nhẹ tế bào gan
36 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm rất nhẹ ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan
37 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Không thấy xơ gan, có thoái hóa nhẹ tế bào gan, xâm nhập viêm nhẹ ở khoảng cửa
38 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan
39 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Không thấy xơ gan, có phì đại tế bào gan, xâm nhập viêm khoảng cửa
40 (Lô 4: Livganic 0,6 g/kg)	Không thấy xơ gan, tế bào gan gần như bình thường, có xâm nhập bạch cầu đa nhân và lympho bào ở số ít khoảng cửa
51 (Lô 4: Livganic 1,8 g/kg)	Không thấy xơ gan, có thoái hóa nhẹ tế bào gan, xâm nhập viêm nhẹ ở khoảng cửa
52 (Lô 4: Livganic 1,8 g/kg)	Không thấy xơ gan, xâm nhập viêm nặng ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan và một vùng thoái hóa nặng, hoại tử
53 (Lô 4: Livganic 1,8 g/kg)	Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm rất nhẹ ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan
60 (Lô 4: Livganic 1,8 g/kg)	Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm ở một số khoảng cửa, tế bào gan gần như bình thường
61 (Lô 4: Livganic 1,8 g/kg)	Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm ở một số khoảng cửa, tế bào gan gần như bình thường



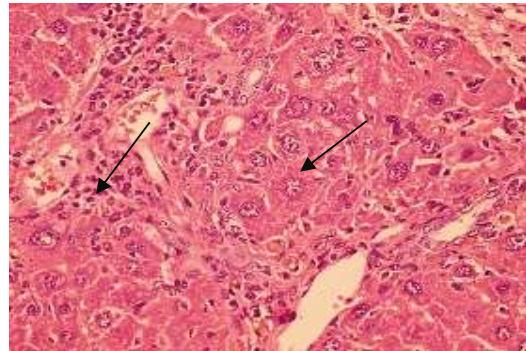
Ảnh 3.41: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng sinh học (chuột số 1) (HE × 100):
Gan bình thường



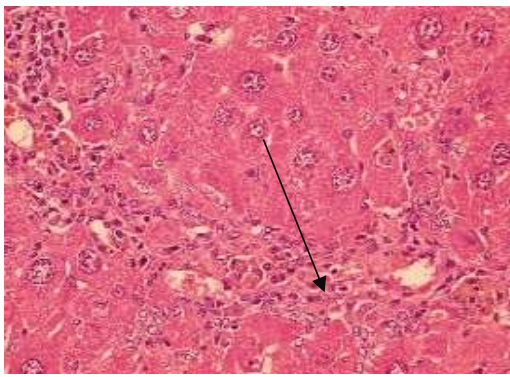
Ảnh 3.42: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng sinh học (chuột số 6) (HE × 100):
Gan bình thường



Ảnh 3.43: Hình ảnh vi thể gan chuột Mô hình (chuột số 17) (HE × 100): Xơ gan, xâm nhập viêm và thoái hóa gan mức độ vừa



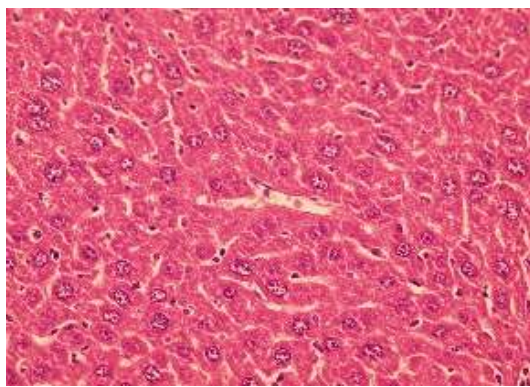
Ảnh 3.44 Hình ảnh vi thể gan chuột Mô hình (chuột số 20) (HE × 100): Xơ gan nhẹ, xâm nhập viêm và phì đại nhân tế bào gan



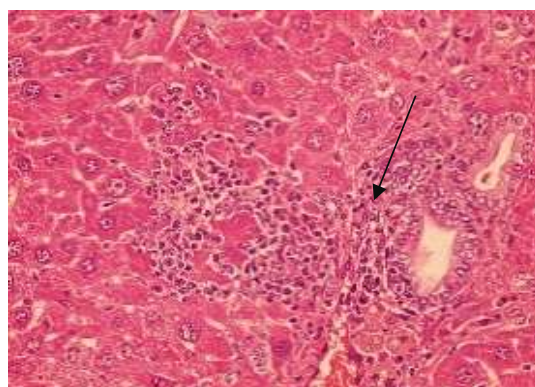
Ảnh 3.45: Hình ảnh vi thể gan chuột Chứng dương (chuột số 24) (HE × 100): Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm rất nhẹ ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan



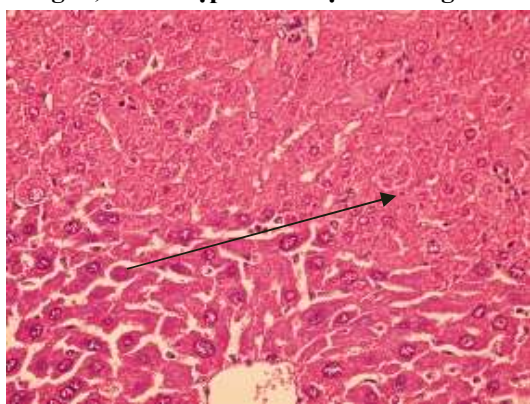
Ảnh 3.46: Hình ảnh vi thể gan chuột Chứng dương (chuột số 26) (HE × 100): Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm rất nhẹ ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan



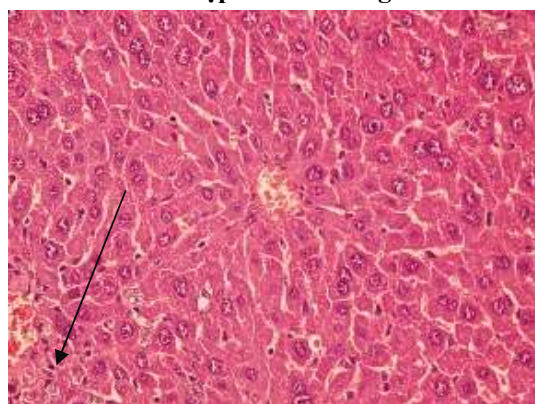
Ảnh 3.47: Hình ảnh vi thể gan chuột Livganic 0,6 g/kg (chuột số 36) (HE × 100): Không thấy xơ gan, có thoái hóa nhẹ tế bào gan, xâm nhập viêm nhẹ ở khoảng cửa



Ảnh 3.48: Hình ảnh vi thể gan chuột Livganic 0,6 g/kg (chuột số 38) (HE × 100): Không thấy xơ gan, có phì đại tế bào gan, xâm nhập viêm khoảng cửa



Ảnh 3.49: Hình ảnh vi thể gan chuột Livganic 1,8 g/kg (chuột số 51) (HE × 100): Không thấy xơ gan, xâm nhập viêm nặng ở khoảng cửa, thoái hóa nhẹ tế bào gan và một vùng thoái hóa nặng, hoại tử



Ảnh 3.50: Hình ảnh vi thể gan chuột Livganic 1,8 g/kg (chuột số 53) (HE × 100): Không thấy xơ gan, có xâm nhập viêm ở một số khoảng cửa, tế bào gan gần như bình thường

Kết quả về giải phẫu bệnh như sau: Không có tổn thương gan ở lô chứng sinh học. CCl_4 gây ra tình trạng xâm nhập viêm, xơ hóa gan ở 4/5 mẫu bệnh phẩm với các mức độ khác nhau. Ở lô uống silymarin, chỉ có 1/5 mẫu bệnh phẩm quan sát rõ hình ảnh xơ hóa tế bào gan mức nhẹ. Ở tất cả các mẫu bệnh phẩm của cả 2 lô uống Livganic liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg đều không quan sát thấy hình ảnh xơ hóa gan nhưng vẫn còn tình trạng xâm nhập viêm, thoái hóa nhẹ tế bào gan.

3.2.2. Kết quả đánh giá chức năng gan thông qua xét nghiệm máu

» Hoạt độ ALT, AST, bilirubin, albumin, cholesterol toàn phần trong máu:

Kết quả bảng 3.32 cho thấy sau 18 tuần tiêm CCl₄ hoạt độ ALT, AST và nồng độ bilirubin tăng lên rõ rệt nhưng nồng độ albumin và cholesterol toàn phần lại giảm rõ rệt ở lô mô hình.

Thuốc chứng dương silymarin làm giảm hoạt độ ALT, AST, nồng độ bilirubin toàn phần và tăng cholesterol toàn phần có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình nhưng sự tăng albumin khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Livganic cả hai liều đều không làm giảm hoạt độ ALT, AST, nồng độ bilirubin toàn phần có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình nhưng lại làm tăng nồng độ albumin, cholesterol có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học.

Bảng 3.33. Ảnh hưởng của thuốc thử đến hoạt độ AST, ALT và nồng độ bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần

Lô	n	AST ($\bar{X} \pm SE$, mmol/L)	ALT ($\bar{X} \pm SE$, mmol/L)	Albumin ($\bar{X} \pm SE$, g/dL)	Bilirubin ($\bar{X} \pm SE$, mmol/L)	Cholesterol ($\bar{X} \pm SE$, mmol/L)
Lô 1: Chứng sinh học	10	172,2 ± 10,1	74,0 ± 5,8	3,09 ± 0,10	1,33 ± 0,11	2,96 ± 0,15
Lô 2: Mô hình	10	305,4 ± 50,2*	152,2 ± 29,2*	2,51 ± 0,08***	1,74 ± 0,12*	2,09 ± 0,11***
Lô 3: Chứng dương silymarin	10	260,2 ± 33,3*	144,6 ± 17,7**	2,78 ± 0,13	1,29 ± 0,16 ^Δ	3,15 ± 0,31 ^{ΔΔ}
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	13	289,7 ± 31,5**	144,2 ± 10,9***	2,82 ± 0,07* ^Δ	2,02 ± 0,17*	2,45 ± 0,10* ^Δ
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	16	286,1 ± 30,1*	143,1 ± 18,3*	3,03 ± 0,05 ^{ΔΔΔ}	1,79 ± 0,20	2,54 ± 0,13 ^Δ

Chú thích: *, **, ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05; 0,01; 0,001$

^{Δ, ΔΔ, ΔΔΔ}: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05; 0,01; 0,001$

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tác dụng của Livganic liều 0,6 g/kg và của liều 1,8 g/kg ở tất cả các chỉ số trong bảng 3.32.

» Công thức máu:

Bảng 3.34. Ảnh hưởng của thuốc thử lên một số chỉ số huyết học

Lô	n	Số lượng BC ($\bar{X} \pm SE$, G/L)	Số lượng hồng cầu ($\bar{X} \pm SE$, G/L)	Số lượng huyết sắc tố ($\bar{X} \pm SE$, g/L)
Lô 1: Chứng sinh học	10	4,43 \pm 0,41	8,11 \pm 0,10	12,26 \pm 0,18
Lô 2: Mô hình	10	7,22 \pm 0,92*	6,52 \pm 0,25***	10,03 \pm 0,32***
Lô 3: Chứng dương silymarin	10	5,82 \pm 0,66	6,66 \pm 0,39**	10,56 \pm 0,49**
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	13	6,87 \pm 0,78*	7,30 \pm 0,21 ^d	11,22 \pm 0,33 ^d
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	16	5,02 \pm 0,42 ^d	7,76 \pm 0,27 ^{d,d}	12,07 \pm 0,41 ^{d,d}

Chú thích: *, **, ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$; $0,01$; $0,001$
^{d, d, d, d, d, d}: Khác biệt so với Mô hình với $p < 0,05$; $0,01$; $0,001$

Kết quả ở bảng 3.33 cho thấy CCl₄ làm gia tăng số lượng bạch cầu, làm giảm số lượng hồng cầu và huyết sắc tố có ý nghĩa thống kê ở lô mô hình so với lô chứng sinh học. Silymarin có xu hướng làm cải thiện cả 3 chỉ số trên nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Livganic liều 0,6 g/kg làm tăng số lượng hồng cầu và số lượng huyết sắc tố có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình, tuy nhiên không làm giảm số lượng bạch cầu có ý nghĩa thống kê. Livganic liều 1,8 g/kg làm cải thiện có ý nghĩa thống kê cả 3 chỉ số trên so với lô mô hình, nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học.

3.2.3. Ảnh hưởng lên các chỉ số đánh giá mức độ xơ gan

Bảng 3.35. Ảnh hưởng của thuốc thử lên hàm lượng hydroxyprolin và lượng collagen typ IV

Lô	n	Hydroxyprolin ($\bar{X} \pm SE$, mg/g)	Collagen typ IV ($\bar{X} \pm SE$, %)
Lô 1: Chứng sinh học	10	336,3 \pm 19,6	0,1205 \pm 0,0056
Lô 2: Mô hình	10	553,4 \pm 29,1***	6,3441 \pm 0,2879***
Lô 3: Chứng dương silymarin	10	505,3 \pm 37,1**	6,3536 \pm 0,9556***
Lô 4: Livganic 0,6 g/kg	13	512,7 \pm 23,2***	5,7145 \pm 0,6265***
Lô 5: Livganic 1,8 g/kg	16	497,0 \pm 23,6***	5,3212 \pm 0,5392***

Chú thích: *, **, ***: Khác biệt so với Chứng sinh học với $p < 0,05$; 0,01; 0,001

Kết quả ở bảng 3.34 cho thấy CCl₄ làm gia tăng rõ rệt lượng hydroxyprolin và collagen typ IV ở lô mô hình so với lô chứng sinh học. Thuốc chứng dương silymarin có xu hướng làm giảm hydroxyprolin tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, nhưng không làm thay đổi lượng collagen typ IV. Livganic cả hai liều đều có xu hướng làm giảm lượng hydroxyprolin và collagen typ IV nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic

4.1.1. Tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch do CY

4.1.1.1. Tác dụng trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp bằng CY

Mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY

Ngày nay, những hiểu biết về cơ chế bệnh sinh của bệnh lý viêm gan mạn và xơ gan, đặc biệt là bệnh lý gây ra do virus, cho thấy rằng suy giảm miễn dịch là một yếu tố rất quan trọng dẫn tới thất bại của cơ thể trong quá trình chống lại virus viêm gan và điều này dẫn tới các tổn thương mạn tính của gan, cuối cùng là xơ gan, ung thư gan [1],[3],[45],[46]. Do kết quả khả quan từ một số nghiên cứu trước đây (số liệu chưa công bố) của viên nén Livganic lên tình trạng nhiễm HBV ở bệnh nhân viêm gan B, một giả thuyết được đặt ra là liệu viên nén Livganic có tác dụng tăng cường miễn dịch hay không.

Trước khi tiến hành các thử nghiệm chính thức và mở rộng trên người, bước đầu tiên cho việc tìm đáp án cho giả thuyết trên là tiến hành đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của viên nén Livganic trên mô hình động vật thực nghiệm. Mô hình động vật lý tưởng nhất có thể được sử dụng để đánh giá tác dụng của viên nén Livganic là mô hình suy giảm miễn dịch và viêm gan mạn gây ra bằng virus viêm gan B trên động vật. Tuy nhiên, nhiều loài động vật miễn nhiễm tự nhiên với virus viêm gan B [112]. Tiến hành mô hình nhiễm virus viêm gan B trên một số loài linh trưởng như tinh tinh gặp nhiều khó khăn khi thực hiện tại Việt Nam. Do vậy, để đánh giá đặc điểm tác dụng lên hệ miễn dịch của Livganic, các mô hình suy giảm miễn dịch bằng hóa chất và bằng tia xạ đã được sử dụng trong nghiên cứu này.

CY là thuốc thuộc nhóm alkyl hóa gây suy giảm miễn dịch được sử dụng phổ biến trên lâm sàng để điều trị một số bệnh lý ung thư và rối loạn miễn dịch [116]. Cơ chế tác dụng của CY làm ngăn chặn phân chia DNA và có thể gây ra tình trạng chết tế bào trong cơ thể, điều này dẫn tới tổn thương nhiều cơ quan của hệ miễn dịch, là những cơ quan có sự hoạt động phân chia tế bào ở mức độ cao, kết quả làm suy giảm miễn dịch. Bản thân cyclophosphamid là chất không có hoạt tính, vì vậy không có tác dụng tại chỗ, chẳng hạn như không có tác dụng trên da. Khi đi vào cơ thể, cyclophosphamid biến đổi sinh học thành các sản phẩm chuyển hóa ion aziridinium có hoạt tính alkyl hóa. Các sản phẩm này phản ứng và liên kết đồng hóa trị với những gốc guanin trên DNA tạo thành liên kết chéo giữa hai dải DNA. Nhờ alkyl hóa DNA, thuốc có tác dụng ngăn chặn sự sao chép và phiên mã DNA [116]. Tác dụng mạnh nhất của cyclophosphamid là tác dụng ức chế chu kỳ tế bào trong các giai đoạn G2 và S. Cyclophosphamid ức chế chung sự phân chia của tất cả các tế bào đang tăng sinh, vì vậy gây ra những tác dụng không mong muốn trên nhiều cơ quan và mô. Đồng thời, tác dụng này dẫn tới suy giảm miễn dịch.

CY gây suy giảm cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào, vì vậy CY được sử dụng như là tác nhân gây suy giảm miễn dịch trên mô hình động vật thực nghiệm để đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của thuốc mới [115], [117]. CY có thể gây ra tình trạng suy giảm miễn dịch cấp tính khi sử dụng ở liều cao hoặc suy giảm miễn dịch kéo dài khi sử dụng nhiều liều nhỏ. Thông thường, các nhà nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam hay sử dụng CY liều cao gây mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính. Trong bệnh lý viêm gan, suy giảm miễn dịch xảy ra sau một quá trình lâu dài đáp ứng miễn dịch với tác nhân gây viêm gan. Do vậy, trong nghiên cứu này, cả hai mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY liều cao và CY nhiều liều nhỏ được sử dụng nhằm đánh giá đầy đủ hơn đặc điểm kích thích miễn dịch của viên nén Livganic.

CY liều duy nhất 200 mg/kg đã được sử dụng phổ biến tại Việt Nam và trên thế giới để gây suy giảm miễn dịch cấp tính [65],[118]. Phạm Thị Vân Anh (2011) đã sử dụng thành công mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY liều duy nhất 200 mg/kg, biểu hiện thông qua sự giảm các chỉ số miễn dịch quan trọng như số lượng bạch cầu, số lượng bạch cầu trung tính, giảm tạo hoa hồng mẫn cảm, giảm khả năng đáp ứng với kháng nguyên OA [65].

Kết quả cho thấy CY liều duy nhất 200 mg/kg đã gây suy giảm miễn dịch rõ ràng trên chuột nhất trắng thông qua chỉ số miễn dịch chung, miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào. Trong nghiên cứu này, CY làm giảm rõ rệt trọng lượng tuyến ức tương đối ($p < 0,001$), số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi, BC lympho ($p < 0,001$), giảm nồng độ IgG trong máu ngoại vi ($p < 0,001$), giảm nồng độ IL-2 ($p < 0,001$) của chuột khi so sánh với lô chứng sinh học. Qua kết quả trên có thể thấy CY gây giảm bạch cầu lympho nhiều hơn các loại bạch cầu khác, vì CY gây tổn thương nặng nề lách và tuyến ức. Điều này thấy rõ ở trong kết quả giải phẫu bệnh vi thể ở lô mô hình. CY cũng làm tăng rõ rệt nồng độ TNF- α , một cytokin tham gia điều hòa miễn dịch, so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).

Levamisol được sử dụng để điều trị giun sán, ký sinh trùng nhưng có tác dụng kích thích miễn dịch trên thực nghiệm và trên lâm sàng mặc dù cơ chế tác dụng lên miễn dịch chưa được hiểu biết đầy đủ. Có giả thuyết cho rằng levamisol được cho là có tác dụng lên tủy xương tăng cường hoạt hóa các tế bào đuôi gai, tăng đáp ứng miễn dịch của tế bào T và tế bào B [119],[120],[122]. Levamisol được nhiều nhà nghiên cứu sử dụng làm thuốc đối chứng trong các nghiên cứu về tác dụng kích thích miễn dịch [121],[65]. Trong nghiên cứu này, levamisol được sử dụng làm thuốc đối chứng dương đã cho thấy tác dụng phục hồi miễn dịch ở một số chỉ số quan trọng như số lượng bạch cầu, nồng độ IgG, nồng độ IL-2 trong máu.

Như vậy, mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY liều duy nhất 200 mg/kg, đối chứng bằng levamisol là mô hình đáng tin cậy, được sử dụng rộng rãi trên thế giới và tại Việt Nam nhằm đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của các sản phẩm mới.

Trên mô hình này, tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic được đánh giá thông qua các chỉ số miễn dịch chung, miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào.

Ảnh hưởng của Livganic lên chỉ số miễn dịch chung

Nhiều cơ quan và tế bào cơ thể tham gia vào đáp ứng miễn dịch, các tế bào miễn dịch có mặt mọi nơi trong cơ thể nhưng tập trung chủ yếu ở tủy xương, lách, tuyến ức, hạch.

Lách là một tổ chức lympho ngoại vi lớn nhất, nhu mô lách chia làm hai phần tủy đỏ và tủy trắng. Tủy trắng là nơi cấu tạo chủ yếu bởi các mô lympho với nhiều tiểu động mạch xen kẽ, trong đó có các vùng không phụ thuộc tuyến ức chứa tâm điểm mầm của tế bào lympho B, vùng khác được gọi là vùng không phụ thuộc tuyến ức là nơi chứa các tế bào lympho T. Tủy đỏ chiếm phần lớn khối lượng lách và là nơi tiêu hủy hồng cầu, tiểu cầu già, các mảnh tế bào chết. Lách là nơi hình thành các đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên xâm nhập cơ thể theo đường máu. Theo dõi trọng lượng lách cho phép đánh giá được một phần sự tổn thương tế bào, tăng sinh, các thay đổi hoạt động đáp ứng với các kháng nguyên của các tế bào miễn dịch ngoại vi, qua đó đối chiếu với các chỉ tiêu về số lượng tế bào, cấu trúc vi thể và chức năng của các tế bào lympho ở lách, trong đó chủ yếu là lympho B [123],[124].

Tuyến ức là cơ quan lympho trung ương. Tuyến ức đảm nhiệm được chức năng huấn luyện, phân chia, biệt hóa tế bào lympho T để thành tế bào lympho T trưởng thành nhờ các tế bào biểu mô của tuyến sản xuất ra yếu tố hòa tan như thymulin, thymosin α 1, thymosin β 4, thymopoietin [124].

Do tác dụng alkyl hóa nên CY gây ảnh hưởng tới sự phân bào, đặc biệt là các mô có tốc độ phân bào nhanh như mô lympho và tủy xương. Việc đánh giá trọng lượng tương đối của các mô lympho dưới sự hỗ trợ của phân tích giải phẫu bệnh học các mô này có thể phần nào đánh giá được tác dụng phục hồi miễn dịch. Kết quả nghiên cứu cho thấy ở lô mô hình sử dụng CY liều duy nhất, trọng lượng tương đối lách tăng cao, tuy nhiên trên giải phẫu bệnh học cho thấy tình trạng suy giảm số lượng tế bào lympho rõ ràng (Ảnh 3.7, 3.9, 3.11), điều này có thể giải thích do tác dụng ức chế miễn dịch của CY ở ngày thứ 7. Trọng lượng tương đối của tuyến ức giảm rõ rệt (Bảng 3.2), đồng thời trên giải phẫu bệnh có tình trạng suy giảm số lượng tế bào lympho rõ rệt (Ảnh 3.8, 3.10, 3.12) cho thấy tình trạng suy giảm miễn dịch. Levamisol tuy chưa làm thay đổi có ý nghĩa thống kê trọng lượng tương đối của tuyến ức so với lô mô hình tuy nhiên trên hình ảnh giải phẫu bệnh cho thấy sự hồi phục rõ rệt. Livganic không cho thấy tác dụng có ý nghĩa thống kê về trọng lượng tương đối các cơ quan và trên hình ảnh giải phẫu bệnh tuy nhiên như đã đề cập ở trên, các chỉ số này chỉ phần nào phản ánh sự phục hồi miễn dịch [115].

Số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi là một chỉ số quan trọng mang tính định lượng, phản ánh cả hai phương thức đáp ứng miễn dịch tự nhiên và đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Mỗi loại bạch cầu trong máu ngoại vi có một chức năng riêng, lympho bào là những tế bào có vai trò chính trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Dựa vào sự khác nhau trong quá trình biệt hóa về hình thái, chức năng và các dấu ấn trên bề mặt lympho bào mà chia thành các quần thể và dưới quần thể. Hai quần thể chính của lympho bào có vai trò chủ đạo đáp ứng miễn dịch là tế bào lympho T phụ trách miễn dịch tế bào và tế bào lympho B có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch dịch thể [123]. Bạch cầu đa nhân trung tính chiếm một số lượng lớn trong máu ngoại vi và có đời sống ngắn, tăng cao trong mắc các bệnh về nhiễm khuẩn cấp tính. Bạch cầu

mono thuộc hệ bạch cầu đơn nhân, khi trở thành đại thực bào có khả năng thực bào rất mạnh [124].

Như vậy số lượng bạch cầu máu ngoại vi và công thức bạch cầu phản ánh một phần mức độ tổn thương của hệ tạo máu với tác nhân gây tổn thương là CY và khả năng đáp ứng sinh bạch cầu ở tủy xương, đây là chỉ số quan trọng cho phép đánh giá một phần tình trạng đáp ứng miễn dịch của cơ thể.

Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.3 cho thấy số lượng bạch cầu giảm rõ rệt ở lô mô hình được gây suy giảm miễn dịch bằng CY. Thuốc đối chứng levamisol thể hiện rõ tác dụng phục hồi tổn thương trên số lượng bạch cầu gây ra do CY. Livganic cả hai liều chưa thể hiện tác dụng làm tăng số lượng bạch cầu máu ngoại vi so với lô mô hình. Kết quả tương tự cũng quan sát được khi xem xét kết quả về công thức bạch cầu (Bảng 3.4). Điều này cho thấy Livganic chưa biểu hiện tác dụng lên khả năng sinh bạch cầu tại tủy xương, lách và tủy ức. Kết quả này cũng phù hợp với quan sát thấy trên giải phẫu bệnh lách và tủy ức ở các lô được uống Livganic. Tuy nhiên, như đã phân tích ở trên, số lượng tế bào miễn dịch chỉ phản ánh một phần khả năng đáp ứng miễn dịch của cơ thể.

Ảnh hưởng của Livganic lên miễn dịch dịch thể

IgG là kháng thể phổ biến nhất và đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch dịch thể [125]. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.5 cho thấy Livganic cả hai liều đều có tác dụng hạn chế tác dụng gây suy giảm IgG của CY. Tác dụng trên nồng độ IgG của Livganic tăng theo liều, ở liều 1,8 g/kg nồng độ IgG tăng lên tới mức không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học. Kết quả này cho thấy Livganic có tác dụng tăng cường miễn dịch dịch thể. IgG là sản phẩm của miễn dịch dịch thể do tế bào lympho B đảm nhiệm. Như vậy Livganic có khả năng tác dụng lên tế bào lympho B,

mặc dù tổng lượng tế bào lympho trong công thức bạch cầu không có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê giữa lô uống Livganic và lô mô hình.

Ảnh hưởng của Livganic lên miễn dịch tế bào

Phản ứng bì với kháng nguyên OA là phản ứng của hệ miễn dịch do tế bào T đảm nhiệm [125],[123]. Thông qua đánh giá phản ứng của hệ miễn dịch với kháng nguyên OA có thể xác định được tác dụng của thuốc trên miễn dịch tế bào. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.6 cho thấy ở lô mô hình, mặc dù được sử dụng chất gây suy giảm miễn dịch CY nhưng phản ứng bì với kháng nguyên OA không giảm so với lô chứng sinh học. Kết quả này khác với nghiên cứu trước đó của Phạm Thị Vân Anh [65]: Ở lô mô hình, phản ứng bì với kháng nguyên OA suy giảm rõ so với lô mô hình. Điều này có thể phản ánh phản ứng bì với kháng nguyên OA đã được khôi phục trên chuột sau thời gian sử dụng CY. Trong nghiên cứu của này, thời gian giết chuột là 7 ngày sau khi sử dụng CY, trong khi nghiên cứu của Phạm Thị Vân Anh là 6 ngày. Ở lô sử dụng levamisol, phản ứng bì với kháng nguyên OA tương tự như ở lô chứng sinh học. Tuy nhiên, có sự gia tăng kết quả phản ứng bì với kháng nguyên OA ở 2 lô sử dụng Livganic, đặc biệt ở lô 5 uống Livganic 1,8 g/kg phản ứng của hệ miễn dịch với kháng nguyên OA tăng lên rõ rệt, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các lô mô hình, lô chứng sinh học và lô uống levamisol. Điều đó cho thấy Livganic có tác dụng mạnh mẽ trên miễn dịch tế bào.

Các cytokin là protein không phải kháng thể được sản xuất bởi các tế bào miễn dịch có tác dụng điều hòa hoạt động của hệ thống miễn dịch. Interleukin 2 (IL-2) là một cytokin quan trọng được sản xuất bởi tế bào T hoạt hóa, có vai trò trong việc duy trì sự phát triển, biệt hóa và sống sót của các tế bào TCD4⁺ và TCD8⁺ miễn cảm kháng nguyên [125]. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.7 cho thấy Livganic cả hai liều 0,6 và 1,8 g/kg đều có tác dụng làm tăng cao hàm lượng IL-2 so với lô mô hình, điều đó khẳng định thêm tác dụng

kích thích miễn dịch tế bào của Livganic. Ở liều 1,8 g/kg, Livganic có tác dụng mạnh hơn ở liều 0,6 g/kg, nồng độ IL-2 ở lô Livganic 1,8 g/kg không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sinh học.

Yếu tố hoại tử u (Tumor Necrosis Factor alpha – TNF- α) là một cytokin được sản sinh ra bởi các đại thực bào hoạt hóa. TNF – α có vai trò trong điều hòa miễn dịch thông qua phản ứng viêm và gây độc (chết) tế bào [125]. CY được chứng minh là chất gây tăng cao hàm lượng TNF – α do vậy đóng góp thêm vào tình trạng rối loạn miễn dịch [117]. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.8 cho thấy Livganic cả hai liều đều làm giảm nồng độ TNF – α trong máu ngoại vi so với lô mô hình sử dụng CY. Điều này góp phần hạn chế rối loạn miễn dịch gây ra do CY. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đó cho thấy Livganic có tác dụng hạn chế tổn thương tế bào gan khi viêm cấp bởi paracetamol [4].

Như vậy thông qua kết quả từ nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY, có thể sơ bộ thấy Livganic có tác dụng kích thích miễn dịch trên cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào, mặc dù ở một số chỉ số chưa quan sát thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Một trong những nhược điểm của mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY liều duy nhất là có tình trạng phục hồi miễn dịch xảy ra tương đối nhanh theo thời gian, do vậy thời gian sử dụng thuốc nghiên cứu trên chuột ngắn. Điều này có thể dẫn tới chưa đánh giá được đầy đủ tác dụng kích thích miễn dịch của sản phẩm nghiên cứu. Nhằm đánh giá đầy đủ hơn tác dụng kích thích miễn dịch ở điều kiện suy giảm miễn dịch kéo dài hơn và thời gian sử dụng thuốc nghiên cứu dài hơn, mô hình suy giảm miễn dịch kéo dài bằng CY liều nhỏ lặp lại nhiều lần đã được sử dụng.

4.1.1.2. Tác dụng trên mô hình suy giảm miễn dịch kéo dài bằng CY

Mô hình suy giảm miễn dịch kéo dài bằng CY

CY là thuốc thuộc nhóm alkyl hóa gây suy giảm miễn dịch được sử dụng phổ biến trên lâm sàng [116]. CY là hóa chất gây suy giảm cả miễn dịch dịch thể và tế bào, được sử dụng rộng rãi để gây mô hình suy giảm miễn dịch thực nghiệm [115],[117]. Bên cạnh sử dụng CY liều duy nhất để gây suy giảm miễn dịch, nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới dùng liều nhỏ CY tiêm nhiều ngày ở các mức độ liều khác nhau để gây suy giảm miễn dịch dài hạn [126][132]. Tại Việt Nam, theo ghi nhận của chúng tôi, chưa có báo cáo về việc sử dụng CY để gây suy giảm miễn dịch mạn tính. Do trên thế giới nhiều nhà nghiên cứu sử dụng các mức liều CY khác nhau nên chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu dò liều ở các mức liều và thời gian khác nhau. Kết quả nghiên cứu dò liều cho thấy liều 50 mg/kg tiêm màng bụng kéo dài trong 10 ngày là tối ưu trong việc gây suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt trắng chủng *Swiss*. Levamisol đường uống liều 50 mg/kg (ở mô hình suy giảm miễn dịch cấp levamisol được sử dụng liều 100 mg/kg) được sử dụng làm thuốc đối chứng dương đã cho thấy tác dụng phục hồi miễn dịch ở một số chỉ số quan trọng. Đây là lần đầu tiên mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY nhiều liều nhỏ được triển khai tại Bộ môn Dược lý – Đại học Y Hà Nội.

Kết quả nghiên cứu cho thấy CY liều nhỏ 50 mg/kg liên tục trong 10 ngày gây ra suy giảm miễn dịch một cách rõ rệt trong hầu hết các chỉ số được đo lường. Ở lô mô hình, CY làm giảm rõ trọng lượng tương đối của lách ($p < 0,01$) và tủy ức ($p < 0,001$), hình ảnh giải phẫu bệnh học cho thấy kết quả tương đồng: Lách teo nặng tủy trắng, tủy ức teo nhỏ, chuyển dạng tế bào lympho. Tổn thương hệ thống miễn dịch về mặt giải phẫu gây ra do CY liều nhỏ liên tục rõ rệt hơn so với mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY liều duy nhất. Điều này dẫn tới các kết quả khác ở ngoại vi như số lượng bạch

cầu chung, số lượng bạch cầu trung tính, số lượng bạch cầu lympho, số lượng lympho T CD4+, lympho T CD8+ suy giảm có ý nghĩa thống kê ở lô mô hình so với lô chứng sinh học. Chức năng bài tiết kháng thể IgG của miễn dịch dịch thể và chức năng phản ứng bì với kháng nguyên OA cũng suy giảm có ý nghĩa thống kê ở lô mô hình so với lô chứng sinh học. Như vậy có thể thấy đây là mô hình suy giảm miễn dịch một cách toàn diện ở tất cả các chỉ số đánh giá.

Trên mô hình suy giảm miễn dịch này, thuốc đối chứng dương levamisol ở liều 50 mg/kg đã thể hiện tác dụng ở một số chỉ số như nồng độ IgG, IFN – α tuy nhiên ở những chỉ số khác không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Điều này có thể do liều lượng levamisol được sử dụng trong nghiên cứu này tương đối thấp (ở nghiên cứu suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY liều duy nhất, liều levamisol là 100 mg/kg), hơn nữa sự suy giảm miễn dịch xảy ra nặng nề ở hầu hết các chỉ số, do vậy khó quan sát rõ ràng tác dụng kích thích miễn dịch của thuốc.

Kết quả về mô hình suy giảm miễn dịch kéo dài bằng CY 50 mg/kg liên tục trong 10 ngày cũng tương tự kết quả quan sát được của một số nghiên cứu trên thế giới. Liu và cộng sự (2019) sử dụng CY 80 mg/kg trên chuột nhắt Balb/c liên tục trong 5 ngày cũng gây suy giảm rõ rệt các chỉ số như trọng lượng lách và tuyến ức tương đối, số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi, số lượng lympho bào trong công thức bạch cầu, giảm số lượng bạch cầu lympho T CD4+ và tổn thương rõ trên giải phẫu bệnh [133].

Ảnh hưởng của Livganic lên chỉ số miễn dịch chung

Do tác dụng alkyl hóa nên CY gây ảnh hưởng tới sự phân bào, đặc biệt là các mô có tốc độ phân bào nhanh như mô lympho và tủy xương. Việc đánh giá trọng lượng tương đối của các mô lympho dưới sự hỗ trợ của phân tích giải phẫu bệnh học các mô này có thể phần nào đánh giá được tác dụng phục

hồi miễn dịch. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.10 và 3.11 cho thấy ở lô mô hình sử dụng CY, trọng lượng tương đối của lách và trọng lượng tương đối của tuyến ức giảm rõ rệt, đồng thời trên giải phẫu bệnh có tình trạng suy giảm số lượng tế bào rõ rệt cho thấy tình trạng suy giảm miễn dịch. Levamisol mặc dù có làm cải thiện chỉ số trọng lượng lách tương đối, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Bên cạnh đó, Livganic cả hai liều đều cho thấy sự cải thiện về trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức, trong đó liều thấp 0,6 g/kg có hiệu quả cao hơn, mặc dù đều chưa có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Như đã đề cập ở trên, các chỉ số này chỉ phần nào phản ánh sự phục hồi miễn dịch [115].

Số lượng bạch cầu máu ngoại vi là chỉ số quan trọng trong việc đánh giá hệ thống miễn dịch. Levamisol không thể hiện rõ tác dụng phục hồi số lượng bạch cầu bị giảm do CY, trong khi đó Livganic cả hai liều đều làm tăng số lượng bạch cầu so với lô mô hình, mặc dù sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Khi sử dụng CY nhiều liều nhỏ trong nhiều ngày liên tiếp, số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi suy giảm rất nặng, vì vậy việc phát hiện tác dụng của thuốc trên chỉ số bạch cầu máu ngoại vi là không dễ dàng.

Đối với công thức bạch cầu, CY được biết đến là chất gây suy giảm hầu hết các dòng bạch cầu trong máu ngoại vi [65]. Kết quả nghiên cứu cho thấy mặc dù Livganic có làm cải thiện chỉ số bạch cầu lympho và bạch cầu trung tính tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Kết quả này cũng phù hợp với quan sát trước đó về tổng số bạch cầu trong máu ngoại vi.

Ảnh hưởng của Livganic lên miễn dịch dịch thể

IgG là kháng thể phổ biến nhất và đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch dịch thể [125]. Levamisol, một chất kích thích miễn dịch, có tác dụng rất rõ rệt trên chỉ số IgG so với lô mô hình. Livganic cả hai liều đều làm tăng cao chỉ số IgG so với lô mô hình nhưng sự khác biệt có ý nghĩa

thống kê chi quan sát được ở liều 0,6 g/kg và giá trị IgG ở lô Livganic 0,6 g/kg trở về tương tự như nhóm chứng sinh học (Bảng 3.14). Kết quả này phù hợp với kết quả trước đó về hiệu quả của Livganic trên trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức như đã bàn luận ở phần trên. Kết quả này tương tự với nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY đã thực hiện trước đó. Như vậy, có thể nhận thấy Livganic có tác dụng tăng cường miễn dịch dịch thể.

Ảnh hưởng của Livganic lên miễn dịch tế bào

Phản ứng bì với kháng nguyên OA là phản ứng của hệ miễn dịch do tế bào lympho T đảm nhiệm [125]. Thông qua đánh giá phản ứng của hệ miễn dịch với kháng nguyên OA có thể xác định được tác dụng của thuốc trên miễn dịch tế bào, thuốc có tác dụng kích thích miễn dịch tế bào sẽ làm phản ứng với kháng nguyên OA mạnh hơn. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.15 cho thấy trong các lô uống levamisol, Livganic liều 0,6 g/kg và Livganic liều 1,8 g/kg, mặc dù chỉ số phản ứng bì đều tăng ở cả 3 lô này nhưng chỉ có ở lô 0,6 g/kg sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này phù hợp với các quan sát đã được bàn luận trước đó, tức là Livganic liều thấp 0,6 g/kg có hiệu quả rõ rệt hơn liều cao 1,8 g/kg.

Các cytokin là protein không phải kháng thể được sản xuất bởi các tế bào miễn dịch có tác dụng điều hòa hoạt động của hệ thống miễn dịch. Interleukin 2 (IL-2) là một cytokin quan trọng được sản xuất bởi tế bào lympho T hoạt hóa, có vai trò trong việc duy trì sự phát triển, biệt hóa và sống sót của các tế bào lympho T CD4+ và T CD8+ miễn cảm kháng nguyên [125]. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.16 cho thấy Livganic cả hai liều 0,6 và 1,8 g/kg đều có tác dụng làm tăng cao hàm lượng IL-2 so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt đều không có ý nghĩa thống kê. Có thể dễ dàng nhận thấy rằng độ

lệch của trung bình chỉ số IL-2 là khá lớn (lên tới 30% so với trung bình), do vậy việc phát hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở chỉ số này sẽ trở nên khó khăn hơn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đó trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY liều duy nhất 200 mg/kg.

Interferon alpha (IFN - α) là một cytokin có bản chất là glycoprotein có vai trò trong ức chế nhân lên của virus, kháng ung thư, tham gia một số đáp ứng miễn dịch trong bệnh tự miễn. CY đã được biết đến làm gia tăng nồng độ IFN nhóm I (bao gồm IFN - α) và có thể tham gia vào việc gây gia tăng rối loạn miễn dịch [134]. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.17 cho thấy levamisol làm giảm rất rõ chỉ số IFN - α . Livganic cả hai liều đều có xu hướng làm giảm nồng độ IFN - α trong máu ngoại vi so với lô mô hình sử dụng CY tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng máy đếm dòng chảy tế bào (cyto flowmetry) để làm rõ hơn tác dụng của Livganic ở các dòng tế bào mang dấu ấn miễn dịch khác nhau. Dấu ấn miễn dịch CD4+ đại diện cho dòng tế bào lympho T trợ giúp (T_h), CD8a+ đại diện cho dòng tế bào lympho T gây độc (T_c) và CD19+ nhằm đánh giá tế bào lympho B. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.19 cho thấy CY gây suy giảm nặng số lượng lympho B, T_h và T_c ở các lô levamisol, Livganic liều 0,6 g/kg và liều 1,8 g/kg, trong đó T_c bị suy giảm nặng nề nhất. Livganic cả hai liều đều có xu hướng làm gia tăng cả 3 chỉ số lym B, T_h và T_c , tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Trong đó, ở lô Livganic liều 0,6 g/kg làm gia tăng số lượng T_h nhiều hơn thể hiện qua tỷ lệ CD4+/CD8+ tăng cao có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình.

Như vậy, thông qua toàn bộ kết quả nghiên cứu có thể dễ dàng nhận thấy Livganic liều 0,6 g/kg có tác dụng kích thích miễn dịch ở cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào, tác dụng kích thích miễn dịch này không quan

sát được đầy đủ ở nhóm sử dụng Livganic liều 1,8 g/kg. Nói cách khác, Livganic dùng ở liều thấp có tác dụng rõ rệt hơn khi dùng ở liều cao hơn gấp 3 lần. Ở nghiên cứu trên mô hình gây suy giảm miễn dịch cấp bằng CY trước đó, Livganic liều 0,6 g/kg không có tác dụng kích thích miễn dịch tốt hơn liều 1,8 g/kg. Ngoài ra, Viên nén Livganic đã được đánh giá ở các nghiên cứu khác trước đó, theo đó Livganic liều 0,6 g/kg không có tác dụng tốt hơn trong nghiên cứu bảo vệ gan trên mô hình viêm gan cấp bằng paracetamol [4], nhưng lại có tác dụng chống viêm mạn tính tốt hơn hẳn so với Livganic liều 1,8 g/kg. Tác dụng chống viêm mạn tính có thể liên quan mật thiết tới khả năng điều biến miễn dịch của Livganic, do đó có thể thấy rằng kết quả của nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính có sự phù hợp với nghiên cứu chống viêm mạn tính. Chưa có nghiên cứu nào đánh giá cơ chế kích thích miễn dịch của Livganic, do vậy để tìm hiểu tại sao Livganic liều thấp lại có tác dụng tốt hơn, cần thực hiện thêm các nghiên cứu chuyên sâu khác.

4.1.2. Tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ

Mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ:

Có nhiều phương pháp để gây suy giảm miễn dịch như sử dụng hóa chất, vi sinh vật hoặc tia xạ. Bên cạnh mô hình suy giảm miễn dịch phổ biến nhất là sử dụng hóa chất, mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ được sử dụng trong nghiên cứu này nhằm đánh giá đầy đủ hơn tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ đã được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng [80],[135] và đã triển khai thành công tại Việt Nam [65].

Tia γ (gamma) là tia bức xạ có mức đâm xuyên lớn nhất, do vậy được sử dụng phổ biến để gây suy giảm miễn dịch. Tia γ có thể sử dụng một cách chọn lọc như ở tổ chức lympho hoặc chiếu xạ toàn thân để gây suy giảm miễn

dịch. Trong nghiên cứu này, chiếu xạ toàn thân bằng tia γ liều nhỏ được sử dụng để đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic. Sử dụng tia γ liều nhỏ nhằm mục đích tạo ra suy giảm miễn dịch một cách từ từ và đảm bảo chuột không chết trong quá trình chiếu xạ [65].

Kết quả nghiên cứu cho thấy tia γ liều 1 Gy trong 6 ngày gây suy giảm miễn dịch thể hiện qua các chỉ số như: Giảm trọng lượng tương đối của lách ($p < 0,001$), giảm trọng lượng tương đối của tuyến ức ($p < 0,05$), giảm số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi ($p < 0,001$), giảm phản ứng bì với kháng nguyên OA ($p < 0,01$), làm tăng IFN- α ($p < 0,001$), làm giảm số lượng dấu ấn miễn dịch CD19+, CD4+, CD8a+ ($p < 0,001$) và tỷ lệ CD4+/CD8a+ ($p < 0,01$), hình ảnh giải phẫu bệnh có giảm số lượng lympho bào ở tủy trắng của lách, giảm số lượng tế bào tuyến ức. Như vậy, đa số các chỉ số đánh giá đều thể hiện tác dụng ức chế miễn dịch của tia γ trên chuột nhắt trắng. Kết quả này cũng tương tự như báo cáo của Phạm Thị Vân Anh [65]. Tuy nhiên, trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng liều nhỏ tia γ , chỉ số nồng độ IgG trong máu và IL-2 không có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ở lô mô hình so với lô chứng sinh học.

Levamisol 50 mg/kg được sử dụng làm thuốc đối chứng trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia γ . Kết quả nghiên cứu cho thấy levamisol biểu hiện tác dụng kích thích miễn dịch thông qua làm tăng có ý nghĩa thống kê số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi và làm tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA.

Như vậy, đây là mô hình tương đối đáng tin cậy nhằm đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic.

Tác dụng của Livganic lên chỉ số miễn dịch chung:

Tia xạ, đặc biệt là tia γ có khả năng đâm xuyên mạnh mẽ gây tổn thương rộng cho nhiều cơ quan, trong đó có các cơ quan miễn dịch quan trọng như lách và tuyến ức. Khả năng ion hóa của tia γ là nguyên nhân gây ra một

lượng lớn các gốc tự do oxy hóa và các gốc tự do khác, dẫn tới các tổn thương không hồi phục của các cơ quan miễn dịch, điều này có thể gây ra hoạt hóa hoặc gây suy giảm miễn dịch [136]. Lách và tuyến ức là các cơ quan có mức độ nhạy cảm cao đối với tia xạ. Do vậy, trọng lượng lách và tuyến ức là chỉ số quan trọng nhằm đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic.

Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.20 và 3.21 cho thấy ở lô mô hình, trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức giảm rõ rệt so với lô chứng sinh học. Tuy nhiên, cả 3 lô sử dụng levamisol, Livganic 0,6 g/kg và Livganic 1,8 g/kg đều không thể hiện được tác dụng cải thiện trọng lượng tương đối của 2 cơ quan này. Đặc điểm tác dụng của tia γ dẫn tới hiện tượng chết theo chương trình (apoptosis) của các mô như lách và tuyến ức, sự tác động này là không phục hồi [136][137]. Mặc dù levamisol và Livganic đều không thể hiện tác dụng cải thiện khối lượng tương đối của lách và tuyến ức so với lô mô hình, hình ảnh giải phẫu bệnh học lại cho thấy có sự cải thiện tương đối rõ rệt tác dụng của levamisol và Livganic, trong đó 2/3 mẫu giải phẫu bệnh học ở lô sử dụng Livganic liều 0,6 g/kg có hình ảnh vi thể lách và tuyến ức không có thay đổi rõ rệt hoặc gần như bình thường. Điều này có thể giải thích do tác dụng chống oxy hóa [58],[98],[109] và tác dụng chống lại chết theo chương trình [97],[108] của các thành phần trong viên nén Livganic, làm hạn chế tác dụng của tia xạ.

Livganic cả 2 liều có tác dụng làm tăng số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi, trong đó Livganic liều 1,8 g/kg làm tăng có ý nghĩa thống kê số lượng bạch cầu so với lô mô hình (Bảng 3.22). Bên cạnh đó, Livganic liều 1,8 g/kg làm tăng ý nghĩa thống kê số lượng bạch cầu lympho và bạch cầu trung tính so với lô mô hình (Bảng 3.23). Kết quả này phù hợp với kết quả về cải thiện hình ảnh vi thể của Livganic.

Tác dụng của Livganic lên miễn dịch dịch thể:

Miễn dịch dịch thể duy trì sự ổn định và cân bằng của hệ thống miễn dịch, trong đó kháng thể được tạo ra từ tế bào lympho B là yếu tố vô cùng quan trọng của miễn dịch dịch thể để chống lại các yếu tố gây bệnh [125]. Tia γ khi sử dụng chiếu toàn thân có thể làm suy giảm đáp ứng miễn dịch của tế bào B do khả năng gây độc tế bào B [138]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cho thấy ở lô mô hình, không quan sát thấy sự suy giảm có ý nghĩa thống kê của nồng độ IgG trong máu. Livganic cả hai liều không làm tăng nồng độ IgG trong máu so với lô mô hình.

Tác dụng của Livganic lên miễn dịch tế bào:

Tia γ tác động lên hầu hết các thành phần của miễn dịch tế bào bao gồm tế bào lympho, đại thực bào và những tế bào miễn dịch khác. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.25 cho thấy đáp ứng miễn dịch tế bào với kháng nguyên OA suy giảm có ý nghĩa thống kê ở lô mô hình so với với lô chứng sinh học. Livganic cả hai liều đều có tác dụng làm tăng đáp ứng miễn dịch tế bào thông qua chỉ số phản ứng bì với kháng nguyên OA, trong đó liều 0,6 g/kg biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Kết quả này tương đồng với kết quả quan sát được ở nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch kéo dài bằng CY nhiều liều nhỏ. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.26 cho thấy Livganic không có tác dụng làm tăng IL – 2 so với lô mô hình.

Tương tự như kết quả trong nghiên cứu trước đó ở mô hình suy giảm miễn dịch kéo dài bằng CY nhiều liều nhỏ, Livganic cả hai liều không có tác dụng làm giảm IFN – α .

Tia γ đã được báo cáo là gây suy giảm dấu ấn miễn dịch CD4+, CD8+ nhưng làm tăng tỷ lệ CD4+/CD8+ do tế bào CD8+ nhạy cảm hơn với tia xạ [139]. Thời gian phục hồi của tỷ lệ CD4+/CD8+ có thể kéo dài tới 7 ngày nếu sử dụng liều nhỏ tia γ [139]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 7 ngày sau khi

chiếu xạ liều cuối cùng, vẫn chưa quan sát thấy sự phục hồi đáng kể tỷ lệ CD4+/CD8+. Livganic liều 1,8 g/kg thể hiện rõ tác dụng phụ hồi tỷ lệ CD4+/CD8+ so với lô mô hình. Tuy nhiên, Livganic cả hai liều đều không làm tăng có ý nghĩa thống kê số lượng CD4+ và CD8+ (Bảng 3.28).

4.1.3. Bàn luận chung về tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic

Để đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic, 3 nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch với các tác nhân khác nhau (hóa chất, tia xạ) đã được thực hiện. Mô hình suy giảm miễn dịch bằng vi sinh vật (như virus) không được sử dụng do sự không phổ biến của mô hình này trên thế giới, hơn nữa mô hình này chưa từng được triển khai tại Việt Nam.

Từ kết quả của 3 nghiên cứu sử dụng các mô hình khác nhau, có thể thấy Livganic có tác dụng kích thích cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào, tuy nhiên mức độ tác dụng khác nhau ở từng nghiên cứu.

Trên thế giới chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch của phối hợp cao Mật nhân và cao Cà gai leo trên mô hình suy giảm miễn dịch thực nghiệm. Tuy nhiên, một số nghiên cứu về tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, tác dụng chống ung thư, nghiên cứu *in vitro* gợi mở một số mối liên quan tới tác dụng kích thích miễn dịch của Livganic.

Nguyễn Thị Bích Thu đã tiến hành đánh giá tác dụng lên khả năng tăng sinh tế bào lympho T của cao Cà gai leo toàn phần và các mẫu M2, M3, M4, M5 cho thấy cao Cà gai leo và các mẫu chiết đều có tác dụng làm tăng sinh tế bào T [58]. Thành phần hóa học của cao cà gai leo do tác giả công bố gồm alcaloid, glycoalcaloid, saponin, flavonoid, phytosterol, coumarin. Như vậy, tác dụng kích thích miễn dịch của cao Cà gai leo có thể là tác dụng cộng hợp do nhiều chất có trong thành phần. Trong nghiên cứu của chúng tôi, Livganic cũng thể hiện rõ tác dụng kích thích miễn dịch thông qua lympho T, tức là kích thích miễn dịch tế bào.

Nghiên cứu của Dao Thi Thanh Hien và cộng sự (2019) tiến hành đánh giá tác dụng chống viêm của dịch chiết giàu alcaloid từ rễ cây *Eurycoma longifolia* Jack. Kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết giàu alcaloid, đặc biệt là thành phần 9,10-dimethoxycanthin-6-one có tác dụng ức chế con đường tín hiệu thông qua NO (nitric oxid), điều này dẫn tới giảm đáp ứng quá mức của các tế bào miễn dịch, bao gồm đại thực bào và có thể làm giảm một số cytokin như TNF- α [140]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy Livganic có tác dụng rõ rệt làm giảm TNF- α , tác dụng này có thể làm hạn chế gây ra các rối loạn miễn dịch liên quan tới cytokin này.

Thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng trên 84 bệnh nhân tuổi trung niên có tình trạng suy giảm miễn dịch cho thấy sử dụng dịch chiết nước từ rễ cây Mật nhân có tác dụng làm tăng cường đáp ứng miễn dịch, đặc biệt là làm tăng số lượng tế bào TCD4+, cơ chế có thể thông qua hoạt tính chống oxy hóa của rễ cây Mật nhân [109].

Nhiều nghiên cứu cho thấy tác dụng chống oxy hóa của các thành phần trong viên nén Livganic [58],[98],[109]. Tác dụng chống oxy hóa có thể góp phần hạn chế ảnh hưởng của các tác nhân gây suy giảm miễn dịch có đặc tính gây stress oxy hóa, ngay cả đối với trường hợp suy giảm đáp ứng miễn dịch do stress oxy hóa trong viêm gan do virus dẫn tới xơ gan [141].

4.2. Tác dụng ức chế viêm gan mạn của Livganic

Mô hình gây viêm gan mạn bằng CCl₄ trên chuột nhắt trắng:

Mô hình viêm gan mạn và xơ gan thực nghiệm được tiến hành trên nhiều loại động vật khác nhau (chuột nhắt, chuột cống, ...), với nhiều phương pháp khác nhau: sử dụng hóa chất như carbon tetrac-hlorid, thioacetamid, dimethylnitrosamin, d-galactosamin, rượu, hoặc sử dụng các biện pháp như thắt đường mật, sử dụng chuột đột biến gen. Trong các phương pháp này, CCl₄ là hóa chất được sử dụng rộng rãi trên thế giới để gây mô hình xơ gan

thực nghiệm. Tuy nhiên, các y văn trên thế giới có nhiều bất đồng về liều dùng, thời gian sử dụng, tỷ lệ động vật chết được báo cáo khi sử dụng CCl_4 để gây mô hình xơ gan. Vì vậy, sau khi tham khảo tham khảo số liệu của Nhung Hai Truong và cộng sự [144] trên chuột nhắt trắng chủng *Swiss* tại Việt Nam, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu thử và quyết định sử dụng CCl_4 liều 1 mL/kg (hai lần mỗi tuần, cách nhau 3 ngày), trong 18 tuần để gây viêm gan mạn, xơ hóa gan. Silymarin là thuốc được sử dụng để làm đối chứng, đây là một trong số ít các thuốc được cấp phép hiện nay trong điều trị các bệnh lý tổn thương gan.

Viêm gan mạn và xơ hóa gan là tình trạng bệnh lý bệnh lý phức tạp không chỉ tại gan mà còn ảnh hưởng tới các cơ quan, bộ phận khác trong cơ thể. Để đánh giá tác dụng của viên nén Livganic, các chỉ số đã được sử dụng nhằm biểu thị những hội chứng, triệu chứng thường gặp trong bệnh lý viêm gan xơ gan như: Hội chứng suy gan (giảm albumin máu, giảm cholesterol máu), hội chứng hủy hoại tế bào gan (tăng ALT, AST), hội chứng thiếu máu. Ngoài ra để khẳng định rõ tình trạng xơ gan, chỉ số về hình ảnh đại thể, giải phẫu bệnh vi thể và các chỉ số liên quan tới hình thành xơ gan (collagen, hydroxy prolin) được sử dụng trong nghiên cứu này.

Kết quả nghiên cứu cho thấy CCl_4 gây chết khoảng 37,5% ở lô mô hình và gây ra tình trạng viêm gan mạn và xơ hóa gan rõ rệt ở chuột trong lô này. Chuột chết chủ yếu được quan sát ở giai đoạn cuối của nghiên cứu, điều này dẫn tới có thể giả định rằng nhiều khả năng chuột chết có liên quan tới tình trạng bệnh lý nặng nề tại gan. Tình trạng viêm gan mạn, xơ gan được thể hiện qua hầu hết các chỉ số nghiên cứu. Thuốc đối chứng silymarin cũng một phần thể hiện được tác dụng làm hạn chế viêm gan mạn, xơ hóa gan trên mô hình này. Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy đây là một mô hình đáng tin cậy

để đánh giá tác dụng của các sản phẩm dự kiến có tác dụng chống viêm gan mạn và xơ hóa gan.

Ảnh hưởng của Livganic lên sự hủy hoại tế bào gan: Bất cứ tổn thương nào trên gan dù diễn biến cấp tính hay mạn tính đều có thể gây ra tình trạng hủy hoại tế bào gan. Tình trạng hủy hoại tế bào gan dẫn tới hàng loạt các hệ quả tiếp theo như suy tế bào gan, xơ hóa gan. Tăng cao hai enzym ALT và AST trong máu biểu thị cho tình trạng tổn thương màng tế bào gan. Khi sử dụng CCl_4 , gốc tự do $\text{CCl}_3\bullet$, sản phẩm chuyển hóa của CCl_4 thông qua cytochrome oxidase, là nguyên nhân gây ra tình trạng tổn thương tế bào gan và làm tăng hoạt tính ALT, AST [146]. Kết quả nghiên cứu chỉ ra silymarin và Livganic cả hai liều đều có xu hướng làm giảm nồng độ ALT, AST nhưng không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với lô mô hình. Hơn nữa, sự gia tăng ALT, AST ở lô mô hình tương ứng là 1,77 lần và 2,06 lần so với ở lô chứng sinh học, giá trị này là không quá cao, gợi ý rằng đây có thể là giai đoạn cuối của xơ gan trên chuột. Đây cũng là lý do có thể dẫn tới không quan sát được tác dụng rõ rệt của thuốc trên nồng độ ALT, AST trên bệnh lý gan mạn tính. Như vậy, có sự phù hợp nhất định giữa kết quả nghiên cứu này so với kết quả nghiên cứu trước đó đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan của sản phẩm Livganic trên mô hình tổn thương gan cấp tính bằng paracetamol [4].

Gupta và cộng sự (2011) thực hiện nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của cao Cà gai leo trên mô hình viêm gan bằng CCl_4 cho thấy: Cao Cà gai leo làm giảm rõ rệt hoạt độ ALT, AST ở tất cả các liều 100, 200 và 400 mg/kg so với lô mô hình. Tuy nhiên, mô hình viêm gan được sử dụng là mô hình viêm gan cấp tính được thực hiện bằng sử dụng CCl_4 tiêm màng bụng một lần duy nhất. Trong mô hình này, hoạt độ ALT, AST ở lô mô hình tăng cao hơn nhiều lần so với lô chứng sinh học [147].

Ảnh hưởng của Livganic lên chức năng gan: Hủy hoại tế bào xảy ra trong thời gian dài dẫn tới tình trạng xơ hóa gan và làm suy giảm chức năng của tế bào gan. Suy giảm chức năng tế bào gan xảy ra từ từ và biểu hiện muộn trong bệnh lý xơ gan, do vậy trong nghiên cứu này, Livganic và thuốc đối chứng được sử dụng ngay từ đầu và kéo dài 18 tuần nhằm chứng minh rõ rệt hơn tác dụng lên cải thiện các chỉ số đánh giá suy tế bào gan. Gan là cơ quan tổng hợp albumin, tổng hợp cholesterol, tạo máu, đào thải bilirubin, những chỉ số này thường được sử dụng để đánh giá chức năng gan trong các nghiên cứu sử dụng CCl₄ để gây viêm gan mạn, xơ gan [148]. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ albumin, cholesterol, số lượng hồng cầu, số lượng huyết sắc tố, nồng độ bilirubin đều được cải thiện có ý nghĩa thống kê ở lô uống Livganic so với lô mô hình. Một số chỉ số như nồng độ albumin, số lượng huyết sắc tố được phục hồi tương tự như nhóm chứng sinh học. Livganic liều cao có xu hướng có tác dụng tốt hơn liều thấp và tốt hơn so với silymarin 200 mg/ngày.

Ảnh hưởng của Livganic lên tỷ lệ chuột chết, hình thái đại thể và vi thể của gan: CCl₄ là hóa chất có độc tính cao khi sử dụng trên chuột nhắt trắng, phần lớn liên quan tới tổn thương gan của hóa chất này [146]. Các nhà nghiên cứu trên thế giới công bố số liệu tương đối khác biệt về tỷ lệ chết của chuột, tùy thuộc vào đường dùng, liều lượng và thời gian sử dụng CCl₄ trong các nghiên cứu xơ gan [144],[145]. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ chuột sống sót ở lô mô hình tương đối thấp (62,5%) so với nghiên cứu trước đó được thực hiện tại Việt Nam (85,71%) [144]. Lý do có thể được giải thích thông qua thời gian nghiên cứu 18 tuần so với 11 tuần của nghiên cứu trước đây. Kết quả nghiên cứu cho thấy Livganic cả hai liều đều cải thiện rõ rệt tỷ lệ sống sót sau 18 tuần, kết quả này phù hợp với những tác dụng hạn chế tổn thương gan và phục hồi chức năng của tế bào gan của sản phẩm. Khi quan sát trên đại thể, hầu hết các mẫu gan ở lô mô hình thể hiện các tổn thương có thể quan sát

bằng mắt thường như gan bạc màu, mất độ bóng và xuất hiện các khối xơ trên bề mặt. Trong khi đó, hình ảnh gan được cải thiện rõ rệt trong các lô sử dụng Livganic. Hình ảnh mô bệnh học thông qua nhuộm HE được thực hiện nhằm đánh giá rõ ràng hơn tổn thương gan ở chuột. Kết quả cho thấy trên toàn bộ các mẫu hình ảnh mô bệnh học ở 2 lô uống Livganic, không quan sát rõ hình ảnh xơ gan. Kết quả này cũng phù hợp với những bàn luận trước đó về tác dụng rõ rệt của Livganic lên chức năng gan.

Ảnh hưởng của Livganic lên mức độ xơ hóa gan: Để khẳng định tình trạng xơ gan xảy ra, bên cạnh đánh giá về mô bệnh học, một trong những phương pháp quan trọng là xác định sự có mặt của collagen và hàm lượng hydroxyprolin trong gan [144],[149]. Collagen được hình thành song song với quá trình hủy hoại tế bào gan, là hậu quả của quá trình tập hợp các tế bào viêm, tiêu cầu, tế bào Kupffer giải phóng các cytokin và yếu tố gây kích hoạt sự hình thành các tế bào sợi, tăng sinh mô liên kết. Hydroxyprolin là một chỉ số gián tiếp đánh giá sự hình thành và có mặt của collagen trong gan. Kết quả nghiên cứu cho thấy CCl_4 làm gia tăng rõ rệt hàm lượng collagen và hydroxyprolin trong gan, phản ánh sự hiện hữu của tình trạng xơ gan. Livganic 2 liều đều có xu hướng làm giảm collagen và CCl_4 nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Như vậy có thể thấy rằng tình trạng xơ hóa vẫn xảy ra ở tất cả các lô chuột được tiêm CCl_4 sau 18 tuần, mặc dù mức độ tổn thương và suy giảm chức năng tế bào có được cải thiện bởi việc dùng thuốc nghiên cứu.

Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào đánh giá tác dụng của phối hợp cao Cà gai leo và cao Mật nhân trên mô hình viêm gan mạn tính thực nghiệm, tuy nhiên đã có những nghiên cứu trên từng loại dược liệu tách rời. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Thu cho thấy cao Cà gai leo toàn phần làm giảm hàm lượng collagen gan trên mô hình xơ gan là 27% còn thành phần có hoạt

tính chính của cao Cà gai leo là glycoalcaloid làm giảm hàm lượng collagen 27,6%. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng collagen chỉ giảm khoảng 15,8% ở lô uống Livganic liều cao 1,8 g/kg so với ở lô mô hình. Điều này có thể được giải thích do trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Thu, liều lượng cao Cà gai leo được dùng là 6,0 g/kg thể trọng chuột, cao hơn gấp 3 lần liều dùng trong nghiên cứu của chúng tôi.

Nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới đã tập trung tìm hiểu và đánh giá cơ chế bảo vệ gan của Cà gai leo trên thực nghiệm. Một trong những cơ chế được nghiên cứu là tác dụng chống oxy hóa của các hợp chất có trong cây Cà gai leo. Nghiên cứu của Nguyen Phuc Thai sử dụng trinitrotuluen để gây tổn thương gan, chất này chuyển hóa ở tế bào gan và kích hoạt phản ứng tạo nên các gốc tự do superoxid-e và hydrogen peroxid-e, những chất này tấn công cấu trúc lipoprotein của màng tế bào gan dẫn tới hoại tử tế bào gan, cây Cà gai leo chứa bio-flavonid là những chất đã được biết đến có khả năng chống oxy hóa, do vậy có tác dụng bảo vệ gan [99]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hóa chất được sử dụng để gây viêm gan mạn là CCl_4 , một hợp chất được biết là có tính oxy hóa mạnh, do vậy hoạt tính chống oxy hóa trong viên nén Livganic có thể là một cơ chế ức chế tổn thương của CCl_4 trên mô hình thực nghiệm này.

Nghiên cứu của Ali (2018) cho thấy các hợp chất có trong cây *Solanum nigrum* L. có thể có cơ chế chống xơ gan thông qua ức chế hình thành collagen và ức chế yếu tố phát triển chuyển dạng $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$) [150].

Hoạt hóa tế bào hình sao đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành và phát triển xơ gan. Yếu tố phát triển chuyển dạng $\beta 1$ được coi là yếu tố chính hoạt hóa tế bào hình sao [18],[19]. Diosgenin, một trong những thành phần quan trọng có trong Cà gai leo, có bản chất là saponin cấu trúc steroid,

đã được chứng minh có tác dụng chống xơ hóa gan thực nghiệm trong nghiên cứu của Xie và cộng sự (2015) [151]. Cơ chế tác dụng của diosgenin trong nghiên cứu này là ức chế sự biểu hiện của yếu tố chuyển dạng $\beta 1$ trong tế bào hình sao dẫn tới giảm hình thành collagen.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, lượng collagen và hydroxyprolin trong gan có xu hướng giảm ở nhóm sử dụng Livganic cho thấy khả năng hạn chế hình thành và phát triển xơ hóa gan. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi chưa đánh giá sâu về quá trình hình thành collagen trong gan ở chuột xảy ra như thế nào, ví dụ như thông qua đánh giá các yếu tố chuyển dạng hoặc sự biểu hiện của các phân tử mRNA đóng vai trò phiên mã tổng hợp collagen. Tuy nhiên, do Livganic chứa các hoạt chất được bàn luận như ở trên, có thể thấy cơ chế chủ yếu của Livganic trong tác dụng bảo vệ gan là thông qua hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính chống chuyển dạng tế bào hình sao.

4.3. Mối liên quan giữa tác dụng tăng cường miễn dịch và chống viêm gan mạn của viên nén Livganic

Mục tiêu của viên nén Livganic trên lâm sàng là hỗ trợ điều trị tình trạng viêm gan mạn tính, đặc biệt là viêm gan mạn tính gây ra do virus. Một trong những cơ chế bệnh sinh quan trọng của quá trình hình thành xơ gan trong bệnh lý viêm gan mạn tính là tình trạng rối loạn và suy giảm đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với tác nhân gây bệnh [2],[46]. Do đó, nghiên cứu tiền lâm sàng của viên nén Livganic tập trung hướng tới đánh giá các tác dụng tăng cường miễn dịch và tác dụng ức chế quá trình tổn thương gan, nhất là quá trình tổn thương gan diễn biến từ từ, mạn tính.

Viêm gan mạn tính thường dẫn tới xơ gan, xơ gan sẽ dẫn tới suy giảm đáp ứng miễn dịch tại gan và quan trọng hơn là cả suy giảm hệ thống miễn dịch, bao gồm miễn dịch miễn dịch không đặc hiệu và miễn dịch đặc hiệu. Trong nghiên cứu này, các chỉ số quan trọng về miễn dịch chung và miễn dịch

đặc hiệu đã được đánh giá nhằm tìm hiểu tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic. Bên cạnh đó, các thay đổi tại gan cũng được đánh giá trong mô hình viêm gan mạn tính bằng CCl_4 . Những thay đổi về đáp ứng miễn dịch của hệ thống miễn dịch và thay đổi tình trạng tổn thương tại gan có mối qua lại mật thiết với nhau, ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình phát triển của xơ gan trong bệnh lý viêm gan mạn tính.

Tổn thương tế bào gan làm suy giảm chức năng gan là một trong những nguyên nhân gây suy giảm đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Xơ gan làm suy giảm tổng hợp và chức năng của các PRR và nhiều loại protein được sản xuất tại gan, điều này dẫn tới suy giảm khả năng chống lại bệnh tật của cơ thể. Sự thay đổi của các PRR và những con đường tín hiệu của chúng là nguyên nhân chính dẫn tới suy giảm chức năng của hệ thống miễn dịch không đặc hiệu trong xơ gan, hiện tượng này có thể do tổn thương tế bào gan [45]. Trong nghiên cứu trên mô hình tổn thương gan mạn do CCl_4 , viên nén Livganic cho thấy tác dụng cải thiện tình trạng tổn thương gan rõ rệt thông qua hình ảnh đại thể và vi thể gan, cũng như qua các chỉ số liên quan tới chức năng gan. Hạn chế tổn thương tế bào gan có thể là nguyên nhân dẫn tới tăng cường đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Ngược lại, trong quá trình viêm gan mạn, một số cytokin gây viêm có thể được gia tăng, trong đó có $\text{TNF-}\alpha$, là tác nhân làm nặng thêm quá trình tổn thương tế bào gan, ảnh hưởng tới đáp ứng của tế bào hình sao, quá trình hoạt hóa và di chuyển của các tế bào miễn dịch [152],[153]. Trong nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY, viên nén Livganic cho thấy tác dụng rõ rệt làm hạn chế gia tăng $\text{TNF-}\alpha$ so với lô mô hình, điều này góp phần làm giảm tổn thương tế bào gan gây ra do CY và làm tăng cường đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của viên nén Livganic.

Bạch cầu đa nhân trung tính ở máu ngoại vi là một thành phần quan trọng của hệ thống miễn dịch bẩm sinh, đóng vai trò quan trọng trong quá trình chống lại tác nhân gây bệnh và quá trình viêm. Ở bệnh nhân viêm gan mạn, đặc biệt ở giai đoạn có tình trạng xơ gan mất bù, chức năng của bạch cầu đa nhân trung tính suy giảm có liên quan tới tăng các cytokin tiền viêm, nhiễm khuẩn và tử vong [154]. Trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ, viên nén Livganic cho thấy tác dụng làm tăng số lượng của bạch cầu đa nhân trung tính khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình. Tuy nhiên, trên các mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY, tác dụng này không được thể hiện rõ. Khi sử dụng tác nhân suy giảm miễn dịch là CY, số lượng bạch cầu đa nhân trung tính không suy giảm quá mức như khi sử dụng tác nhân suy giảm miễn dịch chiếu tia xạ. Gia tăng bạch cầu đa nhân trung tính ở máu ngoại vi khi bị suy giảm quá mức có thể đóng góp vai trò quan trọng trong việc làm tăng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu không chỉ với tác nhân gây bệnh mà còn với các nhiễm khuẩn cơ hội khác trên bệnh nhân xơ gan mất bù [154].

Suy giảm miễn dịch liên quan tới xơ gan, trong đó có suy giảm miễn dịch đặc hiệu là tình trạng phổ biến trên bệnh nhân viêm gan mạn và xơ gan, kể cả xơ gan có nguyên nhân do rượu [46],[2],[155]. Suy giảm chức năng tế bào B có liên quan mạnh mẽ tới xơ gan và/hoặc tăng áp lực tĩnh mạch cửa. Hơn nữa, nghiên cứu đã chỉ ra rằng ở những bệnh nhân xơ gan, giảm sản xuất IgG, TNF- β , giảm đáp ứng miễn dịch với vắc xin và tăng nhạy cảm với nhiễm khuẩn có liên quan tới suy giảm lympho B [45]. Kết quả nghiên cứu cho thấy mặc dù số lượng CD19+ (dấu ấn bề mặt của tế bào lympho B) không gia tăng có ý nghĩa thống kê ở lô uống Livganic ở các nghiên cứu miễn dịch, tuy nhiên nồng độ IgG trong máu ngoại vi có sự gia tăng rõ rệt trong hai nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng CY cấp tính và CY mạn tính. Kết quả

này cho thấy viên nén Livganic có tác dụng làm tăng cường đáp ứng miễn dịch dịch thể, tác dụng này có thể mang lại lợi ích hạn chế các diễn tiến xơ hóa gan, đặc biệt ở các bệnh lý viêm gan mạn có nguyên nhân do virus.

Đối với các tổn thương gan diễn biến mạn tính, tỷ lệ tế bào Th1/Th2 (hay tỷ lệ CD4+/CD8+) rất quan trọng bởi vì Th1 biểu hiện các cytokin chống xơ hóa, Th2 biểu hiện các cytokin gây xơ hóa. Ở những bệnh nhân xơ gan, tỷ lệ CD4+/CD8+ suy giảm do sự gia tăng của CD8+, sự kéo dài gia tăng tế bào lympho T CD8+ dẫn tới tình trạng gây độc tế bào, chết theo chương trình, hủy hoại tế bào gan và xơ hóa gan gan [21]. Kết quả nghiên cứu trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng CY cho thấy rằng viên nén Livganic có tác dụng làm gia tăng số lượng tế bào lympho T CD4+, không làm gia tăng số lượng tế bào lympho T CD8a+, do vậy làm gia tăng tỷ lệ CD4+/CD8a+. Bên cạnh đó, một cytokin quan trọng của tế bào lympho T CD4+ là IL – 2 có sự gia tăng rõ rệt ở nhóm sử dụng Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY. Hiệu quả tăng cường miễn dịch thông qua tế bào lympho T cũng được quan sát thấy thông qua chỉ số phản ứng bì với kháng nguyên OA ở tất cả 3 nghiên cứu miễn dịch. Như vậy, có thể thấy rằng tác dụng của Livganic lên tế bào lympho T theo chiều hướng làm gia tăng Th1 và cytokin chống xơ hóa có tác dụng có lợi chống lại quá trình xơ hóa gan.

Qua những phân tích ở trên cho thấy sự quan trọng của mối liên quan qua lại và tương đối chặt chẽ giữa suy giảm miễn dịch và xơ hóa gan trong bệnh lý viêm gan mạn tính. Quá trình xơ hóa gan dẫn tới hàng loạt các thay đổi cũng như rối loạn của toàn bộ hệ thống miễn dịch của cơ thể, do đó ảnh hưởng tới hệ thống miễn dịch tại gan. Ngược lại, sự rối loạn và suy giảm miễn dịch này dẫn tới những tổn thương xơ hóa và suy giảm chức năng gan diễn ra nhanh hơn. Mặc dù tác dụng chưa thật rõ nét và mới chỉ dừng lại ở mô hình

ngiên cứu trên động vật, nhưng Viên nén Livganic đã cho thấy tác dụng kích thích miễn dịch đi kèm với tác dụng chống viêm gan mạn tính, điều này có thể dẫn tới những kết quả tích cực khi tiếp tục nghiên cứu sâu hơn trên bệnh lý viêm gan mạn tính.

4.4. Hạn chế của đề tài

Mặc dù đã góp phần tìm hiểu và chứng minh tác dụng kích thích miễn dịch và tác dụng chống viêm gan mạn của viên nén Livganic trên các mô hình động vật thực nghiệm, trong khuôn khổ đề tài luận án này vẫn tồn tại một số hạn chế như sau:

Mục tiêu của đề tài nhằm đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch và tác dụng chống viêm gan mạn của viên nén Livganic. Hai mục tiêu này hoàn toàn có thể được đánh giá trên cùng một mô hình viêm gan mạn gây ra do virus viêm gan trên động vật. Tuy nhiên, như đã phân tích ở trên, mô hình viêm gan B trên động vật khó khả thi trong điều kiện Việt Nam do chi phí rất cao và cần sử dụng một số loài linh trưởng như tinh tinh để làm động vật thực nghiệm. Gần đây, một số nhà nghiên cứu trên thế giới đã thành công trong việc sử dụng mô hình viêm gan B trên động vật nhỏ như chuột nhất biến đổi gen [156], mô hình này hứa hẹn sẽ có thể mang lại những đánh giá đầy đủ hơn về tác dụng dược lý của các thuốc được nghiên cứu để điều trị viêm gan mạn tính do virus.

Kết quả về tác dụng kích thích miễn dịch và chống xơ gan của viên nén Livganic trên mô hình động vật có thể không được thể hiện giống như khi sử dụng trên bệnh nhân viêm gan mạn tính do virus bởi vì mô hình suy giảm miễn dịch và mô hình viêm gan mạn được sử dụng trong nghiên cứu có cơ chế bệnh sinh tương đối khác biệt so với bệnh sinh của viêm gan mạn tính do virus trên người. Tuy nhiên, các mô hình được sử dụng trong nghiên cứu đều là những mô hình đáng tin cậy tại Việt Nam và trên thế giới trong quá trình

phát triển tiền lâm sàng của thuốc mới nhằm đánh giá tác dụng kích thích miễn dịch hoặc tác dụng lên quá trình viêm gan mạn tính.

Đánh giá giải phẫu bệnh học trong mô hình viêm gan mạn tính do CCl_4 không được lượng hóa thông qua các chỉ số phổ biến sử dụng trên người như Knodell-Ishak hoặc Metavir. Điều này dẫn tới không có các kết quả mang tính lượng hóa và thống kê về mặt giải phẫu bệnh của tổn thương gan mạn tính. Tuy nhiên, hình ảnh giải phẫu bệnh học khi nhuộm HE đã được đánh giá về mức độ tổn thương, hoại tử và hình thành xơ gan, ngoài ra tình trạng xơ hóa gan cũng được đánh giá thông qua các chỉ số khác như nhuộm Van Gieson định lượng collagen và định lượng hydroxyprolin.

KẾT LUẬN

Dựa vào các kết quả nghiên cứu đã trình bày ở phần trên, chúng tôi đưa ra kết luận như sau:

Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic:

Trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng CY, viên nén Livganic liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg làm tăng đáp ứng miễn dịch dịch thể thông qua: Tăng nồng độ IgG máu ngoại vi; làm tăng đáp ứng miễn dịch tế bào: Tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA và tăng nồng độ IL – 2.

Trên mô hình suy giảm miễn dịch kéo dài bằng CY liều nhỏ, viên nén Livganic liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg làm tăng đáp ứng miễn dịch dịch thể: Tăng nồng độ IgG máu ngoại vi; tăng đáp ứng miễn dịch tế bào: Tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA.

Trên mô hình suy giảm miễn dịch bằng tia xạ, Livganic liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg làm tăng đáp ứng miễn dịch chung thông qua: Tăng số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi, tăng số lượng tế bào lympho, tăng số lượng bạch cầu đa nhân trung tính, cải thiện hình ảnh vi thể giải phẫu bệnh lách và tuyến ức; tăng đáp ứng miễn dịch tế bào: Làm tăng phản ứng bì với kháng nguyên OA, làm phục hồi tỷ lệ CD4+/CD8a+.

Tác dụng chống viêm gan tính của viên nén Livganic:

Trên mô hình viêm gan mạn tính gây ra do CCl₄, viên nén Livganic liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg làm giảm tỷ lệ chuột chết, cải thiện hình ảnh đại thể và giải phẫu bệnh vi thể, làm hạn chế gia tăng trọng lượng gan, cải thiện chức năng gan (làm tăng albumin và tăng cholesterol), làm tăng số lượng hồng cầu và số lượng huyết sắc tố.

Như vậy, viên nén Livganic có tác dụng kích thích miễn dịch và chống viêm gan mạn tính trên mô hình động vật thực nghiệm.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi đưa ra một số kiến nghị sau:

- Tiến hành thêm một số nghiên cứu chuyên sâu hơn nhằm tìm hiểu mối liên quan giữa tác dụng kích thích miễn dịch và tác dụng hạn chế tổn thương gan mạn tính của sản phẩm Livganic.
- Tiến hành đánh giá tác dụng của Livganic trên một số mô hình viêm gan khác như mô hình viêm gan mạn tính do virus.

DANH MỤC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI

- 1- Nguyễn Phương Thanh, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Trọng Thông (2020). Tác dụng của viên nén Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch cấp tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. Số 125 (1), 32-39
- 2- Nguyễn Phương Thanh, Nguyễn Chí Dũng, Nguyễn Trọng Thông (2020). Tác dụng kích thích miễn dịch của viên nén Livganic trên mô hình suy giảm miễn dịch mạn tính bằng cyclophosphamid ở chuột nhắt trắng. *Tạp chí Y học Việt Nam*. Số 1(491), 261-266.
- 3- Nguyễn Phương Thanh, Đinh Thu Hằng, Nguyễn Thị Huyền, Hoàng Thái Hoa Cường, Nguyễn Trọng Thông (2020). Tác dụng của viên nén Livganic trên mô hình xơ gan bằng carbon tetraclohid ở chuột nhắt trắng. *Tạp chí Y học Việt Nam*. Số 2(493), 204 – 210.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. David L. Thomas (2019). Global Elimination of Chronic Hepatitis. *N Engl J Med*, 380, 2041-2050.
2. Mohd Talha Noor and Piyush Manoria (2017). Immune Dysfunction in Cirrhosis. *J Clin Transl Hepatol*, 5(1), 50–58.
3. Tian-Yang Li, Yang Yang, Guo Zhou, and Zheng-Kun Tu (2019). Immune suppression in chronic hepatitis B infection associated liver disease: A review. *World J Gastroenterol*, 25(27), 3527–3537.
4. Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Phương Thanh, Hoàng Anh Thư, Nguyễn Duy Như, Phạm Ngọc Bách, Ngô Thị Thủy (2012). Tác dụng bảo vệ gan của viên nén bao film giải độc gan Tuệ linh (Livganic) trên mô hình tổn thương gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng. *Tạp chí Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*, 4, 137 – 140.
5. Chen, Y., & Tian, Z. (2019). HBV-Induced Immune Imbalance in the Development of HCC. *Frontiers in immunology*, 10, 2048.
6. Sherif R. Z. Abdel-Misih and Mark Bloomston (2010). Live anatomy. *Surg Clin North Am*, 90(4), 643–653.
7. Elijah Trefts, Maureen Gannon, and David H. Wasserman (2017). The Liver. *Curr Biol*, 27(21), R1147–R1151.
8. Bộ môn Hoá sinh trường Đại học Y Hà Nội (2007). Hóa sinh hệ thống gan mật. *Hóa sinh*, Nhà xuất bản y học, tr.231 – 273, 371 – 375.
9. William M.Lee (2003). Drug – induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 1 (349), 474 – 485.
10. Igor Theurl, Ingo Hilgendorf, Filip K Swirski (2016). On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nature Medicine*, 22, 945–951.

11. Ramon Bataller and David A. Brenner (2005). Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, (115), 209 – 218.
12. Martin.J.S (1998). *Acetaminophen*. Toxicologic emergencies Jeanman.M.Roche, 543 – 558.
13. Weber L. W, Boll M, Stampfl A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33 (2), 105 – 136.
14. Bộ môn Nội - Đại học Y Hà Nội (2014). *Bài giảng bệnh học nội khoa*. Tập 2, Nhà xuất bản Y học.
15. Jay HH (2007). Chronic hepatitis. *Goldman: Cecil Medicine*, 23rd edit, Saundes Elsevier:336-356.
16. Jules LD (2012), “Chronic Hepatitis”, *Harrison’s Gastroenterology and Hepatology*, 17 th edit: Mc Graw Hill Medical, 390-414.
17. Trần Thị Khánh Tường (2015). *Nghiên cứu giá trị chẩn đoán xơ gan bằng phối hợp kỹ thuật ARFI với APRI ở các bệnh nhân viêm gan mạn*. Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế.
18. Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, Russo MW, Bonkovsky HL, Schrum LW (2012). Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology* 56(1), 300-10.
19. Oakley F, Meso M, Iredale JP, Green K, Marek CJ, Zhou X, May MJ, Millward-Sadler H, Wright MC, Mann DA (2005). Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology*, 128(1), 108-20.
20. Wen-Ce Zhou, Quan-Bao Zhang, and Liang Qiao (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20(23), 7312–7324.

21. Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos PL, Papp M (2014). Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20(10), 2564-77.
22. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, et al (2004). Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*; 126, 1750-8.
23. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, et al (2015). The RNA sensor RIG490 I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity*, 42, 123-32.
24. Lebossé F, Testoni B, Fresquet J, Facchetti F, Galmozzi E, Fournier M, Hervieu V, Berthillon P, Berby F, Bordes I, Durantel D, Levrero M, Lampertico P, Zoulim F (2017). Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 66(5), 897-909.
25. Molla S (2016). Review on Human Immune Response against Hepatitis B Virus (HBV) Infection. *J Emerg Dis Virol* 2(2): doi <http://dx.doi.org/10.16966/jedv.117>.
26. Don Ganem, M.D., and Alfred M. Prince, M.D (2004). Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med*, 350, 1118-1129.
27. Carman WF, Thomas HC (1992). Genetic variation in hepatitis B virus. *Gastroenterology* 102, 711-719.
28. Chang JJ, Lewin SR (2007). Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunology and Cell Biology*, 85, 16-23.
29. Lynn B. Dustin (2017). Innate and Adaptive Immune Responses in Chronic HCV infection. *Curr Drug Targets*, 18(7), 826–843.

30. Odendall C, Dixit E, Stavru F, Bierne H, Franz KM, Durbin AF, Boulant S, Gehrke L, Cossart P, Kagan JC (2014). Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol*, 15(8), 717-26.
31. Li K, Lemon SM (2013). Innate immune responses in hepatitis C virus infection. *Semin Immunopathol*, 35(1), 53-72.
32. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*, 31, 227-58.
33. O'Connor KS, George J, Booth D, Ahlenstiel G (2014). Dendritic cells in hepatitis C virus infection: key players in the IFNL3-genotype response. *World J Gastroenterol*. 20(47), 17830-8.
34. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM (2014). The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol*, 61(3), 660-71.
35. Wherry EJ (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12(6):492-9.
36. Klenerman P, Thimme R (2012). T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut*, 61(8), 1226-34.
37. Raghuraman S, Park H, Osburn WO, Winkelstein E, Edlin BR, Rehermann B (2012) Spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of T-cell exhaustion. *J Infect Dis*, 205(5), 763-71.
38. Rong L, Dahari H, Ribeiro RM, Perelson AS (2010). Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Sci Transl Med*, 2(30), 30-32.
39. Wang HJ, Gao B, Zakhari S, Nagy LE (2012). Inflammation in alcoholic liver disease. *Annu Rev Nutr*, 32, 343-68.

40. Kubes P, Mehal WZ (2012). Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*, 143(5), 1158-1172.
41. Laura E. Nagy (2015). The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Res*, 37(2), 237–250.
42. Patricia E. Molina, Kyle I. Happel, Ping Zhang, Jay K. Kolls, and Steve Nelson (2010). Focus On: Alcohol and the Immune System. *Alcohol Res Health*, 33(1-2), 97–108.
43. Chedid A, Chadalawada KR, Morgan TR, Moritz TE, Mendenhall CL, Hammond JB, Emblad PW, Cifuentes DC, Kwak JW, Gilman-Sachs A (1994). Phospholipid antibodies in alcoholic liver disease. *Hepatology*, 20(6), 1465-71.
44. Emanuele Albano and Matteo Vidali (2010). Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Genes Nutr*, 5(2), 141–147.
45. Nora Sipeki, Peter Antal-Szalmas, Peter L Lakatos, and Maria Papp (2014). Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20(10), 2564–2577.
46. Albillos A1, Lario M2, Álvarez-Mon M3 (2014). Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*, 61(6), 1385-96.
47. Aoyama T, Paik YH, Seki E (2010). Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterol Res Pract*, 192543.
48. Doi H, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang KM, Vonderheide RH, Kaplan DE (2012). Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology*, 55(3), 709-19.
49. European association for the study of the liver (2015). Clinical practice guidelines: autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology* (63), 971 – 1004.

50. European association for the study of the liver (2012). Clinical practice guidelines: management of alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology* (57): 399 – 420.
51. Bộ Y tế (2019). Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị viêm gan B.
52. Bộ Y tế (2016). Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị viêm gan C.
53. Mazen Nouredin and Robert Gish (2014). Hepatitis Delta: Epidemiology, Diagnosis and Management 36 Years After Discovery. *Curr Gastroenterol Rep*, 16(1), 365.
54. Norah A. Terrault, Natalie H. Bzowej, Kyong-Mi Chang, Jessica P. Hwang, Maureen M. Jonas, and M. Hassan Murad (2015). AASLD Guidelines for Treatment of Chronic Hepatitis B. *Hepatology*: 1 – 23.
55. European Association for the Study of the Liver (2018). EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 69, 406–460.
56. Học Viện Quân Y (2009). Bệnh học nội khoa – Y học cổ truyền. *Nhà xuất bản Y học*.
57. Nguyễn Thị Minh Hồng, Nguyễn Nhược Kim (2015). Đánh giá tác dụng của XG1 điều trị xơ gan do rượu giai đoạn Child – Pugh B. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 94 (2), 110 – 118.
58. Nguyễn Thị Bích Thu (2002). *Nghiên cứu cây cà gai leo làm thuốc chống viêm gan và ức chế xơ gan*, Luận án tiến sĩ, Viện Dược liệu.
59. Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Vinh Hà, Vũ Thị Ngọc Thanh (2004). Nghiên cứu ảnh hưởng của cao trái nhàu (*Morinda citrifolia*. L. Rubiaceae) trên động vật thực nghiệm bị gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. *TCNCYH* 27 (1).
60. Nguyễn Thị Minh Hằng, Nguyễn Thị Tú Oanh, Phạm Thị Vân Anh, Vũ Thị Ngọc Thanh (2017). Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của chế phẩm giàu ecdysteroid từ cây lược vàng (*Callisia fragrans*). *Tạp chí Dược học*, 8 (57).

61. Phạm Thị Vân Anh, Mai Phương Thanh, Trịnh Thị Điệp, Nguyễn Trọng Thông (2014). Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch của andrographolid chiết xuất từ xuyên tâm liên trên chuột nhắt trắng bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. *Tạp chí nghiên cứu dược và Thông tin thuốc*, 1, 18 – 21.
62. Dinesh Kumar, Vikrant Arya, Ranjeet Kaurc, Zulfiqar Ali Bhat, Vivek Kumar Gupta, Vijender Kumar (2012). A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. *Journal of microbiology, immunology and infection*, 45(3), 165 – 184.
63. Phan Thị Phi Phi, Bùi Thị Bằng, Nguyễn Gia Chấn, Phan Thu Anh, Đỗ Hoà Bình, Lê Minh Phương (1998). Tác dụng phục hồi miễn dịch của polysaccharid chiết xuất từ rễ củ cây đương quy (*angelica acutiloba kitagawa*). *Tạp chí dược liệu*, (3): 72 – 75.
64. Basic Immunology (2019). Functions and Disorders of the Immune System, 6th Ed.
65. Phạm Thị Vân Anh (2011). Nghiên cứu tác dụng kích thích miễn dịch và chống oxy hóa của cao quả nhàu *Morinda citrifolia* L. Rubiaceae. Luận án Tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
66. Rokeya Sultana, Salma Khanam and Kshama Devi et al (2011). Immunomodulatory effect of methanolextract of Solanum xanthocarpum fruits. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 2(2), 93-97.
67. Arshad Hussain, Wahab Shadma, Ali Maksood,1 and Shahid Hussain Ansari (2013). Protective effects of Picrorhiza kurroa on cyclophosphamide - induced immunosuppression in mice. *Pharmacognosy Res.*, 5(1), 30–35.

68. Silu Wang, Kaiyu Wang, Defang Chen³ and Ling Zhao (2014). Influence of *Sarcodon imbricatus* polysaccharide on immune function in immunosuppressive mouse. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(7), 1723-1726.
69. Maria Anete Lallo,^a Lidiana F. Vidoto da Costa,^a João Manoel de Castro (2013). Effect of Three Drugs against *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Immunosuppressed Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3067–3071.
70. A. H. Kyakulaga, P. E. Ogwang, C. Obua, G. Nakabonge and E. N. Mwavu (2013). Immunomodulatory Effects of Aqueous Extracts of *Auricularia* sp and *Pleurotus* sp Mushrooms in Cyclophosphamide Immunosuppressed Wistar Rats. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 3(4), 662-670.
71. Sergey V. Tokalov, Wolfgang Enghardt, and Nasreddin Abolmaali (2009). Improvement of Radiation-Mediated Immunosuppression of Human NSCLC Tumour Xenografts in a Nude Rat Model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
72. Li Wei, Tao Xue, Hong Yang, Guang-Yue Zhao, Geng Zhang, Zhi-Hong Lu, Yan-Hong Huang, Xiang-Dong Ma, Hai-Xia Liu, Sheng-Ru Liang, Fang Yang, Bi-Liang Chen (2013). Modified Uterine Allotransplantation and Immunosuppression Procedure in the Sheep Model. *PLOS ONE*, 8(11), 1 – 15.
73. Nguyễn Thị Vinh Hà, Phạm Huy Quyển, Phan Thị Phi Phi (1994). Về mô hình gây suy giảm miễn dịch thực nghiệm. *Kỹ yếu công trình nghiên cứu khoa học*, Đại học Y Hà Nội, 5, 16 – 17.
74. Manepalli S, Gandhi JA, Ekhar VV, Asplund MB, Coelho C, Martinez LR (2013). Characterization of a Cyclophosphamide-induced murine model of immunosuppression to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *J Med Microbiol*.

75. Qian Y, Huang R, Li S, Xie R, Qian B, Zhang Z, Li L, Wang B, Tian C, Yang J, Xiang M (2019). Ginsenoside Rh2 reverses cyclophosphamide-induced immune deficiency by regulating fatty acid metabolism. *J Leukoc Biol*, 106(5), 1089-1100.
76. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC (2011). Chap 61: Cytotoxic Agents. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 12e*, McGraw-Hill Global Education Holdings.
77. A. Geo Vigila and Baskaran (2008). Immunomodulatory Effect of Coconut Protein on Cyclophosphamide Induced Immune Suppressed Swiss Albino Mice. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, 1206-12.
78. Xiaoming Chen, Wenjian Nie, Sairong Fan, Junfeng Zhang, Yanxing Wang, Jianxin Lu, Liqin Jin (2012). A polysaccharide from *Sargassum fusiforme* protects against immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1114-1119.
79. A. H. Kyakulaga, P. E. Ogwang, C. Obua, G. Nakabonge and E. N. Mwavu3 (2013). Immunomodulatory Effects of Aqueous Extracts of *Auricularia* sp and *Pleurotus* sp Mushrooms in Cyclophosphamide-Immunosuppressed Wistar Rats. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 3(4), 662-670.
80. Cuilin Cheng, Juanjuan Yi, Rongchun Wang, Li Cheng, Zhenyu Wang and Weihong Lu (2018). Protection of Spleen Tissue of γ -ray Irradiated Mice against Immunosuppressive and Oxidative Effects of Radiation by Adenosine 50 –Monophosphate. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 1273.
81. Ritsuko Koga, Shinji Ohno, Satoshi Ikegame, and Yusuke Yanagi (2010). Measles Virus-Induced Immunosuppression in SLAM Knock-In Mice. *Journal of Virology*, 5360–5367.

82. Peter Fickert, Ulrike Sto" ger, Andrea Fuchsbichler et al (2007). A New Xenobiotic-Induced Mouse Model of Sclerosing Cholangitis and Biliary Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 171(2), 525 – 536.
83. Ming-Ling Chang, Chau-Ting Yeh, Pei-Yeh Chang, Jeng-Chang Chen 2005. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxinadministration and common bile duct ligation. *World J Gastroenterol*, 11(27), 4167-4172.
84. Robert E. Lanford, Bernadette Guerra, Doborah Chavez et al (2013). GS-9620, an Oral Agonist of Toll-Like Receptor-7, Induces Prolonged Suppression of Hepatitis B Virus in Chronically Infected Chimpanzees. *Gastroenterology*, 144 (7), 1508-1517.e10.
85. Chandan Guha, Sankar Mohan, Namita Roy-Chowdhury, Jayanta Roy-Chowdhury (2004). Cell Culture and Animal Models of Viral Hepatitis. Part I: Hepatitis B. *Lab animal*, 33(7), 37 – 46.
86. Feitelson MA, Larkin JD (2001). New animal models of hepatitis B and C. *ILAR J.*, 42(2):127-38.
87. ZHAO Gui-qin, YIN Zhi-feng, LIU Li-yan, MAO Xiao-xia, SU Zhan-hui (2013). Anti-hepatitis B Virus Activity of 8-epi-Kingiside in *Jasminum officinale*var. *Grandiflorum*. *Chinese Herbal Medicines*, 2013, 5(1): 53-57.
88. Keiji Ueda (2013). Start or End? One of the Biggest Mysteries is Finally Solved?. *J Med Microb Diagn*, 2, 2.
89. Cheng Tang, Daoliang Lan, Huanrong Zhang, Jing Ma, and Hua Yue (2013). Transcriptome Analysis of Duck Liver and Identification of Differentially Expressed Transcripts in Response to Duck Hepatitis A Virus Genotype C Infection. *PLoS One.*, 8(7): e71051.

90. Hai Nhung Truong, Hai Nam Nguyen, Thi Kim Nguyen Nguyen, Minh Huy Le, Huong Giang Tran, Nghia Huynh and Thanh Van Nguyen (2014). Establishment of a standardized mouse model of hepatic fibrosis for biomedical research. *Biomed Res Ther.*, 1(2): 43-49.
91. Nhung Hai Truong, Nam Hai Nguyen, Trinh Van Le, Ngoc Bich Vu, Nghia Huynh, Thanh Van Nguyen, Huy Minh Le, Ngoc Kim Phan, and Phuc Van Pham (2016). Comparison of the Treatment Efficiency of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation via Tail and Portal Veins in CCl₄-Induced Mouse Liver Fibrosis. *Stem Cells International Volume*, Article ID 5720413.
92. Đỗ Tất Lợi (2011). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản thời đại, tr. 221, 412, 625.
93. Nguyễn Xuân Hải, Nguyễn Trung Nhân, Nguyễn Thị Thanh Mai (2018). Thành phần hóa học của cây cà gai leo (*Solanum procumbens*). *Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ*, 2(6): 134 – 138.
94. Nguyen Hoang Loc and Huynh Van Kiet (2011). Micropropagation of *Solanum hainanense* Hance. *Annals of Biological Research*, 2 (2): 394-398.
95. Nguyễn Minh Khai (1994). *Nghiên cứu tác dụng của cà gai leo và LH₁ trên xơ gan thực nghiệm*. Kỷ yếu công trình khoa học Y dược học. Đại học dược Hà Nội 1988, 31 – 35.
96. Nguyễn Minh Khai (1991). *Nghiên cứu tác dụng của một số hóa chất, dược liệu trên collagenase, collagen và khả năng ứng dụng làm thuốc của chúng*. Luận án PTS khoa học Y dược – Đại học Dược Hà Nội.
97. Tee TT, Cheah YH, Hawariah LP (2007). F16, a fraction from *Eurycoma longifolia* jack extract, induces apoptosis via a caspase-9-independent manner in MCF-7 cells. *Anticancer Res*, 27(5A): 3425-30.

98. Quang-Vinh Nguyen and Jong-Bang Eun (2011). Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13), 2798-2811.
99. Nguyen Phuc Thai, Le Van Trung, Nguyen Khac Hai and Le Huynh (1998). Protective efficacy of *Solanum hainanense* Hance during hepatotoxicity in male mice with prolonged and small oral doses of trinitrotoluene. *J Occup Health*, 40: 276–278.
100. Nguyễn Phúc Hải (1998). *Nghiên cứu lâm sàng, cận lâm sàng tổn thương gan do tiếp xúc nghề nghiệp với trinitrotoluen và thăm dò tác dụng bảo vệ gan của cà gai leo trên thực nghiệm*. Luận án tiến sĩ y học, Học viện Quân Y.
101. Trịnh Thị Xuân Hòa, Nguyễn Văn Mùi, Nguyễn Đình Mão (1996). Đánh giá tác dụng điều trị của thuốc HAINA ở bệnh nhân viêm gan B mạn hoạt động. *Công trình nghiên cứu Y học Quân sự* số 3/1996, tr. 43 – 48.
102. Trịnh Thị Xuân Hòa và cs (1998). Một số biến đổi mô học gan và marker virus viêm gan B ở bệnh nhân viêm gan B mạn hoạt động được điều trị bằng thuốc HAINA. *Công trình nghiên cứu Y học Quân sự* số 4/1998, 84 – 88.
103. Đỗ Huy Bích (2004). Cây Bá bệnh thuốc quý dân gian. *Bản tin dược liệu* (12), 2 – 8.
104. Hnin Ei Thu, Zahid Hussain, Isa Naina Mohamed, Ahmad Nazrun Shuid (2018). Recent Advances in Antibacterial, Antiprotozoal and Antifungal Trends of *Eurycoma longifolia*: A Review of Therapeutic Implications and Future Prospects. *Curr Drug Targets*, 19(14): 1657-1671.
105. Nurhanan M.Y, et al (2005). Cytotoxic effect of the Root Extract of *Eurycoma longifolia* Jack. *Phytotherapy Research* (19): 994 – 996.

106. Choon K.K, et al (2007). Streamlined life cycle assessment of residue utilization options in Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia*) water extract manufacturing process. *Clean Techn Environ Policy*, 225 – 234.
107. Hamoud Hussein Al – FAQEH (2010). The effect of *Eurycoma Longifolia* Jack (Tongkat ali) on carbon tetrachloride – induced liver damage in rats. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences* (8), pp. 71 – 84.
108. Hnin Ei Thu, Zahid Hussain, Isa Naina Mohamed, Ahmad Nazrun Shuid (2018). *Eurycoma longifolia*, A Potential Phytochemistry for the Treatment of Cancer: Evidence of p53-mediated Apoptosis in Cancerous Cells. *Curr Drug Targets*, 19(10):1109-1126.
109. George, A., Suzuki, N., Abas, A. B., Mohri, K., Utsuyama, M., Hirokawa, K., and Takara, T. (2016). Immunomodulation in Middle-Aged Humans Via the Ingestion of Physta® Standardized Root Water Extract of *Eurycoma longifolia* Jack—A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Study. *Phytother. Res.*, 30: 627– 635.
110. Hermann Stegemann, Karlheinz Stalder (1967). Determination of hydroxyproline. *Clinica Chimica Acta*, 18 (2): 267 – 273.
111. Pranab Dey (2018). Connective Tissue Stain: Principle and Procedure. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*, 99-108.
112. Allweiss, L., & Dandri, M. (2016). Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*, 64 (1), S17–S31.
113. Boeijen, L. L., Hoogeveen, R. C., Boonstra, A., & Lauer, G. M (2012). Hepatitis B virus infection and the immune response: The big questions. Best practice & research. *Clinical gastroenterology*, 31(3): 265–272.

114. Yongyan Chen, and Zhigang Tian (2019). HBV-Induced Immune Imbalance in the Development of HCC. *Front Immunol*; 10: 2048.
115. Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Vinh Hà, Vũ Thị Ngọc Thanh (2004). Nghiên cứu ảnh hưởng của cao trái nhàu (*Morinda citrifolia* L. Rubiaceae) trên động vật thực nghiệm bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid. *Tạp chí nghiên cứu y học*, 27 (1): 28 – 33.
116. Gary S. Firestein, Ralph C. Budd, Sherine E. Gabriel, Iain B. McInnes and James R. O'Dell (2013). Immunosuppressive drugs. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 62, 941-956.e4.
117. P Pratheeskumar, Girija Kuttan (2010). *Cardiospermum halimifolium* inhibits cyclophosphamide – induced immunosuppression and oxidative stress in mice and also regulates iNOs and COX -2 gene expression in LPS stimulated macrophage. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 11, 1245-1252.
118. Zhou, Y., Chen, X., Yi, R., Li, G., Sun, P., Qian, Y., & Zhao, X. (2018). Immunomodulatory Effect of Tremella Polysaccharides against Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(2), 239.
119. Chethan, G. E., Kumar De, U., Garkhal, J., Sircar, S., Malik, Y., Sahoo, N. R., Abhishek, & Verma, M. R. (2019). Immunomodulating dose of levamisole stimulates innate immune response and prevents intestinal damage in porcine rotavirus diarrhea: a restricted-randomized, single-blinded, and placebo-controlled clinical trial. *Tropical animal health and production*, 51(6), 1455–1465.
120. Hosseini, M., Shalchiantabrizi, P., Dadgarmoghaddam, M., Ahmady-Simab, S., Behjati, A., & Salari, M. (2017). The Effect of Oral Levamisole Co-administration on the Level of Immune Response to Hepatitis B Vaccine in Healthy Individuals: A Randomized Clinical Trial. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 16(3), 219–227.

121. Zhao, G., He, G., Lu, C., Lao, L., & Wei, J. (2017). Study of Rhizoma Darynaria on regulation of cellular immune function in immunosuppressive mice. *Journal of hygiene research*, 46(1), 84–93.
122. Fu, Y., Wang, T., Xiu, L., Shi, X., Bian, Z., Zhang, Y., ... Wang, X. (2016). Levamisole promotes murine bone marrow derived dendritic cell activation and drives Th1 immune response in vitro and in vivo. *International Immunopharmacology*, 31, 57–65.
123. Nguyễn Ngọc Lanh, Văn Đình Hoa (2006). *Miễn dịch học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
124. Judith A Owen; Jenni Punt; Sharon A Stranford; Patricia P Jones; Janis Kuby (2013). *Kuby immunology, 7th Edition*. New York : W.H. Freeman.
125. David Male, Jonathan Brostoff, David B Roth, Ivan M Roitt (2013). *Immunology. Elsevier*, 8th edition.
126. Mudgal, J., Mudgal, P. P., Kinra, M., & Raval, R. (2019). Immunomodulatory role of chitosan-based nanoparticles and oligosaccharides in cyclophosphamide-treated mice. *Scandinavian journal of immunology*, 89(4), e12749.
127. Hamoud Hussein Al – Faqeh, Bala Yauri Muhammad, Emad Mohhamed Nafie and Anuar Khorshid (2010). The effect of Eurycoma longifolia Jack (Tongkat Ali) on carbon tetrachloride – induced liver damage in rats. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 8, No. 2, 71–84.
128. Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Phương Thanh, Hoàng Anh Thư, Nguyễn Duy Như, Phạm Ngọc Bách, Ngô Thị Thủy (2012). Tác dụng bảo vệ gan của viên nén bao film giải độc gan Tuệ linh (Livganic) trên mô hình tổn thương gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng. *Tạp chí Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*, 4: 137 – 140.

129. Li, T.Y Yang, Y Zhou, G Tu, Z.K (2019). Immune Suppression in Chronic Hepatitis B Infection Associated Liver Disease: A Review. *World J. Gastroenterol*, 25: 3527–3537.
130. Eui-Cheol Shin, Pil Soo Sung, Su-Hyung Park (2016). Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nature Reviews Immunology*, 16: 509–523.
131. Gary S. Firestein, Ralph C. Budd, Sherine E. Gabriel, Iain B. McInnes and James R. O'Dell (2013). Immunosuppressive drugs. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 62, 941-956.e4.
132. Sanjeev Heroor, Arunkumar Beknal, Nitin Mahurkar (2011). Immunomodulatory Activity of Methanolic Extract of Ficus Glomerata Roxb. Leaf, Fruit and Bark in Cyclophosphamide Induced Mice. *International Journal of Modern Botany* 1(1): 4-7.
133. Liu, X., Zhang, Z., Liu, J., Wang, Y., Zhou, Q., Wang, S., & Wang, X. (2019). Ginsenoside Rg3 improves cyclophosphamide-induced immunocompetence in Balb/c mice. *International immunopharmacology*, 72, 98–111.
134. Giovanna Schiavoni, Fabrizio Mattei, Tiziana Di Pucchio, Stefano M. Santini, Laura Bracci, Filippo Belardelli and Enrico Proietti (2000). Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44hi T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood*, 95: 2024-2030.
135. Ha, D., Joo, H., Ahn, G., Kim, M. J., Bing, S. J., An, S., Kim, H., Kang, K. G., Lim, Y. K., & Jee, Y. (2012). Jeju ground water containing vanadium induced immune activation on splenocytes of low dose γ -rays-irradiated mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(6), 2097–2105.

136. Lina Lu, Zongli Li, Yanhua Zuo, Libo Zhao, Bin Liu (2018). Radioprotective activity of glutathione on cognitive ability in X-ray radiated tumor-bearing mice. *Neurological Research* 40:9, pages 758-766.
137. Cheng, C., Yi, J., Wang, R., Cheng, L., Wang, Z., & Lu, W. (2018). Protection of Spleen Tissue of γ -ray Irradiated Mice against Immunosuppressive and Oxidative Effects of Radiation by Adenosine 5'-Monophosphate. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1273.
138. Liu, T., Pei, H., Xu, D., Zhang, Y., Wan, J., Wu, X.,... Zhou, G. (2014). GANRA-5 protects mice from X-ray irradiation-induced dysfunction of the immune system. *Free Radical Research*, 48(8), 875–882.
139. Bogdándi, E. N., Balogh, A., Felgyinszki, N., Szatmári, T., Persa, E., Hildebrandt, G.,... Lumniczky, K. (2010). Effects of Low-Dose Radiation on the Immune System of Mice after Total-Body Irradiation. *Radiation Research*, 174(4), 480–489.
140. Hien DT, Long TP, Thao TP, Lee JH, Trang DT, Minh NT, Van Cuong P, Lan DT, Dang NH, Dat NT (2019). Anti-inflammatory effects of alkaloid enriched extract from roots of *Eurycoma longifolia* Jack. *Asian Pac J Trop Biomed*;9:18-23.
141. Jain, S. K., Pemberton, P. W., Smith, A., McMahon, R. F., Burrows, P. C., Aboutwerat, A., & Warnes, T. W. (2002). Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *Journal of hepatology*, 36(6), 805–811.
142. Natascha Roehlen, Emilie Crouchet, Thomas F Baumert (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(4):875.

143. Hamoud Hussein Al – Faqeh, Bala Yauri Muhammad, Emad Mohhamed Nafie and Anuar Khorshid (2010). The effect of *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali) on carbon tetrachloride – induced liver damage in rats. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8 (2), 71–84.
144. Nhung Hai Truong, Nam Hai Nguyen, Trinh Van Le, Ngoc Bich Vu, Nghia Huynh, Thanh Van Nguyen, Huy Minh Le, Ngoc Kim Phan, and Phuc Van Pham (2016). Comparison of the Treatment Efficiency of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation via Tail and Portal Veins in CCl₄-Induced Mouse Liver Fibrosis. *Stem Cells International Volume*, Article ID 5720413.
145. Liu, Q., Liu, Q., Lei, X., Cao, Z., Zhang, J., Kuang, T., Liu, G., Fang, Y., Qian, K., Fu, J., Du, H., Yan, L., Xiao, Z., Li, C. and Xu, X. (2020). Protective effect of oil from *Cornus wilsoniana* fruits against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. *Food & Nutrition Research*, 64.
146. Weber LW, Boll M, Stampfl A (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 33, 105–136.
147. Gupta, R. K., Hussain, T., Panigrahi, G., Das, A., Singh, G. N., Sweetey, K., Faiyazuddin, M., & Rao, C. V. (2011). Hepatoprotective effect of *Solanum xanthocarpum* fruit extract against CCl₄ induced acute liver toxicity in experimental animals. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(12), 964–968
148. Oľga Otrubová, Ladislav Turecký, Oľga Uličná, Pavol Janega, Ján Luha and Jana Muchová (2018). Therapeutic effects of N-acetyl-L-cysteine on liver damage induced by long-term CCl₄ administration. *Gen. Physiol. Biophys*, 37, 23–31.

149. Shu Dong, Qi-Long Chen, Ya-Nan Song, Yang Sun, Bin Wei, Xiao-Yan Li, Yi-Yang Hu, Ping Liu, Shi-Bing Su (2016). Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. *Toxicological Sciences*, 41, 561–572
150. Ali, M., Khan, T., Fatima, K., Ali, Q., Ovais, M., Khalil, A. T., Ullah, I., Raza, A., Shinwari, Z. K., & Idrees, M. (2018). Selected hepatoprotective herbal medicines: Evidence from ethnomedicinal applications, animal models, and possible mechanism of actions. *Phytotherapy research : PTR*, 32(2), 199–215.
151. Xie, W. L., Jiang, R., Shen, X. L., Chen, Z. Y., & Deng, X. M. (2015). Diosgenin attenuates hepatic stellate cell activation through transforming growth factor- β /Smad signaling pathway. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(11), 20323–20329.
152. Osawa, Y., Kojika, E., Hayashi, Y., Kimura, M., Nishikawa, K., Yoshio, S., Doi, H., Kanto, T., & Kimura, K. (2018). Tumor necrosis factor- α -mediated hepatocyte apoptosis stimulates fibrosis in the steatotic liver in mice. *Hepatology communications*, 2(4), 407–420.
153. Beringer, A., & Miossec, P. (2019). IL-17 and TNF- α co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells. *Clinical and experimental immunology*, 198(1), 111–120.
154. Irvine, K. M., Ratnasekera, I., Powell, E. E., & Hume, D. A. (2019). Causes and Consequences of Innate Immune Dysfunction in Cirrhosis. *Frontiers in immunology*, 10, 293.
155. Liaskou, E., & Hirschfield, G. M. (2019). Cirrhosis-associated immune dysfunction: Novel insights in impaired adaptive immunity. *EBioMedicine*, 50, 3–4.
156. Kanbe, A., Ishikawa, T., Hara, A., Suemizu, H., Nanizawa, E., Tamaki, Y., & Ito, H. (2020). Novel hepatitis B virus infection mouse model using herpes simplex virus type 1 thymidine kinase transgenic mice. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 10.1111/jgh.15142.