

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



Bùi Thị Thu Hà

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG KHÁNG U THỰC NGHIỆM
CỦA RỄ CỬ TAM THẮT (*PANAX NOTOGINSENG* (BURK.)
F.H. CHEN, ARALIACEAE) TRỒNG Ở VIỆT NAM
TRƯỚC VÀ SAU CHẾ BIẾN**

Chuyên ngành: Dược lý – Dược lâm sàng

Mã số: 9720205

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Hà Nội, năm 2022

Công trình hoàn thành tại:

- Viện Dược liệu
- Viện Hàn lâm KH & CN VN
- Trường ĐH KHTN, ĐHQG Hà Nội
- Học viện Quân y

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Vũ Mạnh Hùng
2. GS.TS. Nguyễn Thanh Hải

Phản biện 1:.....

Phản biện 2:.....

Phản biện 3:.....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện họp tại Viện Dược liệu.

Vào hồi.....giờ, ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam.
- Thư viện Viện Dược liệu.

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Ung thư đang dần có xu hướng vượt bệnh tim mạch trở thành nguyên nhân hàng đầu gây tử vong sớm ở các quốc gia. Theo Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế, năm 2020 thế giới ghi nhận khoảng 19,3 triệu ca ung thư mới và gần 10 triệu ca tử vong do ung thư. Tại Việt Nam, năm 2020 số ca ung thư mới là 182.563 và số người chết là 122.690. Theo số liệu của Hội nghị khoa học phòng chống ung thư lần thứ 9 tại Huế năm 2021, tỷ lệ mắc ung thư mới ở Việt Nam đã tăng lên 9 bậc, xếp thứ 90/185 quốc gia. Thường gặp nhất là ung thư gan, đại trực tràng, vú, dạ dày, phổi... Do tính chất ác tính của bệnh, tác dụng phụ của hóa trị liệu và xạ trị, giá thành cao của thuốc điều trị, việc điều trị ung thư trở thành gánh nặng lớn cho bệnh nhân, gia đình và xã hội.

Tam thất (*Panax notoginseng*) từ lâu được biết đến là một dược liệu quý có tác dụng tán ứ, hoạt huyết, chỉ huyết. Nghiên cứu dược lý hiện đại đã chứng minh Tam thất hiệu quả trong hỗ trợ điều trị ung thư, rối loạn tim mạch, huyết ứ, giảm viêm, dọn gốc tự do và giảm đau... Đặc biệt, một số báo cáo cho thấy hấp rễ củ Tam thất bằng nhiệt thu được các chất chuyển hóa từ saponin chính có tác dụng tăng hoạt tính chống ung thư, tăng cường chức năng hệ miễn dịch cơ thể.

Việc nghiên cứu tác dụng theo định hướng điều trị ung thư sẽ góp phần nâng cao giá trị của Tam thất. Cho đến nay, ở nước ta chưa thấy có nghiên cứu hệ thống về các thông số trong quá trình hấp bằng nhiệt làm thay đổi hàm lượng các saponin chính và các hoạt tính hỗ trợ điều trị ung thư của Tam thất tại Tây Bắc Việt Nam. Xuất phát từ thực tế đó, luận án “**Nghiên cứu tác dụng kháng u thực nghiệm của rễ củ Tam thất (*Panax Notoginseng* (Burk.) F.H. Chen, Araliaceae) trồng ở Việt Nam trước và sau chế biến**” được tiến hành với 3 mục tiêu sau:

2. Mục tiêu của luận án

Mục tiêu 1. Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp chế biến hấp nhiệt đến hàm lượng saponin của rễ củ Tam thất.

Mục tiêu 2. Nghiên cứu tác dụng kháng u thực nghiệm của các dạng cao định lượng và một số saponin phân lập từ rễ củ Tam thất.

Mục tiêu 3. Đánh giá độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của cao định lượng sau hấp nhiệt.

3. Bố cục của luận án

Luận án gồm 161 trang, bao gồm: Đặt vấn đề (02 trang); Chương 1. Tổng quan (28 trang); Chương 2. Chất liệu, đối tượng và phương pháp nghiên cứu (28 trang); Chương 3. Kết quả nghiên cứu (67 trang); Chương 4. Bàn luận (33 trang); Kết luận (02 trang) và Kiến nghị (01 trang).

Luận án có 197 tài liệu tham khảo trong đó có 15 tài liệu tiếng Việt và 182 tài liệu tiếng Anh. Luận án có 40 bảng, 29 hình và 04 phụ lục kèm theo.

B. NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH UNG THƯ

Luận án đã tổng quan về: Tình hình ung thư trên thế giới và Việt Nam; mối liên quan giữa ung thư với đáp ứng miễn dịch; ung thư với stress oxy hóa và chống oxy hóa và hiệu quả tăng cường tác dụng của dược liệu chứa saponin hỗ trợ điều trị ung thư khi kết hợp với điều trị nền bằng các liệu pháp chính thống như hóa trị và xạ trị.

1.2. TỔNG QUAN VỀ TAM THẮT

Luận án đã tổng quan về phân loại thực vật, hóa thực vật của Tam thất được thu hái tại vùng Tây Bắc Việt Nam. Về hóa thực vật của rễ củ Tam thất, các tài liệu của y văn thế giới đã cho thấy sự biến đổi hàm lượng các saponin trước và sau khi hấp nhiệt (bằng hơi nóng). Có sự liên quan chặt chẽ về sự tăng cường tác dụng dược lý của các saponin tinh sạch thu được của Tam thất khi nguyên liệu đầu vào được

xử lý bằng phương pháp hấp nhiệt. Trong đó, chủ yếu đề cập đến các tác dụng mới được biết đến như tác dụng chống ung thư, tác dụng tăng cường miễn dịch, tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ tế bào gan... bên cạnh các tác dụng kinh điển đã được biết đến rất quen thuộc như công dụng theo Y học cổ truyền và một số nghiên cứu trong nước cũng như trên thế giới khi sử dụng Tam thất để chữa trị bệnh.

1.3. CÁC MÔ HÌNH THỰC NGHIỆM ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG KHÁNG U

Tổng quan sơ bộ về các mô hình nghiên cứu chủ yếu *in vitro* mà các tác giả trên thế giới và trong nước đã dùng để sàng lọc các nhóm hợp chất chính có tác dụng kháng ung thư.

Các mô hình nghiên cứu trên *in vivo* được y văn công nhận và đã được dùng phổ biến trong các labor thực nghiệm để đánh giá tác dụng dược lý của các hợp chất có tác dụng kháng ung thư thực nghiệm.

CHƯƠNG 2. CHẤT LIỆU, PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu nghiên cứu

2.1.1. Chuẩn hóa nguyên liệu

Dược liệu nghiên cứu là rễ củ Tam thất (*Panax notoginseng* (Burk.) F.H.) được thu hái tại Simacai, Tây Bắc Việt Nam và được xác định tên khoa học bởi Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Mẫu dược liệu được sấy khô và đo độ ẩm. Mẫu dược lưu tại Khoa Hóa thực vật - Viện dược liệu (số tiêu bản HTV2-072015 NIMM).

2.1.2. Chất liệu nghiên cứu

Từ rễ củ Tam thất xử lý đúng theo các chuyên luận của Dược điển Việt Nam V, chiết tách thu được 6 chất sạch trước và sau khi hấp bằng nhiệt; Bào chế cao định lượng giàu saponin, gọi là NP(O) và NP(H). Các mẫu này được dùng cho toàn bộ các thí nghiệm trong quá trình nghiên cứu của luận án.

2.1.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng, chủng *Swiss albino*; chuột cống trắng trưởng thành, dòng Wistar, cả hai giống, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, được

cung cấp bởi LAB chăn nuôi động vật đạt tiêu chuẩn, của Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương và của Học viện Quân y.

2.1.4. Thiết bị, hóa chất, sinh phẩm đã sử dụng

Thiết bị, dụng cụ sử dụng khảo sát ảnh hưởng của phương pháp chế biến hấp bằng nhiệt đến hàm lượng saponin của rễ củ Tam thất.

Thiết bị, dụng cụ sử dụng trong các thí nghiệm đánh giá tác dụng kháng u thực nghiệm; khảo sát độc tính cấp và bán trường diễn của các mẫu thử.

Dụng môi, hóa chất dùng trong chiết xuất và phân lập và dùng trong định lượng.

Dụng môi hóa chất dùng trong nghiên cứu *in vitro*, *in vivo*.

Kit định lượng các chỉ số hóa sinh; Dung dịch xét nghiệm huyết học; Kít định lượng các thông số miễn dịch; Các hóa chất sử dụng trong nuôi cấy tế bào; Kít và các hóa chất, dung môi chuyên dụng cho thí nghiệm.

Các chất tham chiếu trong đánh giá tác dụng thực nghiệm: Lentinan (England); Ellipticine, Taxol (Sigma, USA); Các dòng tế bào ung thư người cho thử *in vitro* các saponin tinh sạch chiết từ rễ củ Tam thất: gồm 6 loại của ATCC (USA); Dòng tế bào ung thư mô liên kết chuột Sarcoma TG180 (được cung cấp từ LAB thực nghiệm từ Italy).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp chế biến bằng hấp nhiệt đến hàm lượng saponin của rễ củ Tam thất.

* Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các saponin chính có trong các mẫu Tam thất đã qua hấp và không hấp nhiệt.

* Khảo sát sự biến đổi hàm lượng hoạt chất trong Tam thất trước và sau khi hấp ở các điều kiện khác nhau dùng HPLC.

2.2.2. Nghiên cứu tác dụng của 6 saponin phân lập từ rễ củ Tam thất và tác dụng kháng u thực nghiệm của 2 cao định lượng.

* Đánh giá *in vitro* tác dụng kháng u của 6 saponin đã phân lập được theo phương pháp Monks A và cộng sự (1991).

* Đánh giá *in vivo* khả năng gây độc tế bào và khả năng kích thích chết tế bào theo chương trình (apoptosis) của cao định lượng NP(H) trên dòng tế bào ung thư mô liên kết chuột, sarcoma TG180. Hoạt hóa và nhân nuôi dòng tế bào Sarcoma TG180. Đánh giá khả năng gây độc tế

bào của cao định lượng NP(H) trên dòng tế bào Sarcoma TG180 nuôi cấy theo phương pháp MTT. Đánh giá khả năng kích thích quá trình chết tế bào theo chương trình (apoptosis) của cao định lượng NP(H) trên dòng tế bào ung thư mô liên kết chuột sarcoma TG180.

* Gây thành công mô hình tạo khối u rắn sarcoma TG180 trên chuột theo Lapis và cộng sự. Đánh giá tác dụng ức chế phát triển u của các cao định lượng NP(H) và NP(O); hiệu lực kháng u theo Itokawa; Xác định tỷ số phát triển khối u (GR-Growth Ratio); Xác định tỷ số ức chế khối u (IR-Inhibition Ratio).

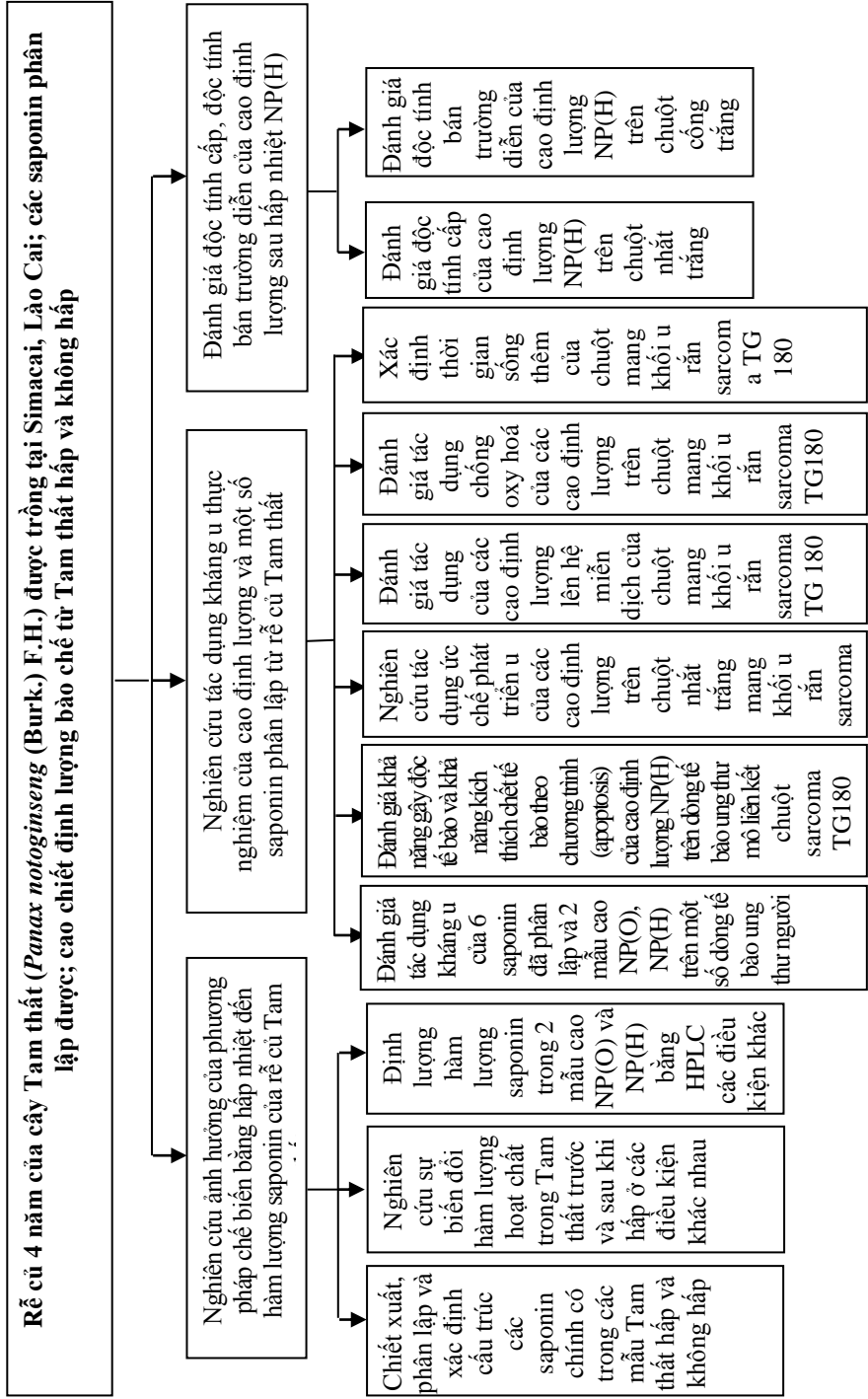
* Đánh giá tác dụng của các cao định lượng NP(H) và NP(O) lên hệ miễn dịch của chuột mang khối u rắn sarcoma TG180 theo phương pháp Stefanova T.H; Đánh giá tác dụng chống oxy hoá theo Zhao và cộng sự; Xác định thời gian sống thêm của chuột mang khối u rắn Sacoma TG 180 theo Geran và cộng sự.

2.2.3. Đánh giá độc tính cấp, bán trường diễn của cao định lượng NP(H).

* Đánh giá độc tính cấp đường uống của cao định lượng NP(H) trên chuột nhắt trắng theo quy định của Bộ Y tế Việt Nam và WHO. Các chỉ tiêu chính: Thể trạng chung của chuột, các dấu hiệu ngộ độc, số lượng chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau khi cho chuột uống thuốc và tiếp tục theo dõi tiếp trong vòng 14 ngày.

* Đánh giá độc tính bán trường diễn của cao định lượng NP(H) trên chuột cống trắng theo quy định 141 của Bộ y tế Việt Nam và của WHO; Chỉ tiêu: Thể trạng chung của chuột, các dấu hiệu ngộ độc, ít nhất 2 lần/ngày, đầu buổi sáng và cuối buổi chiều. Trọng lượng cơ thể, huyết học và sinh hóa máu chuột được đánh giá tại các thời điểm xuất phát, ngày thứ 30, 60 và 90. Vào cuối thời điểm ngày thứ 90, động vật được giết và phẫu tích để đánh giá đại thể và làm tiêu bản nhuộm HE để đánh giá vi thể mô gan, lách, thận của chuột ở các lô.

SƠ ĐỒ TỔNG THỂ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU



CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Ảnh hưởng của phương pháp chế biến đến hàm lượng saponin của rễ củ Tam thất

Tiến hành khảo sát ở các điều kiện khác nhau giữa 2 loại mẫu tươi và mẫu khô; thời gian hấp nhiệt khác nhau (sau 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 20 giờ, 24 giờ); và nhiệt độ hấp 100⁰C, 120⁰C; xác định được điều kiện hấp nhiệt tối ưu nhất: Dùng mẫu khô, hấp ở 120⁰C, trong vòng 8 giờ. Sự biến đổi hàm lượng các chất ở điều kiện hấp trên sẽ thu được hàm lượng các chất có tác dụng kháng u cao nhất.

Bảng 1. Hàm lượng 6 saponin trong 2 mẫu cao định lượng NP(O) và NP(H) (mean \pm SD)

Tên mẫu	Độ ẩm (%)	Hàm lượng saponin (%)						
		Rg1	Re	Rb1	Rh1	Rd	Rg3	Tổng
NP(O)	9,90	11,70 ^a \pm 0,16 ^b	1,81 \pm 0,01	14,89 \pm 0,18	0,30 \pm 0,01	3,23 \pm 0,08	0,38 \pm 0,01	32,32 \pm 0,41
NP(H)	6,60	ND	ND	5,30 \pm 0,07	2,57 \pm 0,12	0,83 \pm 0,03	16,16 \pm 0,07	24,62 \pm 0,20

Ghi chú: a: hàm lượng trong mẫu (%); b: độ lệch chuẩn (% , n=3), ND: không phát hiện được

Rg1: ginsenosid Rg1, Re: ginsenosid Re, Rb1: ginsenosid Rb1, Rh1: ginsenosid Rh1, Rd: ginsenosid Rd, Rg3: ginsenosid Rg3.

3.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng kháng u thực nghiệm của 6 saponin và 2 cao định lượng phân lập từ rễ củ Tam thất.

3.2.1. Tác dụng kháng u in vitro của 6 saponin và 2 cao định lượng NP(O), NP(H) trên một số dòng tế bào ung thư người.

Bảng 2. Nồng độ ức chế (IC_{50}) của 6 mẫu saponin và 2 cao định lượng NP(O), NP(H) trên 6 dòng tế bào ung thư người.

Dòng tế bào UT IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	MCF7	HepG2	HT29	RD	SK LU1	A549
Mẫu(1)Rg1	14,87 $\pm 3,20$	12,32 $\pm 3,20$	13,59 $\pm 3,20$	12,21 $\pm 3,20$	12,63 $\pm 3,20$	11,87 $\pm 3,45$
Mẫu(2)Re	12,84 \pm 3,85	11,13 $\pm 2,94$	11,85 \pm 2,17	14,79 $\pm 3,25$	6,83 $\pm 0,81$	7,92 $\pm 0,37$
Mẫu (3)Rd	8,21 $\pm 0,39$	12,57 \pm 2,151	12,34 $\pm 3,22$	9,17 $\pm 0,56$	11,95 $\pm 3,22$	12,11 $\pm 1,21$
Mẫu(4)Rb1	8,09 $\pm 0,81$	11,23 $\pm 2,48$	12,36 $\pm 2,52$	8,34 $\pm 0,37$	13,68 $\pm 1,05$	12,56 $\pm 3,81$
Mẫu(5)Rg3	5,14 $\pm 0,41$	4,54 $\pm 0,42$	5,08 $\pm 0,48$	4,44 $\pm 0,42$	9,88 $\pm 0,47$	8,01 $\pm 0,58$
Mẫu(6)Rh1	8,58 $\pm 0,59$	7,31 $\pm 0,59$	9,19 $\pm 0,82$	6,48 $\pm 0,63$	8,14 $\pm 0,45$	10,64 $\pm 0,32$
Mẫu chưa hấp NP(O)	12,57 $\pm 1,84$	12,16 $\pm 2,74$	13,21 $\pm 1,17$	11,34 $\pm 2,23$	10,41 $\pm 2,26$	10,32 $\pm 2,68$
Mẫu đã hấp NP(H)	8,89 $\pm 0,60$	9,11 $\pm 0,44$	7,03 $\pm 0,82$	11,84 $\pm 3,24$	8,57 $\pm 0,27$	7,62 $\pm 0,46$
Ellipticine/ tham chiếu (+)	0,36 $\pm 0,02$	0,41 $\pm 0,04$	0,40 $\pm 0,04$	0,45 $\pm 0,05$	0,39 $\pm 0,05$	0,33 $\pm 0,03$

Nhận xét: So sánh hoạt tính ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư người đã thử nghiệm:

- Đối với 6 saponin: Mẫu Rg3, Rh1 thu được sau hấp nhiệt có hoạt tính ức chế mạnh hầu hết các dòng TBUT với $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$; mạnh hơn 4 chất còn lại Rg1, Re, Rd và Rb1 có $IC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$.

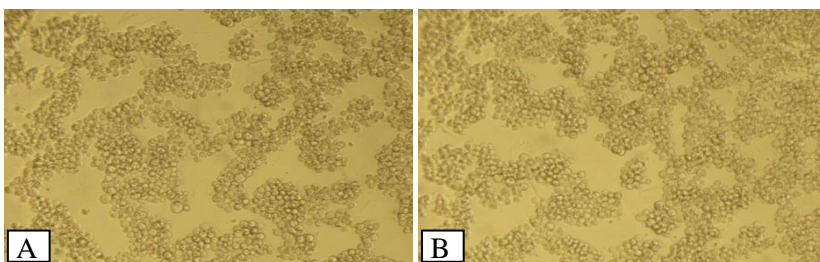
- Đối với 2 loại cao định lượng NP(O) và NP(H), kết quả cho thấy: cao định lượng NP(H) (sau khi hấp nhiệt) có hoạt tính ức chế tương đối mạnh sự phát triển của 5 dòng tế bào ung thư là HT29, HepG2, MCF7, SK LU1 và A549 đã thử với giá trị IC_{50} từ 7,03 đến 9,11 $\mu\text{g/ml}$, chỉ có một dòng TBUT là RD thể hiện hoạt tính tương yếu ở các nồng độ đã được thử với $IC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$.

Trong cùng điều kiện thử, cao định lượng NP(O) (chưa qua hấp nhiệt) thể hiện hoạt tính ức chế tương đối yếu đối với sự phát triển của 6 dòng tế bào ung thư đã được thử ở các nồng độ đã sử dụng với hầu hết các dòng TBUT đều có $IC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$.

3.2.2. Tác dụng gây độc tế bào và kích thích tế bào chết theo chương trình (apoptosis) của cao định lượng NP(H) đối với dòng TBUT mô liên kết chuột sarcoma TG180.

3.2.2.1. Cao định lượng NP(H) gây biến đổi hình thái tế bào

Sự biến đổi hình thái đặc trưng của tế bào là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá độc tính của các chất lên các tế bào ung thư nuôi cấy.



Hình 1. Hình thái tế bào Sarcoma TG180;

(A) Tế bào đối chứng sinh học.

(B) Tế bào được xử lý với dung môi 0,5% DMSO tại thời điểm 48h(VK10X15)

Tế bào Sarcoma TG180 dưới tác dụng của NP(H) tại các nồng độ thử nghiệm					
(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)
2000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	62,5 $\mu\text{g/ml}$
Tế bào Sarcoma TG180 dưới tác dụng của Taxol tại các nồng độ thử nghiệm					
(A1)	(B1)	(C1)	(D1)	(E1)	(F1)
2 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$	0,125 $\mu\text{g/ml}$	0,0625 $\mu\text{g/ml}$

Hình 2. Hình thái tế bào Sarcoma TG180 dưới tác dụng của cao định lượng NP(H) so với Taxol là đối chứng (+) tại thời điểm 48h (VK10X15)

3.2.2.2. Ảnh hưởng của cao định lượng NP(H) đối với tỷ số tăng sinh trong thử nghiệm MTS.

Bảng 3. Tỷ số tăng sinh (A%) với IC₅₀ của các mẫu Sarcoma TG180

Nồng độ chất thử (µg/ml)	Sarcoma TG180/chất thử(*)			
	NP(H)		Taxol	
	A% Lần 1	A% Lần 2	A% Lần 1	A% Lần 2
2000	14,41	13,73	23,79	20,64
1000	21,02	21,83	37,79	36,24
500	32,42	33,36	49,55	53,45
250	47,83	50,82	56,19	59,08
125	62,75	61,18	62,75	68,66
62,5	101,47	91,77	104,61	92,62
TB IC ₅₀	IC ₅₀ =206,65±10,11 (µg/ml) R ² =0,96		IC ₅₀ =0,701±0,266 (µg/ml) R ² =0,98	

3.2.2.3. Ảnh hưởng của cao định lượng NP(H) khi thử với dòng TBUT mô liên kết chuột sarcoma TG180 về khả năng kích thích chết tế bào theo chương trình (apoptosis)

Các tế bào apoptosis được nhận biết bằng test (+) với Annexin V (Annexin V-FITC+).

Bảng 4. Tỷ lệ (%) tổng số tế bào apoptosis

Lô thí nghiệm	Tỷ lệ tổng số tế bào apoptosis (%)			Tỷ lệ (%) apoptosis so với đối chứng
	Mẫu 1	Mẫu 2	Trung bình	
Chứng	4,75	3,41	4,08	100%
12h	6,13	5,91	6,02	147,55
24h	9,58	8,44	9,01	220,83
48h	10,08	8,62	9,35	229,17

Tỷ lệ (%) TB apoptosis sớm				
Chứng	1,36	1,08	1,22	100%
12h	1,89	1,90	1,90	155,74
24h	3,00	2,71	2,86	234,43
48h	3,38	3,78	3,58	293,44
Tỷ lệ (%) TB apoptosis muộn				
Chứng	3,39	2,33	2,86	100
12h	4,24	4,01	4,13	144,41
24h	6,58	5,73	6,16	215,38
48h	6,7	4,84	5,77	201,75

3.2.3. Tác dụng kháng u của các cao định lượng NP(H) và NP(O) trên chuột nhắt trắng mang khối u rắn sarcoma TG 180.

3.2.3.1. Tạo mô hình khối u sarcoma TG 180 trên chuột, các số liệu trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Trọng lượng cơ thể chuột và thể tích khối u trong 5 ngày đầu (chưa được uống các chất thử) (mean \pm SD, n =10).

Lô thí nghiệm	Trọng lượng cơ thể chuột (g)			Thể tích khối u (mm ³)	
	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 3	Ngày 5
SL	21,28 \pm 0,42	25,34 \pm 0,54	27,65 \pm 0,65	-	-
UT	21,31 \pm 0,67	25,26 \pm 1,14	27,31 \pm 1,06	303,35 \pm 44,60	527,01 \pm 73,70
LTN	21,22 \pm 0,74	24,81 \pm 0,92	26,48 \pm 1,22	289,85 \pm 38,13	516,65 \pm 82,03
NP(O)-1	21,36 \pm 0,42	25,18 \pm 0,99	26,81 \pm 1,06	299,10 \pm 28,99	519,45 \pm 55,92
NP(O)-2	21,39 \pm 0,46	24,72 \pm 0,70	26,32 \pm 1,02	293,27 \pm 29,29	508,84 \pm 63,20
NP(H)-1	21,24 \pm 0,43	24,95 \pm 0,48	26,71 \pm 0,48	296,80 \pm 33,16	522,91 \pm 71,66
NP(H)-2	21,13 \pm 0,39	24,32 \pm 0,73	26,13 \pm 1,12	288,26 \pm 46,50	524,91 \pm 60,58
p _{giữa các lô}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Trong 5 ngày đầu kể từ khi tiêm tế bào sarcoma TG 180 để gây u, chuột chưa được uống các chất thử nghiệm, TLCT chuột ở các lô tăng đều, không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Ở các lô chuột được tiêm tế bào sarcoma TG 180, từ ngày thứ 3 ở các chuột đã hình thành khối u rất rõ, TTTB khối u ở các lô đạt 288 mm³ đến 303 mm³. Các khối u phát triển nhanh, ở ngày thứ 5 TTTB khối u ở các lô đạt từ 509 mm³ đến 527 mm³.

3.2.3.2. Ảnh hưởng của cao định lượng NP(H) và NP(O) đến trọng lượng cơ thể của chuột mang khối u rắn sarcoma TG 180.

Bảng 6. Trọng lượng cơ thể chuột tại các thời điểm khi được uống các chất thử (mean \pm SD, n=10).

Lô thí nghiệm	Trọng lượng cơ thể chuột (g) tại các thời điểm							
	Ngày 7	Ngày 9	Ngày 11	Ngày 13	Ngày 15	Ngày 17	Ngày 19	Ngày 21
SL	31,09 $\pm 0,79$	34,18 $\pm 1,55$	37,62 $\pm 1,56$	41,51 $\pm 1,42$	43,36 $\pm 1,37$	44,53 $\pm 1,37$	44,96 $\pm 1,44$	45,32 $\pm 1,44$
UT	30,97 $\pm 1,22$	34,02 $\pm 1,45$	37,46 $\pm 2,28$	41,33 $\pm 2,27$	43,14 $\pm 1,95$	44,12 $\pm 1,74$	44,36 $\pm 1,63$	44,51 $\pm 1,48$
LTN	30,23 $\pm 1,43$	33,09 $\pm 1,58$	36,35 $\pm 1,55$	40,63 $\pm 1,08$	42,33 $\pm 1,06$	43,67 $\pm 1,12$	43,28 $\pm 0,99$	43,45 $\pm 1,04$
NP(O)-1	30,72 $\pm 1,36$	33,75 $\pm 1,33$	36,83 $\pm 1,48$	41,02 $\pm 1,59$	42,51 $\pm 1,68$	43,83 $\pm 1,89$	43,66 $\pm 1,95$	43,83 $\pm 1,94$
NP(O)-2	30,18 $\pm 1,46$	33,12 $\pm 0,97$	36,21 $\pm 0,89$	40,88 $\pm 0,91$	42,19 $\pm 0,94$	43,45 $\pm 1,06$	43,12 $\pm 1,08$	43,36 $\pm 1,04$
NP(H)-1	30,57 $\pm 0,97$	33,51 $\pm 0,74$	36,62 $\pm 0,82$	40,97 $\pm 1,43$	42,34 $\pm 1,38$	43,61 $\pm 1,14$	43,34 $\pm 1,03$	43,54 $\pm 1,04$
NP(H)-2	30,06 $\pm 0,81$	33,03 $\pm 0,84$	36,05 $\pm 0,86$	40,18 $\pm 1,13$	42,03 $\pm 1,08$	43,16 $\pm 1,08$	43,02 $\pm 0,97$	43,16 $\pm 1,02$
$P_{\text{giữa các lô}}$	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

3.2.3.3. Ảnh hưởng của cao định lượng NP(H) và NP(O) đến sự phát triển khối u rắn sarcoma TG 180.

Bảng 7. Thể tích trung bình khối u của chuột từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 21) (mean \pm SD, n =10).

Lô thí nghiệm	Thể tích trung bình khối u của chuột (mm ³)							
	Ngày 7	Ngày 9	Ngày 11	Ngày 13	Ngày 15	Ngày 17	Ngày 19	Ngày 21
UT (1)	858,99 \pm 196,05	1016,88 \pm 188,69	1315,94 \pm 404,59	1741,88 \pm 502,20	1963,01 \pm 464,01	2480,70 \pm 386,12	3184,01 \pm 536,99	3254,29 \pm 544,01
LTN (2)	791,00 \pm 192,47	839,37* \pm 181,94	855,70 [▲] \pm 195,11	892,00 ^Δ \pm 243,74	973,99 ^Δ \pm 287,85	1017,08 ^Δ \pm 301,38	1085,11 ^Δ \pm 314,85	1164,54 ^Δ \pm 393,88
NP(O)-1 (3)	829,00 \pm 158,76	862,00* \pm 129,21	884,00 [▲] \pm 145,67	958,98 ^Δ \pm 141,98	1157,00 ^Δ \pm 178,71	1296,02 ^{Δ†} \pm 207,68	1452,02 ^{Δ†} \pm 275,00	1507,62 ^{Δ†} \pm 273,95
NP(O)-2 (4)	771,90 \pm 165,45	837,98* \pm 153,41	890,70 [▲] \pm 152,34	938,99 ^Δ \pm 138,43	1041,86 ^Δ \pm 138,74	1247,01 ^Δ \pm 286,84	1288,02 ^Δ \pm 254,56	1316,19 ^Δ \pm 254,24
NP(H)-1 (5)	797,99 \pm 138,35	834,01* \pm 140,05	852,03 [▲] \pm 157,84	861,34 ^Δ \pm 156,57	893,57 ^{Δ□} \pm 163,48	936,99 ^{Δ□} \pm 191,89	998,99 ^{Δ□} \pm 198,23	1099,03 ^{Δ□} \pm 197,65
NP(H)-2 (6)	743,05 \pm 143,11	808,00* \pm 134,36	813,94 [▲] \pm 134,90	826,10 ^Δ \pm 153,34	858,41 ^{Δ‡} \pm 145,19	885,99 ^{Δ‡} \pm 144,08	896,00 ^{Δ‡} \pm 141,90	913,44 ^{Δ‡β} \pm 150,99

Ghi chú: *^{▲,Δ} $p < 0,05$, $p < 0,01$ và $p < 0,001$ (tương ứng) so với (1); [†] $p < 0,05$ so với (2); [□] $p < 0,01$ so với (3) và $< 0,05$ so với (4); [‡] $p < 0,001$ so với (3) và $< 0,01$ so với (4); ^β $p < 0,05$ so với (5).

3.2.3.4. Hiệu lực kháng u tại thời điểm ngày thứ 21.

Bảng 8. Hiệu lực kháng u tại ngày 21 sau gây u (n =10)

Lô thí nghiệm	Thể tích trung bình khối u tại ngày 21 (mm ³)	% ức chế u tính theo thể tích	Trọng lượng trung bình khối u tại ngày 21(g)	% ức chế u tính theo TLCT	Hiệu lực kháng u
UT (1)	3254,29 \pm 544,01	-	3,451 \pm 0,575	-	-
LTN (2)	1164,54 ^Δ \pm 393,88	64,31	1,223 ^Δ \pm 0,415	64,56	++
NP(O)-1 (3)	1507,62 ^{Δ†} \pm 273,95	53,66	1,591 ^{Δ†} \pm 0,288	53,90	+
NP(O)-2 (4)	1316,19 ^Δ \pm 254,24	59,54	1,402 ^Δ \pm 0,269	59,37	+
NP(H)-1 (5)	1099,03 ^{Δ□} \pm 197,65	66,18	1,153 ^{Δ□} \pm 0,206	66,59	++
NP(H)-2 (6)	913,44 ^{Δ‡β} \pm 150,99	72,09	0,958 ^{Δ‡β} \pm 0,160	72,24	++

Ghi chú: ^A $p < 0,001$ so với (1); [†] $p < 0,05$ so với (2); \square $p < 0,01$ so với (3) và $< 0,05$ so với (4); [¥] $p < 0,001$ so với (3) và $< 0,01$ so với (4); ^β $p < 0,05$ so với (5).

3.2.4. Ảnh hưởng của cao định lượng NP(H) và NP(O) đối với các tế bào miễn dịch trên chuột mang khối u rắn Sarcoma TG180

3.2.4.1. Số lượng và công thức bạch cầu trong máu chuột

Bảng 9. Số lượng và công thức bạch cầu chuột (mean \pm SD, n = 10).

Lô thí nghiệm	Số lượng bạch cầu (g/l)	Công thức bạch cầu				
		NEU (%)	LYM(%)	MONO (%)	EOS (%)	BASO (%)
SL (1)	7,26 \pm 1,44	74,25 \pm 5,92	19,02 \pm 1,65	4,91 \pm 0,36	0,56 \pm 0,04	0,58 \pm 0,16
UT (2)	10,14 \pm 2,90	75,53 \pm 5,26	18,61 \pm 1,80	4,75 \pm 0,62	0,51 \pm 0,05	0,62 \pm 0,17
LTN (3)	7,54 \pm 1,48	74,36 \pm 6,10	18,65 \pm 1,59	5,19 \pm 0,83	0,52 \pm 0,02	0,61 \pm 0,09
NP(O)-1 (4)	8,03 \pm 1,26	74,90 \pm 6,74	18,83 \pm 1,72	5,31 \pm 0,27	0,55 \pm 0,04	0,51 \pm 0,13
NP(O)-2 (5)	7,90 \pm 0,91	74,66 \pm 6,63	18,68 \pm 1,58	5,41 \pm 0,27	0,55 \pm 0,01	0,51 \pm 0,14
NP(H)-1 (6)	7,41 \pm 1,38	75,04 \pm 6,24	18,41 \pm 1,54	5,45 \pm 0,22	0,57 \pm 0,04	0,53 \pm 0,16
NP(H)-2 (7)	7,38 \pm 1,37	74,45 \pm 6,93	19,04 \pm 2,01	5,42 \pm 2,47	0,54 \pm 0,07	0,56 \pm 0,18
P _{giữa các lô}	$p_{2} < 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

3.2.4.2. Kết quả định lượng nồng độ IL-2 và TNF- α máu chuột

Bảng 10. Nồng độ IL-2 và TNF- α trong máu chuột (n = 10, Mean \pm SD).

Lô thí nghiệm	IL-2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
SL (1)	7,22 \pm 0,68	25,38 \pm 2,39
UT (2)	8,03 [▲] \pm 0,88	27,45 [▲] \pm 1,43
LTN (3)	9,68 ^{**Δ} \pm 1,02	30,72 ^{**Δ} \pm 2,34
NP(O)-1 (4)	8,72 ^{*Δ} \pm 0,49	28,84 ^{*Δ} \pm 1,35
NP(O)-2 (5)	8,89 ^{*Δ} \pm 0,58	29,01 ^{*Δ} \pm 1,04
NP(H)-1 (6)	9,54 ^{**Δ} \pm 0,77	31,55 ^{**Δ} \pm 3,03
NP(H)-2 (7)	9,93 ^{**Δ} \pm 0,99	31,70 ^{**Δ} \pm 2,94
P	$p_{6,7,3-4,5} < 0,05$; $p_{6,7-3} > 0,05$	$p_{6,7,3-4,5} < 0,05$; $p_{6,7-3} > 0,05$

Ghi chú: Δ p < 0,05 so với lô SL; Δ p < 0,01 so với lô SL; * p < 0,05 so với lô UT; ** p < 0,01 so với lô UT

3.2.4.3. Kết quả định lượng một số chỉ tiêu huyết học.

Bảng 11. Định lượng một số chỉ tiêu huyết học (n = 10, $\bar{x} \pm SD$).

Lô thí nghiệm	Số lượng hồng cầu (T/L)	Hb (g/L)	Hct (%)	MCV(fl)	Số lượng tiểu cầu (G/L)
SL (1)	7,74 ± 1,30	168,24 ± 16,90	44,20 ± 3,63	51,35 ± 4,51	584,81 ± 150,01
UT (2)	5,89 Δ ± 0,90	141,30 Δ ± 14,31	40,14 Δ ± 3,06	51,19 ± 4,03	838,60 Δ ± 238,85
LTN (3)	6,73* Δ ± 0,76	153,18* Δ ± 9,61	42,95* ± 2,24	51,22 ± 4,35	628,34* ± 123,89
NP(O)-1 (4)	6,66* Δ ± 0,74	153,04* Δ ± 9,92	42,89* ± 2,05	51,24 ± 3,98	619,68* ± 154,82
NP(O)-2 (5)	6,72* Δ ± 0,75	154,12* Δ ± 10,83	43,01* ± 2,38	51,27 ± 4,36	608,21* ± 136,50
NP(H)-1 (6)	7,49** ± 0,95	164,08** ± 13,02	43,68* ± 3,20	51,31 ± 3,97	603,19* ± 120,55
NP(H)-2 (7)	7,59** ± 1,06	166,14** ± 14,29	44,05* ± 3,12	51,33 ± 4,41	615,29* ± 136,70
P	p _{6,7-3,4,5} < 0,05	p _{6,7-3,4,5} < 0,05	p _{6,7-3,4,5} > 0,05	> 0,05	p _{6,7-3,4,5} > 0,05

Ghi chú: Δ p < 0,05 so với lô SL; Δ p < 0,01 so với lô SL; * p < 0,05 so với lô UT; ** p < 0,01 so với lô UT.

3.2.4.4. Kết quả trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức chuột

Bảng 12. Trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức chuột (n = 10, Mean ± SD).

Lô thí nghiệm	Trọng lượng tương đối của lách chuột (mg)	Trọng lượng tương đối của tuyến ức chuột (mg)
SL (1)	3,97 ± 0,31	1,95 ± 0,15
UT (2)	4,27 Δ ± 0,32	2,16 Δ ± 0,18
LTN (3)	4,88** Δ ± 0,35	2,66** Δ ± 0,34
NP(O)-1 (4)	4,57* Δ ± 0,29	2,35* Δ ± 0,23
NP(O)-2 (5)	4,59* Δ ± 0,26	2,37* Δ ± 0,25
NP(H)-1 (6)	4,88** Δ ± 0,26	2,63** Δ ± 0,34
NP(H)-2 (7)	4,92** Δ ± 0,27	2,71** Δ ± 0,37
p	p _{6,7,3-4,5} < 0,05; p _{6,7-3} > 0,05	p _{6,7,3-4,5} < 0,05; p _{6,7-3} > 0,05

Ghi chú: Δ p < 0,05 so với lô SL; Δ p < 0,01 so với lô SL; * p < 0,05 so với lô UT; ** p < 0,01 so với lô UT

3.2.5. Tác dụng chống oxy hóa của cao định lượng NP(H) và NP(O) trên chuột mang khối u rắn sarcoma TG 180.

3.2.5.1. Hàm lượng MDA, GSH, SOD và CAT trong gan chuột.

Bảng 13. Hàm lượng MDA, GSH, SOD và CAT ($n = 10$, mean \pm SD).

Lô thí nghiệm	Hàm lượng MDA ($\mu\text{mol/g mô}$)		Hàm lượng GSH ($\mu\text{g/g mô}$)		Hàm lượng SOD ($\mu\text{g/g mô}$)		Hàm lượng CAT ($\mu\text{g/g mô}$)	
	Mean \pm SD	p	Mean \pm SD	p	Mean \pm SD	p	Mean \pm SD	p
SL (1)	171,70 \pm 27,30	$p_{1,2} < 0,01$	31,65 \pm 5,35	$p_{1,2} < 0,01$	333,13 \pm 44,09	$p_{1,2} < 0,01$	33,04 \pm 4,42	$p_{1,2} < 0,01$
UT (2)	242,26 \pm 51,83	$p_{2,3} < 0,05$	22,63 \pm 5,41	$p_{2,3} < 0,05$	265,28 \pm 37,96	$p_{2,3} < 0,05$	26,42 \pm 3,68	$p_{2,3} < 0,05$
LTN (3)	202,44 \pm 20,67	$p_{3,1} < 0,05$; $p_{3,67} < 0,05$	27,24 \pm 2,94	$p_{3,1} < 0,05$; $p_{3,67} < 0,05$	296,99 \pm 20,15	$p_{3,1} < 0,05$; $p_{3,67} < 0,05$	30,60 \pm 2,61	$p_{3,1} < 0,05$; $p_{3,67} < 0,05$
NP(O)-1 (4)	203,64 \pm 22,74	$p_{4,5} > 0,05$; $p_{4,52} < 0,05$	26,99 \pm 3,23	$p_{4,5} > 0,05$; $p_{4,52} < 0,05$	294,75 \pm 20,26	$p_{4,5} > 0,05$; $p_{4,52} < 0,05$	29,24 \pm 2,05	$p_{4,5} > 0,05$; $p_{4,52} < 0,05$
NP(O)-2 (5)	198,58 \pm 24,15	$p_{4,51} < 0,05$; $p_{4,53} > 0,05$	27,69 \pm 2,73	$p_{4,51} < 0,05$; $p_{4,53} > 0,05$	300,11 \pm 22,13	$p_{4,51} < 0,05$; $p_{4,53} > 0,05$	29,30 \pm 1,92	$p_{4,51} < 0,05$; $p_{4,53} > 0,05$
NP(H)-1 (6)	184,29 \pm 16,86	$p_{6,7} > 0,05$; $p_{6,4} < 0,05$;	30,16 \pm 3,08	$p_{6,7} > 0,05$; $p_{6,4} < 0,05$;	319,04 \pm 26,16	$p_{6,7} > 0,05$; $p_{6,4} < 0,05$;	31,33 \pm 2,37	$p_{6,7} > 0,05$; $p_{6,4} < 0,05$;
NP(H)-2 (7)	179,65 \pm 14,44	$p_{7,5} < 0,05$; $p_{6,7,2} < 0,01$	31,21 \pm 4,40	$p_{7,5} < 0,05$; $p_{6,7,2} < 0,01$	325,64 \pm 30,68	$p_{7,5} < 0,05$; $p_{6,7,2} < 0,01$	31,89 \pm 2,51	$p_{7,5} < 0,05$; $p_{6,7,2} < 0,01$

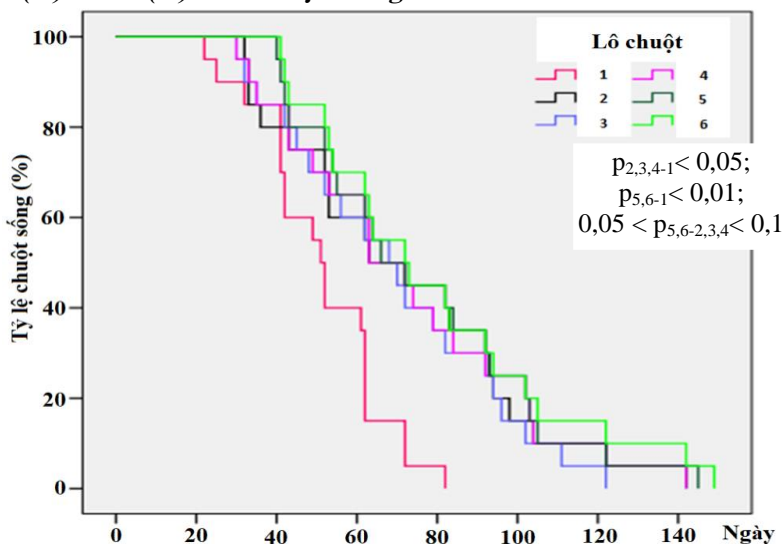
3.2.5.2. Hoạt độ các enzym ALT, AST trong máu chuột mang khối u rắn sarcoma TG180.

Bảng 14. Hoạt độ các enzym ALT, AST trong máu chuột ($n = 10$).

Lô thí nghiệm	Nồng độ ALT (U/L)		Nồng độ AST (U/L)	
	mean \pm SD	p	mean \pm SD	p
SL (1)	62,20 \pm 9,81	$p_{1,2} < 0,01$	32,80 \pm 5,22	$p_{1,2} < 0,01$
UT (2)	86,20 \pm 16,85	$p_{2,3} < 0,05$	45,40 \pm 9,11	$p_{2,3} < 0,05$
LTN (3)	71,70 \pm 7,75	$p_{3,1} < 0,05$; $p_{3,67} < 0,05$	37,70 \pm 4,06	$p_{3,1} < 0,05$; $p_{3,67} < 0,05$
NP(O)-1 (4)	72,90 \pm 8,82	$p_{4,5} > 0,05$; $p_{4,5,3} > 0,05$	38,30 \pm 4,85	$p_{4,5} > 0,05$; $p_{4,5,3} > 0,05$;
NP(O)-2 (5)	71,10 \pm 8,65	$p_{4,5,2,1} < 0,05$;	37,50 \pm 4,50	$p_{4,5,2,1} < 0,05$;
NP(H)-1 (6)	64,90 \pm 6,52	$p_{6,7} > 0,05$; $p_{6,4} < 0,05$;	34,10 \pm 3,48	$p_{6,7} > 0,05$; $p_{6,4} < 0,05$;
NP(H)-2 (7)	62,80 \pm 8,51	$p_{7,5} < 0,05$; $p_{6,7,2} < 0,01$	33,10 \pm 4,58	$p_{7,5} < 0,05$; $p_{6,7,2} < 0,01$

3.2.6. Ảnh hưởng của cao định lượng NP(H) và NP(O) đối với hình thái đại thể và vi thể của gan chuột trên chuột mang khối u rắn sarcoma TG 180 (đã được mô tả trong luận án).

3.2.7. Tác dụng kéo dài thời gian sống thêm của cao định lượng NP(H) và NP(O) trên chuột mang khối u rắn sarcoma TG 180.



Hình 3. Tỷ lệ chuột sống sót theo thời gian

* Ảnh hưởng cao định lượng đến thời gian sống trung bình và thời gian sống thêm của chuột thí nghiệm

Bảng 15. Thời gian sống trung bình và thời gian sống thêm của chuột (n = 20, mean ± SD)

Lô thí nghiệm	Thời gian sống trung bình (ngày)	Thời gian sống thêm (%)	p
UT (1)	51,25 ± 15,85	-	$p_{2,3,4-1} < 0,05$ $p_{5,6-1} < 0,01$ $p_{5,6-2,3,4} > 0,05$ $0,05 < p_{5,6-2,3,4} < 0,1$ $p_{6-5} > 0,05$
LTN (2)	72,10 ± 31,40	40,68	
NP(O)-1 (3)	69,50 ± 27,26	35,61	
NP(O)-2 (4)	72,40 ± 31,09	41,27	
NP(H)-1 (5)	75,95 ± 29,46	48,20	
NP(H)-2 (6)	79,50 ± 31,90	55,12	

Ghi chú: NP(O)-1: mức liều thấp; NP(O)-2: mức liều cao; NP(H)-1: mức liều thấp; NP(H)-2: mức liều cao.

3.3. Kết quả đánh giá độc tính của cao định lượng NP(H)

3.3.1. Độc tính cấp (LD_{50}) của NP(H)

Chưa tìm thấy LD_{50} của NP(H) theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất NP(H) có thể cho chuột uống trong 24 giờ là 6000 mg/kg thể trọng không xuất hiện độc tính cấp.

3.3.2. Độc tính bán trường diễn của NP(H)

* *Ảnh hưởng của NP(H), đối với thể trạng chung, dấu hiệu ngộ độc và trọng lượng cơ thể chuột cống:* không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về trọng lượng cơ thể chuột giữa các lô ở cùng thời điểm. Chuột ở các lô chuột có sự tăng trọng lượng tương đương nhau.

* *Ảnh hưởng của NP(H) đối với các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu)*

Khi so sánh giữa các lô, tại cùng một thời điểm nghiên cứu, giữa các thời điểm trong cùng một lô kết quả cho thấy các chỉ số: số lượng hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit và thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu máu chuột, sự khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

* *Ảnh hưởng của cao định lượng NP(H) đối với một số chỉ số sinh hóa máu (hoạt độ enzym AST, ALT)*

Ảnh hưởng của NP(H) đối với hoạt độ enzym AST và ALT, nồng độ creatinin máu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) khi so sánh giữa các lô trong cùng một thời điểm và giữa các

thời điểm khác nhau trong cùng một lô, cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$).

Ảnh hưởng của NP(H) đối với nồng độ albumin, nồng độ cholesterol máu không có sự khác nhau có ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa các lô nghiên cứu trong cùng một thời điểm, giữa các thời điểm trong cùng một lô ($p > 0,05$).

** Ảnh hưởng của cao định lượng NP(H) đối với cấu trúc đại thể và vi thể mô gan, lách, thận*

- Hình ảnh đại thể gan, lách và thận của các lô được khảo sát không có sự khác biệt khi so sánh giữa các lô thử với hình ảnh gan, lách, thận của chuột ở lô chứng .

- Hình ảnh vi thể mô gan, lách và thận:

NP(H) dùng đường uống cho chuột cống trắng với liều 200 mg/kg/24h và 900 mg/kg/24h, uống liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan, thận, lách của chuột./.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Những đóng góp mới của luận án

Quá trình xử lý nguyên liệu đầu vào là Tam thất, đã dùng phương pháp hấp nhiệt (dùng hơi nóng) để thu được 6 saponin và 2 loại cao định lượng; đây có thể coi là đóng góp mới của công trình luận án trong chế biến nguyên liệu để có được chất liệu nghiên cứu chuẩn.

Đã sử dụng các chất liệu thu được sau chế biến để tiến hành *in vitro* đối với 6 dòng TBUT; sau đó đã thử *in vivo* để khảo sát một cách toàn diện, cơ bản các tác dụng chống ung thư trên chuột. Đây là các

mô hình kinh điển hiện vẫn được áp dụng để sàng lọc các hợp chất tự nhiên trong việc đánh giá tác dụng hỗ trợ chống ung thư trong kết hợp với điều trị nền bằng các phương pháp truyền thống. Các kết quả thực nghiệm đã chứng minh được tác dụng vượt trội về tác dụng kháng u, tăng cường miễn dịch, chống oxy hóa của cao định lượng từ Tam thất đã hấp. Đây cũng có thể coi là đóng góp mới, định hướng cho việc dùng các saponin và cao định lượng trong lâm sàng sau này trong hỗ trợ điều trị ung thư khi dùng chế phẩm này kết hợp với điều trị nền bằng phương pháp kinh điển.

4.2. Ý nghĩa của luận án

Trong luận án này, lần đầu tiên một dược liệu sẵn có, đã được trồng và khai thác theo tiêu chuẩn của Việt Nam, được tiếp cận theo hướng cải tiến phương pháp chế biến tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp trong quy trình, thu được các chất tinh sạch và cao định lượng, chứa hàm lượng saponin cao, dùng làm chất liệu để nghiên cứu dược lý thực nghiệm; từ đó các kết quả thu được đã chứng minh có tác dụng tốt hơn so với các chất ban đầu; có thể coi đó là đóng góp mới cho chuyên ngành vì có khả năng áp dụng trong thực tiễn lâm sàng sau này .

Các kết quả của luận án đã chỉ ra những bằng chứng khoa học về tác dụng của 6 saponin khi xử lý qua hấp nhiệt và 2 loại cao định lượng. Đây là những bằng chứng có giá trị, qua đó có thể thấy được các chất chuyển hóa thứ cấp trong quá trình chế biến có tác dụng kháng u mạnh hơn nhiều các chất ban đầu. Điều này có ý nghĩa trên lâm sàng khi sử dụng các loại cao này dùng điều trị cho bệnh nhân bị

ung broun khi kết hợp với điều trị nền kinh điển như dùng xạ trị hay hóa trị, góp phần giảm tác dụng phụ bất lợi cho bệnh nhân thông qua việc tăng cường tác dụng của hệ miễn dịch, giúp bệnh nhân chống đỡ tốt hơn với các tác dụng độc trong quá trình điều trị, kỳ vọng quá trình hồi phục sẽ thuận lợi hơn và nhanh hơn.

Đồng thời, bằng chứng khoa học về hợp chất thứ cấp đóng vai trò quan trọng định hướng cho quá trình bào chế sau này tạo cơ sở cho việc tiêu chuẩn hóa thành phần hoạt chất trong các chế phẩm từ Tam thất thông qua quá trình chế biến dùng phương pháp hấp nóng (dùng nhiệt).

Bên cạnh đó, luận án cũng góp phần về cách tiếp cận khoa học nghiên cứu dược lý thực nghiệm khi bào chế một dược liệu theo hướng phát hiện tác dụng của các nhóm chất thứ cấp có hoạt tính dược lý mạnh hơn so với chất ban đầu có thể hình thành trong quá trình chế biến.

KẾT LUẬN

1. Ảnh hưởng của phương pháp chế biến qua hấp nhiệt đến hàm lượng saponin của rễ củ Tam thất

Từ cao n-butanol của dịch chiết MeOH 80%, đã phân lập được 4 hợp chất từ rễ củ Tam thất chưa qua hấp nhiệt là ginsenosid Rg1 (1), ginsenosid Re (2), ginsenosid Rd (3) và ginsenosid Rb1 (4) và 2 hợp chất ginsenosid Rg3 (5) và ginsenosid Rh1 (6) từ rễ củ Tam thất sau khi hấp ở 120°C trong 8h.

Khảo sát thời gian hấp, nhiệt độ hấp (100°C, 120°C), với mẫu Tam thất tươi hoặc khô, hàm lượng các saponin chính trong Tam thất

chưa xử lý qua hấp hơi nóng là Rg1, Rb1 và Rd, Re giảm dần; hàm lượng các saponin mới như Rh1 và Rg3 tăng lên rõ rệt.

Lựa chọn được điều kiện chế biến hấp nhiệt để cho hàm lượng Rh1 và Rg3 cao nhất là: mẫu khô, hấp 120°C trong 8h.

Đã bào chế hai loại cao định lượng NP(O) từ Tam thất chưa hấp và cao định lượng NP(H) từ Tam thất đã hấp, với hiệu suất chiết cao và hàm lượng saponin trong cao.

2. Tác dụng kháng u thực nghiệm của các dạng cao định lượng và một số saponin phân lập từ rễ củ Tam thất.

** Tác dụng kháng ung thư của 6 saponin đã phân lập và 2 loại cao định lượng NP(O), NP(H) trên một số dòng tế bào ung thư người.*

So sánh hoạt tính *in vitro* trên 6 dòng tế bào ung thư người HT29, HepG2, RD và MCF7, SK LU-1 và A549 hoạt tính của hai saponin Rg3 và Rh1 thu được từ Tam thất đã qua hấp nhiệt có tác dụng mạnh hơn so với 4 saponin Rg1, Re, Rd và Rb1 thu được khi nguyên liệu không qua hấp nhiệt. Hoàn toàn thể hiện cùng chiều hướng khi so sánh hoạt tính của cao định lượng qua hấp nhiệt NP(H) có tác dụng mạnh hơn cao định lượng chưa qua hấp nhiệt NP(O).

** Đã chứng minh khả năng kích thích apoptosis của cao định lượng NP(H) trên dòng tế bào ung thư mô liên kết chuột sarcoma TG180.*

- NP(H) tác dụng gây độc với tế bào Sarcoma TG180, với giá trị IC_{50} thu được: $IC_{50}=206,65\pm 10,11\mu g/ml$.

- NP(H) ở nồng độ 103,3 μg có tác dụng cảm ứng và kích thích tế bào Sarcoma TG180 chết theo chương trình apoptosis ngay từ giai

đoạn sớm thể hiện tỷ lệ dương tính rất cao: tại thời điểm 24h tăng 134,4% và 48h là 193,4%, xấp xỉ tăng 200% so với đối chứng.

** Tác dụng kháng u trên thực nghiệm in vivo*

Trên mô hình chuột mang u sarcoma TG 180, cao định lượng NP(H) có tác dụng kháng TBUT tốt làm giảm kích thước khối u, tăng cường miễn dịch, chống oxy hoá bảo vệ gan, kéo dài thời gian sống thêm của chuột mang u. Các tác dụng này của cao định lượng NP(H) đều mạnh hơn so với của cao định lượng NP(O).

3. Độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của cao định lượng NP(H)

** Độc tính cấp:* Chưa tìm thấy LD₅₀ của cao định lượng NP(H) theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24 giờ là 6000 mg/kg thể trọng đã không thể hiện độc tính cấp.

** Độc tính bán trường diễn:* Khi cho chuột cống trắng uống cao định lượng NP(H) với 2 mức liều là 200mg/kg/ngày và 900mg/kg/ngày liên tục trong 90 ngày đã không ảnh hưởng tới sự phát triển cân nặng và hoạt động của chuột, không ảnh hưởng tới các chỉ số huyết học (số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu); sinh hóa (AST, ALT, creatinin, albumin và cholesterol) và hình thái đại thể cũng như vi thể gan, lách và thận.

KIẾN NGHỊ

1. Đánh giá tác dụng của cao định lượng Tam thất đã qua hấp nhiệt trên chuột mang các dòng tế bào ung thư khác kết hợp khi điều trị nền bằng hóa chất, tia xạ hay liệu pháp miễn dịch.
2. Đánh giá tính an toàn và hiệu quả hỗ trợ điều trị ung thư của cao định lượng Tam thất đã qua hấp nhiệt trên lâm sàng.
3. Đánh giá một số tác dụng khác khi dùng cao định lượng Tam thất đã xử lý qua hấp nhiệt.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Bùi Thị Thu Hà**, Trần Thanh Hà, Nguyễn Thị Thu, Đỗ Thị Hà, Vũ Mạnh Hùng, Nguyễn Thanh Hải. Phân lập một số saponin từ rễ củ Tam thất (*Panax notoginseng*) trồng tại Việt Nam trước và sau chế biến; *Tạp chí Dược liệu*, Tập 23, số 1/2018, 3 - 10.
2. **Ha Bui Thi Thu**, Hung Vu Manh, Hai Nguyen Thanh. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Ethanol Extract from Raw and Steamed *Panax notoginseng* Roots in Sarcoma 180-Bearing Mice. *Journal of Medicinal Materials*; 2021, Vol. 26, No. 5 (311 - 316).
3. **Ha Bui Thi Thu**, Hung Vu Manh, Hai Nguyen Thanh, Tuan Nguyen Thanh Ha. Antitumor Effects of Ethanol Extract from Raw and Steaming Vietnamese *Panax notoginseng* Roots on Sarcoma 180 Tumor-Bearing Mice. *Tropical Journal of Natural Product Research*; November 2021; 5(11):1973-1978.
4. **Bùi Thị Thu Hà**, Vũ Mạnh Hùng, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Thanh Hà Tuấn. Ảnh hưởng của NP đối với một số chỉ số huyết học và miễn dịch trên chuột mang khối u rắn sarcoma TG180. *Tạp chí Sinh lý học Việt Nam*; Tập 25, số 2/2021, tháng 6/2021, 27-36.
5. **Bùi Thị Thu Hà**, Vũ Mạnh Hùng, Nguyễn Thanh Hải. Đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của NP(H) trên thực nghiệm. *Tạp chí Y Dược học Quân sự*; Tập 46, số 6/2021, 20-28.