

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

LÊ THỊ LAN PHƯƠNG

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ĐIỀU HÒA LIPID MÁU
CỦA CHẾ PHẨM TỪ BỘT SẤY PHUN ĐÀI HOA
CỦA CÂY BỤP GIẤM**

(*Hibiscus sabdariffa* L., Malvaceae)

Ngành: Dược lý – Dược lâm sàng

Mã số: 62720405

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, năm 2022

Công trình được hoàn thành tại:
Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Phương Dung

Phản biện 1:

Phản biện 2

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp
tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh vào hồi giờ ngày
tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP. HCM
- Thư viện Đại học Y Dược TP. HCM

1. Giới thiệu luận án

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Các bệnh lý do oxy hóa đang có xu hướng gia tăng trong xã hội phát triển. Trong số đó, rối loạn chuyển hóa lipid máu, nguyên nhân của các bệnh xơ vữa động mạch, bệnh mạch vành, gan nhiễm mỡ, ... có tỷ lệ ngày càng cao. Hiện nay, việc điều trị rối loạn lipid máu chủ yếu sử dụng những nhóm thuốc hóa dược như statin, fibrat, ezetimib hay thuốc ức chế PCSK9. Tuy nhiên, những nhóm thuốc này có nhược điểm là có thể gây ra tổn thương gan, viêm gan, viêm cơ hoặc những tác dụng có hại trên đường tiêu hóa; rất ít các thuốc điều trị rối loạn lipid sử dụng được trên bệnh nhân bị tổn thương chức năng gan. Vì vậy, việc tìm kiếm các liệu pháp, thuốc mới có hiệu quả và an toàn trong điều trị rối loạn chuyển hóa lipid, đồng thời có tác dụng bảo vệ gan đang là một vấn đề cấp thiết.

b. Mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu tác dụng điều hòa lipid máu của chế phẩm từ đài hoa của cây Bụt giấm (*Hibiscus sabdariffa* L., Malvaceae).

Mục tiêu cụ thể:

Xác định liều có tác dụng điều hòa lipid máu của bột sấy phun từ đài hoa của cây Bụt giấm (*Hibiscus sabdariffa* L., Malvaceae).

Xây dựng quy trình bào chế và tiêu chuẩn cơ sở, đánh giá độ ổn định của cốm Bụt giấm.

Khảo sát tác dụng của cốm Bụt giấm trên một số gen điều hòa chuyển hóa lipid: LDLR, SREBP-2, HMGCoA Reductase, AMPK.

Đánh giá tác dụng điều hòa rối loạn lipid máu và tác dụng dự phòng gan nhiễm mỡ của cốm Bụt giấm trên chuột nhắt trắng.

Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của cốm Bụt giấm trên chuột nhắt trắng.

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng: Bột sây phun đài hoa Bụt giấm (BSP) được chiết xuất từ đài hoa khô Bụt giấm (cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu Miền Trung đạt tiêu chuẩn chất lượng cơ sở).

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm.

d. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

Các kết quả nghiên cứu của luận án góp phần trong kiểm soát chất lượng các sản phẩm từ Bụt giấm qua việc xây dựng quy trình định lượng đồng thời 2 anthocyanin chính là delphinidin-3-*O*- sambubiosid và cyanidin-3-*O*-sambubiosid bằng phương pháp HPLC (đã được thẩm định về tính đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại). Đề tài đã cung cấp cơ sở về tính an toàn và hiệu quả điều trị/dự phòng của cốm Bụt giấm trên các nguyên cứu dược lý thực nghiệm gây rối loạn lipid máu, góp phần trong việc phát triển sản phẩm. Lần đầu tiên đánh giá tác động của cốm Bụt giấm đơn lẻ hay phối hợp với atorvastatin trên một số gen điều hòa chuyển hóa lipid như LDLR, SREBP-2, HMG-CoA Reductase, AMPK.

Kết quả nghiên cứu được lặp lại, được xử lý và phân tích thống kê sinh học có so sánh với chứng âm (không điều trị) và chứng dương (điều trị bằng các thuốc đối chiếu) nên kết luận có độ tin cậy khoa học. Kết quả nghiên cứu của luận án góp phần tăng giá trị sử dụng của dược liệu Bụt giấm, đồng thời tạo nền tảng cho việc phát triển sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị rối loạn lipid máu và dự phòng các bệnh lý tim mạch.

e. Bố cục của luận án

Luận án có 137 trang không bao gồm tài liệu tham khảo, gồm các

phần: Mở đầu 2 trang; tổng quan tài liệu 48 trang; đối tượng và phương pháp nghiên cứu 20 trang; Kết quả nghiên cứu 43 trang; Bàn luận 21 trang; Kết luận và kiến nghị 3 trang; 38 bảng, 32 hình và 14 phụ lục thể hiện các kết quả thực nghiệm.

2. Tổng quan tài liệu

2.1. Chuyển hóa lipid

Rối loạn lipid máu có thể được định nghĩa như sự tăng bất thường cholesterol toàn phần và LDL và/hoặc triglycerid trong máu và/hoặc sự giảm HDL. Rối loạn lipid máu có thể do di truyền (nguyên phát) hoặc do hậu quả của những bệnh khác (đái tháo đường, suy giáp, ...), do chế độ ăn, do thuốc (thứ phát). Tăng lipid máu là do tăng nồng độ lipoprotein huyết tương. Một hoặc nhiều nhóm lipoprotein có thể tích lũy trong máu do tăng sản xuất, tăng bài tiết vào tuần hoàn hoặc giảm độ thanh thải, giảm loại bỏ lipoprotein khỏi lưu thông. Trong một số trường hợp, cả hai quá trình cùng tồn tại.

Lipid là các phân tử kỵ nước không hòa tan hoặc hòa tan rất ít trong nước. Lipid trong cơ thể được phân bố trong 2 khu vực lớn là trong tế bào và trong huyết tương. Lipid trong huyết tương không lưu thông dưới dạng tự do, muốn chuyên chở, chúng phải kết hợp với các thành phần khác và được chuyên chở dưới hình thức các tiểu phân lipoprotein. Lipoprotein là các phức hợp đại phân tử được tạo thành từ hàng trăm phân tử lipid và protein. Chúng có hình cầu, phần lõi gồm triglycerid và cholesteryl ester, bao quanh là một lớp đơn gồm các phospholipid, một ít cholesterol tự do và các phân tử protein (apoprotein). Chính các phân tử protein này đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa chuyên chở lipid và chuyển hóa lipoprotein. Lipoprotein được chia làm 5 lớp tùy vào tỷ trọng là: (1) Chylomicron,

(2) VLDL: Very lowdensity lipoprotein, (3) IDL: Intermediate density lipoprotein, (4) LDL: Low density lipoprotein, (5) HDL: High density lipoprotein.

Trong quá trình vận chuyển lipid máu nội sinh, khi LDL gắn vào LDL receptor ở gan, cả 2 được đưa vào nội bào, sau đó, LDL được đưa đến lysosome còn LDLR quay trở lại bề mặt tế bào để tái sử dụng. Tại lysosom, thành phần protein của LDL là apo B100 bị thoái hóa thành acid amin hay oligopeptid; cholesterol ester bị thủy phân thành cholesterol tự do và được dùng để tổng hợp màng tế bào, hormon, acid mật, nếu dư thì cholesterol tự do lại được ester hóa để dự trữ dưới dạng những giọt nhỏ. Khi đó, những LDLR bị thoái hóa để tránh trường hợp quá tải cholesterol cho tế bào. Thời gian bán hủy của nó khá dài (2-3 ngày). Do đó, sự điều hòa thuận nghịch LDLR có vai trò rất quan trọng trong việc duy trì nồng độ cholesterol trong tế bào gan. Tuy nhiên, cholesterol được giữ trên màng tế bào còn việc tổng hợp LDLR diễn ra ở nhân. Như vậy, tồn tại một cơ chế để các thông tin được vận chuyển đến nhân và điều hòa quá trình phiên mã gen. Vào năm 1993, Yokoyama và các cộng sự đã tìm thấy được yếu tố điều hòa phiên mã rất quan trọng là Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP). Các SREBP được tổng hợp như là protein trong màng tế bào của lưới nội chất. Sau khi dịch mã trên ribosom liên kết màng, nó gắn vào Scap là một protein polytopic của màng lưới nội chất. Tại đây, diễn ra quá trình thay đổi về cấu trúc của Scap để đưa SREBP đến bộ máy Golgi, nơi SREBP được xử lý tuần tự bởi 2 protease là Site-1 Protease (S1P) và Site-2 Protease (S2P). Kết quả của quá trình này là sự phóng thích phân đoạn hoạt tính phiên mã vào nhân để hoạt hóa quá trình phiên mã gen LDLR. Scap là một cảm biến sterol, nằm ở trên màng lưới nội

chất nhạy cảm với nồng độ cholesterol trên màng. Khi cholesterol của lưới nội chất tăng vượt ngưỡng 5% tổng lượng lipid, cholesterol sẽ gắn với luminal Loop 1 của Scap. Ở phức hợp mới này, Scap gắn với Insig (một polytopic protein khác của màng lưới nội chất). Insig sẽ khóa Scap trong phức hợp này và không cho nó gắn với COPII protein để đưa SREBP vào bộ máy Golgi. Quá trình này được gọi là bẫy phức hợp Scap/SREBP trong lưới nội chất và làm giảm sự phiên mã gen LDLR. Sự phiên mã gen LDLR bị giữ ở mức thấp đến khi cholesterol trong lưới nội chất giảm xuống, phức hợp Scap/SREBP được giải phóng khỏi cholesterol và gắn trở lại với COPII protein để tiếp tục chu trình. SREBP điều hòa sự chuyển hóa lipid bao gồm SREBP-1 và SREBP-2. Trong đó, SREBP-1 có hai đồng dạng là SREBP-1a và SREBP-1c. SREBP-1a có biểu hiện cao ở các tế bào bình thường phát triển nhanh và các tế bào ung thư, nó hoạt hóa sự tổng hợp acid béo cũng như sự tổng hợp cholesterol, giúp cung cấp lượng lớn cholesterol cho màng tế bào. SREBP-1c được biểu hiện chủ yếu ở gan nơi nó hoạt hóa sự tổng hợp acid béo đáp ứng với insulin, do đó, đóng góp vào tình trạng gan nhiễm mỡ trong đái tháo đường type 2. Trong khi đó, SREBP-2 được sản xuất bởi một gen khác, và là một yếu tố hoạt hóa tương đối cụ thể của gen mã hóa LDLR và enzym sinh tổng hợp cholesterol. Tất cả ba dạng SREBP đều được xử lý qua con đường SREBP. AMPK đóng vai trò quan trọng trong điều hoà quá trình beta oxy hoá, tổng hợp acid béo và cholesterol. Sự dị hoá acid béo qua con đường beta oxy hoá dẫn đến hình thành acetyl-CoA, sau đó sẽ tham gia vào chu trình acid citric để hình thành ATP. Mặt khác, cả hai quá trình tổng hợp acid béo và cholesterol là những quá trình đồng hoá, và đều cần phải sử dụng ATP. Tổng hợp acid béo là quá trình tiêu thụ

năng lượng trong nhiều bước để hình thành acid béo từ acetyl CoA và malonyl CoA. Tương tự, cholesterol được tổng hợp từ acetyl CoA để hình thành hydroxymethylglutaryl CoA (HMGCoA). HMGCoA sau đó được chuyển thành mevalonate và tiếp theo đó được chuyển thành cholesterol thông qua con đường mevalonate.

2.2. Điều trị rối loạn lipid máu

Xử trí rối loạn lipid máu (RLLM) bao gồm thay đổi lối sống và điều trị dùng thuốc. Thay đổi lối sống là cơ bản trong điều trị RLLM. Trong số các thuốc điều trị RLLM, statin có vai trò vượt trội, là thuốc có chỉ định bắt buộc trong một số trường hợp như bệnh nhân có BTMXV lâm sàng, bệnh nhân có LDL ≥ 190 mg/dL, bệnh nhân có trong nhóm tuổi từ 40 – 75 tuổi và có đái tháo đường, nguy cơ BTMXV 10 năm $\geq 7,5\%$.

Hiện tại, có sáu loại thuốc khác nhau để giảm mức cholesterol. Trong đó, có 7 chất ức chế HMG-CoA reductase (statin) được chấp thuận để điều trị tăng cholesterol máu, có thể làm giảm mức LDL tới 60% và statin cũng có hiệu quả trong việc giảm nồng độ triglycerid ở những bệnh nhân bị tăng triglycerid máu. Tùy theo mức độ rối loạn lipid máu và mục tiêu điều trị của bệnh nhân mà có những hướng dẫn sử dụng thuốc phù hợp, tuy nhiên, nhóm thuốc được lựa chọn hàng đầu cho đến nay vẫn là statin. Statin làm giảm LDL 20 - 60%; giảm triglycerid 10 - 33%; tăng HDL 5 - 10%. Về cơ chế, statin là chất ức chế cạnh tranh của HMG-CoA reductase, dẫn đến giảm tổng hợp cholesterol trong gan. Sự ức chế tổng hợp cholesterol trong gan làm giảm cholesterol trong lưới nội chất dẫn đến sự vận chuyển của SREBP (Sterol regulatory element binding protein) từ lưới nội chất sang bộ máy golgi, nơi chúng được phân tách bởi protease thành các

yếu tố phiên mã hoạt động. Các mảnh SREBP sau đó chuyển dịch sang nhân, làm tăng sự biểu hiện của một số gen bao gồm HMG-CoA reductase và quan trọng nhất là thụ thể LDL (LDL receptor). Sự tăng biểu hiện của HMG-CoA reductase khôi phục tổng hợp cholesterol gan về bình thường, trong khi sự tăng cường biểu hiện của thụ thể LDL làm tăng số lượng thụ thể LDL trên màng tế bào gan làm tăng sự thanh thải LDL, do đó, làm giảm nồng độ LDL và triglycerid trong huyết tương. Như vậy, khi nồng độ cholesterol nội bào giảm bởi statin, sẽ làm tăng sự phiên mã của SREBP-2 để chống lại sự giảm cholesterol và do đó làm giới hạn tác dụng làm giảm cholesterol của statin. Cơ chế thứ hai giải thích cho hiện tượng này bao gồm: (1) statin làm tăng biểu hiện MicroRNA33 (miR33), một chất gây ức chế các gen khác bao gồm gen kênh vận chuyển cholesterol và phospholipid ABCA1 và ABCG1 (ATP-binding cassette, ABC); (2) thông qua việc statin làm giảm oxysterol, nó là ligand của yếu tố phiên mã LXR (liver X receptor) dẫn đến điều hoà biểu hiện của ABCA1 và ABCG1. Cả hai cơ chế này ngăn việc loại bỏ cholesterol quá mức từ màng tế bào. Có mối liên quan mạnh giữa nồng độ HDL và nguy cơ tim mạch trên dân số không sử dụng các thuốc điều hoà lipid, và điều này có liên quan đến vai trò vận chuyển cholesterol đảo ngược của HDL. Hầu hết các bệnh nhân có nguy cơ tim mạch được điều trị với statin vẫn còn hiện diện việc nồng độ HDL thấp. Cholesterol trong HDL hầu như chỉ bắt nguồn từ ABCA1, khi không có ABCA1 hoặc giảm biểu hiện và chức năng của ABCA1, nồng độ HDL trong huyết tương bị ảnh hưởng tương ứng. Các nghiên cứu cũng đã chứng minh các statin làm giảm biểu hiện của ABCA1 ở mô gan và mô ngoại biên *in vitro*, trong đó atorvastatin làm giảm biểu hiện mRNA ABCA1 và ABCG1. Sử dụng

statin mạn tính làm tăng PCSK9 và làm giới hạn hoạt tính của LDLR và giảm hiệu quả của statin. Cơ chế là do statin làm tăng sự hoạt hoá SREBP-2 và tăng biểu hiện của HNF1a. Điều trị với statin đơn độc làm tăng 45% nồng độ PCSK-9, nếu kết hợp thêm với ezetimibe làm tăng nồng độ PCSK-9 lên 77% ở người có tăng cholesterol máu. Statin hoạt hoá AMPK dẫn đến apoptosis và ức chế sự sinh tồn của tế bào ung thư. Statin hoạt hoá AMPK từ đó hoạt hoá men nitric oxide synthase tế bào nội mô (eNOS), thúc đẩy sinh mạch máu, kháng viêm, kháng xơ hoá, và kháng phì đại. Nghiên cứu cho thấy atorvastatin làm phosphoryl hoá và hoạt hoá AMPK và làm tăng eNOS. Statin làm giảm tích tụ mỡ ở gan và có thể ứng dụng trong điều trị bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD). Statin hoạt hoá AMPK dẫn đến ức chế men acetyl CoA carboxylase, một men chính trong việc hình thành lipid cũng như điều hoà chuyển hoá acid béo ở gan trong quá trình điều hoà các chất chứa trong ty thể và chức năng ty thể. Atorvastatin được chứng minh làm ức chế sự tiến triển NAFLD thông qua thúc đẩy con đường tín hiệu AMPK trong mô hình gây NAFLD bằng chế độ ăn giàu chất béo. Statin ngăn ngừa sự thoái hoá thần kinh do phản ứng viêm thần kinh. Cơ chế thông qua việc statin làm giảm sự tự thực bào (autophagy) dẫn đến hiệu quả bảo vệ thần kinh. Sự tích tụ các amyloid β ($A\beta$) dẫn đến tăng hoạt hoá của Tau protein và gây chết tế bào thần kinh. Điều này có thể do hiện tượng đề kháng insulin của thần kinh, hiện tượng khoá dòng thác Akt, và hoạt hoá glycogen synthase và gây apoptosis tế bào thần kinh. Statin làm giảm sự đề kháng insulin, tăng con đường Akt, ức chế sự phosphoryl hoá quá mức của Tau do men glycogen synthase kinase-3 β dẫn đến làm giảm sự apoptosis tế bào thần kinh do tích tụ $A\beta$.

Hiện nay, các thuốc có nguồn gốc thảo dược được sử dụng khá phổ biến trên toàn thế giới để điều trị rối loạn lipid máu, với mong muốn làm tăng hiệu quả điều trị, giảm độc tính của thuốc và giảm chi phí điều trị cho bệnh nhân. Trong những thập niên gần đây, hàng trăm thuốc thảo dược đã được báo cáo có hiệu quả trong điều trị và dự phòng tăng lipid máu dưới các dạng bào chế khác nhau như hợp chất, dịch chiết của một loại dược liệu hay công thức phối hợp (bài thuốc). Ở Trung Quốc, hiện đã có hơn 50 bài thuốc cổ truyền được chấp thuận cho sử dụng để điều trị tăng lipid máu.

2.3. Bụp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L., Malvaceae)

Bụp giấm có tên khoa học là *Hibiscus sabdariffa* L., thuộc họ Bông Malvaceae, còn được gọi là hibiscus, roselle, red sorrel hay karkadeh. Cây một năm, cao 1,5 - 2 m, phân nhánh gần gốc, màu tím nhạt. Lá hình trứng, nguyên, mép lá có răng cưa. Hoa đơn độc, mọc ở nách, gần như không có cuống. Tròng hoa màu vàng, hồng hay tím, có khi trắng. Quả nang hình trứng, có lông thô mang đài màu đỏ sáng tồn tại bao quanh quả. Ra hoa tháng 7 - tháng 10. Bộ phận dùng: Lá, hạt, đài hoa. Cả lá và đài hoa Bụp giấm đều chứa nhiều acid và protein; các acid chính tan trong nước là acid citric, acid malic, acid tartric, acid hibiscus. Hàm lượng anthocyanin trong dịch chiết còn 100% là ít nhất, 1,23 mg/g; trong khi đó, hàm lượng tìm thấy trong dịch chiết còn 50% và dịch chiết nước lần lượt là 3,83 mg/g và 3,22 mg/g. Đài hoa của Bụp giấm được sử dụng nhiều nhất do có chứa nhiều các acid hữu cơ, vitamin C và đặc biệt là anthocyanin với hàm lượng đạt 1,5g/kg đài hoa khô, trong đó, delphinidin và cyanidin là hai anthocyanin chính chiếm gần 71% và 29%. Theo nghiên cứu của Edgar Vinicio Villalpando-Arteaga và các cộng sự, năm 2013, phân tích dịch chiết

nước đài hoa Bụp giấm có thành phần chính là các anthocyanin như delphinidin-3-sambubiosid và cyanidin-3-sambubiosid, cùng với sự hiện diện của một số flavonoid như quercetin, luteolin và dạng glycosid của chúng, acid chlorogenic, gossypetin, hibiscetin, polyphenol và một vài acid phenolic.

Bụp giấm có khả năng làm giảm lipid, giúp phòng ngừa các bệnh tim mạch. Các dịch chiết (dịch chiết nước và cồn của đài hoa hoặc lá) có thể làm giảm lipoprotein cholesterol tỷ trọng thấp (LDL), triglycerid (TG), cholesterol toàn phần (TC) và giảm sự peroxid hóa lipid trên *in vivo*. Một vài nghiên cứu còn cho thấy dịch chiết Bụp giấm làm giảm lipoprotein cholesterol tỷ trọng rất thấp (VLDL) và làm tăng nồng độ trong huyết tương của lipoprotein cholesterol tỷ trọng cao (HDL). Bụp giấm cũng làm giảm sự hình thành, ức chế sự di chuyển tế bào bọt và giảm sự vôi hóa của tế bào cơ trơn trong mạch máu của thỏ. Tác dụng làm giảm LDL có thể liên quan đến sự ức chế tổng hợp triacylglycerol hoặc thông qua khả năng chống oxy hóa, chống lại sự phá hủy do quá trình oxy hóa LDL và sự thanh thải LDL ở gan. Một vài nhóm hợp chất trong dịch chiết như anthocyanin và acid protocatechuic có thể liên quan đến tác dụng này của Bụp giấm. Kết quả nghiên cứu của Mon-Yuan Yang và các cộng sự nghiên cứu trên giống chuột hamster vào năm 2010 cho thấy, các polyphenol trong Bụp giấm, ức chế quá trình tạo mỡ và thúc đẩy sự thanh thải lipid ở gan). Trong nghiên cứu lâm sàng tiến hành năm 2007, sử dụng viên nang chứa cao chiết hoa Bụp giấm đường uống cho tác dụng giảm nồng độ cholesterol trong huyết thanh sau 4 tuần sử dụng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng 2 viên trong mỗi bữa ăn cho kết quả tốt nhất với liều sử dụng là 2 viên (tương đương 1 g), uống 3 lần 1 ngày

(tổng cộng 3 g/ngày). Nhiều nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* trong những năm từ 1997 đến 2011 đều cho thấy dịch chiết Bụp giấm có tác dụng chống oxy hóa. Polyphenol trong số những anthocyanin, cụ thể như delphinidin-3-glucosid và acid protocatechuic là những hợp chất quan trọng góp phần vào khả năng chống oxy hóa của Bụp giấm. Bên cạnh đó, dịch chiết nước đài hoa Bụp giấm (100 - 800 mg/kg) cho thấy khả năng bảo vệ gan trên một số mô hình gây độc gan như gây tổn thương gan bằng tert-butylhydroperoxid, lipopolysaccharid, azathioprim, carbon tetrachlorid, cadmium, ammonium chlorid, acetaminophen hay bức xạ trên *in vitro* và *in vivo*, làm giảm độc tính của acetaminophen trên gan chuột cống Wistar thông qua việc làm giảm số tế bào chết và sự oxy hóa tế bào. Theo nghiên cứu của Edgar Vinicio Villalpando-Arteaga và các cộng sự (2013), dịch chiết nước đài hoa Bụp giấm (với thành phần chính là các anthocyanin như delphinidin-3-sambubiosid và cyanidin-3-sambubiosid) làm giảm gan nhiễm mỡ thông qua cơ chế điều hòa của PPAR- γ và SREBP-1c trên chuột nhắt gây béo phì bằng chế độ ăn. Dịch chiết nước đài hoa Bụp giấm và acid protocatechuic (5 mg/ml) ức chế sự phát triển của các chủng *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, kháng khuẩn chống lại *Streptococcus mutans*, vi khuẩn gây bệnh tử khoang miệng với nồng độ ức chế tối thiểu là 2,5 mg/ml; ở nồng độ 96 - 152 μ g/ml, Bụp giấm có tác dụng kháng chủng *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* và *Campylobacter fetus*). Dịch chiết nước đài hoa Bụp giấm tươi, dịch chiết ethanol và acid protocatechuic có tác dụng ức chế sự phát triển của các vi khuẩn *Salmonella typhimurium* DT104, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* và *B. cereus*.

3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

3.1 Đối tượng nghiên cứu

Bột sấy phun đài hoa Bụp giấm (BSP) được chiết xuất từ đài hoa khô Bụp giấm, cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu Miền Trung (đạt tiêu chuẩn chất lượng cơ sở).

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino*, 5 - 6 tuần tuổi, trọng lượng 18 - 22 g, được cung cấp bởi Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh.

Dòng tế bào Hep G2 do ATCC (Hoa Kỳ) cung cấp, được nuôi cấy trong môi trường E'MEM có bổ sung L-glutamin (2 mM), HEPES (20 mM), amphotericin B (0,025 µg/ml), penicillin G (100 UI/ml), streptomycin (100 µg/ml), 10% (v/v) huyết thanh bào thai bò FBS và ủ ở 37 °C, 5% CO₂.

3.2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định liều có tác dụng điều hòa lipid máu của bột sấy phun (BSP) từ đài hoa Bụp giấm bằng mô hình gây rối loạn lipid máu nội sinh sử dụng tyloxapol 500mg/kg tiêm phúc mô (i.p.). Đánh giá tác dụng của BSP ở các mức liều 15 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg, 60 mg/kg, 75 mg/kg, 90 mg/kg. Đối chứng là fenofibrat 50 mg/kg. Định lượng nồng độ triglycerid sau 6 giờ tiêm tyloxapol để chọn chuột đưa vào thử nghiệm. Định lượng lipid máu (cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL, LDL) sau 48 giờ tiêm tyloxapol đánh giá tác dụng.

Dạng bào chế được xác định để bào chế chế phẩm từ nguyên liệu BSP là dạng cốm hòa tan. Phương pháp bào chế cốm được khảo sát tại phòng thí nghiệm bao gồm: (1) phương pháp xát hạt khô với tá dược độn lactose khan, tá dược điều vị aspartam 0,5%, tá dược trơ talc 1%, (2) phương pháp xát hạt ướt với tá dược độn manitol, tá dược điều vị aspartam 0,5%. Sau khi khảo sát tại phòng thí nghiệm, sẽ chọn

ra công thức đạt được yêu cầu về độ ẩm và mùi vị để đưa vào bào chế thử nghiệm.

Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của cốm Bụp giấm theo hướng dẫn của Dược điển Việt Nam V về các tiêu chí: Cảm quan, độ ẩm, độ đồng đều khối lượng, độ tan. Định tính sự hiện diện của nhóm anthocyanin bằng phản ứng hóa học và bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng với vết đối chiếu là nguyên liệu đài hoa Bụp giấm. Định lượng đồng thời delphinidin-3-*O*-sambubiosid và cyanidin-3-*O*-sambubiosid trong cốm Bụp giấm bằng phương pháp HPLC. Thẩm định quy trình định lượng về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng.

Đánh giá độ ổn định của cốm Bụp giấm theo hướng dẫn ASEAN về nghiên cứu độ ổn định của thuốc 6.0, 2013. Ở điều kiện bảo quản cấp tốc, thử nghiệm ở 3 thời điểm: Ban đầu (T_0), 3 tháng và 6 tháng. Nếu có “biến đổi đáng kể” nào xảy ra trong vòng 3 đến 6 tháng khi thử nghiệm ở điều kiện lão hóa cấp tốc, thì tuổi thọ dự kiến được dựa trên các số liệu thu được khi bảo quản ở điều kiện dài hạn.

Khảo sát nồng độ gây độc tế bào của cốm Bụp giấm trên Hep G2 bằng phương pháp SRB (Sulforhodamin B) với chứng (+) là Camptothecin, chứng (-) là tế bào chỉ nuôi trong môi trường không có chất thử nghiệm, đối chứng là mẫu cảm ứng với dung môi pha mẫu ở nồng độ tương đương với mẫu. IC_{50} được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism với phương pháp hồi quy không tuyến tính đa thông số và $R^2 > 0.9$.

Đánh giá sự tác động của cốm Bụp giấm lên biểu hiện gen LDLR, SREBP2, HMGCoA Reductase, AMPK. Tế bào Hep G2 được phủ lên đĩa nuôi cấy 100 mm với mật độ $1,7 \times 10^6$ tế bào/đĩa. Sau 24 h nuôi, tế bào

được cảm ứng với BG nồng độ 1000 µg/ml, LP 10 µg/ml, phối hợp BG + LP ở nồng độ 250/2,5 µg/ml và với đối chứng tế bào cảm ứng với nước nồng độ 2%. Sau 24 h và 48 h, tế bào được thu nhận. RNA tổng số được tách chiết bằng kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Z3100) theo hướng dẫn của kit. RNA được chuyển thành cDNA bằng kit SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, BIO-65054) theo hướng dẫn của kit. Phản ứng PCR được thiết lập như sau: Mỗi 440 nM (PDH Bio), Master mix 1X(Solgent) Evagreen 0,25X (GAPDH, SREBP-2) hoặc 0,125X (LDLR) (Biotium), cDNA 1 µg. Chu trình nhiệt: 95 °C – 5 phút, lặp lại 45 chu kì của các bước 95 °C-30s, 57 °C-30s, 72 °C-30s, và 72 °C – 5 phút. Phân tích đường cong nóng chảy từ 65 °C – 95 °C, 10 giây/1 °C. Gen chúng nội là GAPDH. Số lần thay đổi biểu hiện tương đối được tính theo công thức $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Đánh giá tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của cốm Bụp giảm trên chuột nhắt tăng lipid máu nội sinh bằng tyloxapol. Tiến hành tiêm phúc mô (i.p.) tyloxapol 500 mg/kg, 0,1 ml/10 g cho tất cả chuột. Định lượng triglycerid máu sau 6 giờ tiêm tyloxapol, chọn những chuột có triglycerid máu tăng 3 - 5 lần so với ban đầu và chia ngẫu nhiên thành 3 lô (n = 10): (1) Lô không điều trị (bệnh lý) uống nước cất, (2) lô chứng dương: Uống fenofibrat 50 mg/kg, (3) lô thử nghiệm uống cốm Bụp giảm. Định lượng nồng độ lipid máu (cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL, LDL) bằng phương pháp đo quang sau 48 giờ tiêm tyloxapol.

Đánh giá tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của cốm Bụp giảm trên chuột nhắt tăng lipid máu ngoại sinh bằng dung dịch giàu lipid. Chuột thử nghiệm được cho uống dung dịch giàu lipid (cholesterol 25 mg, acid cholic 1%, dầu thực vật vđ 10 ml) mỗi ngày với thể tích 0,1

ml/10g chuột trong 8 tuần. Lấy máu chuột xét nghiệm lại các thông số lipid, chọn những chuột bị rối loạn lipid máu (có triglycerid và/hoặc LDL tăng có ý nghĩa thống kê so với ban đầu) chia ngẫu nhiên thành 3 lô (n = 8): (1) lô không điều trị (bệnh lý) uống nước cất, (2) lô chứng dương uống atorvastatin 10 mg/kg, (3) lô thử nghiệm uống cốm Bụp giám liều tối ưu. Định lượng nồng độ lipid máu (cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL, LDL) sau 1 tuần điều trị.

Đánh giá tác dụng dự phòng rối loạn lipid máu của cốm Bụp giám trên mô hình tăng lipid máu ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid: Chuột thử nghiệm được chia ngẫu nhiên thành 4 lô (n = 8): (1) cho uống nước cất sáng, chiều (lô chứng), (2) cho uống dung dịch giàu lipid buổi sáng, nước cất buổi chiều (lô bệnh lý), (3) cho uống dung dịch giàu lipid buổi sáng, atorvastatin 10 mg/kg buổi chiều (lô đối chứng), (4) cho uống dung dịch giàu lipid buổi sáng, cốm BG liều tối ưu buổi chiều (lô thử nghiệm). Định lượng nồng độ lipid máu (cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL, LDL) sau 6 tuần thử nghiệm.

Đánh giá tác dụng dự phòng gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD) của cốm Bụp giám: Hỗn hợp giàu lipid được chuẩn bị gồm các thành phần sau: Cholesterol 25 mg, acid cholic 1%, dầu dừa 20 ml, NaCMC 1% được sử dụng làm chất nhũ hóa. Chia chuột ngẫu nhiên làm 4 lô (n = 7). Lô 1 cho uống nước cất sáng, chiều trong suốt thời gian thử nghiệm, chế độ ăn bình thường. Các lô chuột còn lại được cho uống dung dịch giàu lipid trong 4 tuần. Buổi chiều, lô 2 uống atorvastatin (Ator) 10 mg/kg, lô 3 uống cốm Bụp giám (BG) liều tối ưu, lô 4 uống atorvastatin kết hợp với cốm Bụp giám. Cuối thí nghiệm, xét nghiệm các thông số lipid máu (cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL, LDL),

enzym gan (AST, ALT), glucose huyết tương, lấy mẫu gan soi vi thể xác định mức độ thoái hóa mỡ.

Đánh giá độc tính cấp của cốm Bụp giấm trên chuột nhắt trắng: Đường dùng thuốc là đường uống (p.o.). Thể tích dùng thuốc 20 ml/kg. Thực hiện qua 2 giai đoạn: (1) giai đoạn thăm dò (mỗi lô dò liều là 6 chuột, 50% đực, 50% cái), (2) giai đoạn xác định (mỗi lô 10 - 20 chuột, 50% đực, 50% cái). Mỗi nhóm dùng một liều tính theo kg thể trọng, bắt đầu từ liều tối đa có thể cho chuột thử nghiệm uống và giảm dần. Theo dõi các lô thật chặt chẽ trong 72 giờ đầu sau khi dùng thuốc. Sau đó nếu thấy cần thiết thì theo dõi trong suốt 2 tuần tiếp theo. Kết quả được đánh giá dựa vào phản ứng toàn ứng hoặc bất ứng (sống hay chết) nhận thấy được ở mỗi chuột trong nhóm. Xác định LD₅₀ (nếu có) theo công thức Karber-Behrens.

Đánh giá độc tính bán trường diễn của cốm Bụp giấm trên chuột nhắt trắng theo hướng dẫn: General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine – WHO. Chia ngẫu nhiên chuột nhắt trắng đạt yêu cầu thành 4 lô, mỗi lô 20 con (10 đực, 10 cái), cho uống với thể tích 0,1 ml/10 g thể trọng vào lúc 8 – 9 giờ sáng, liên tục 12 tuần. Các lô thử nghiệm: (1) lô chứng uống nước cất, (2) lô thử 1 uống thuốc cốm liều tối ưu, (3) lô thử 2 uống thuốc cốm liều gấp đôi liều lô thử 1, (4) lô thử 3 uống thuốc cốm liều gấp 10 lần liều tối ưu. Các thông số đánh giá hàng tuần: Hành vi (tăng đi lại, giảm đi lại, nằm im, run rẩy, co giật); lông (mượt, rụng...), biểu hiện của các cơ quan; cân nặng, tính chất phân, nước tiểu. Mức độ ăn, uống được đánh giá tại thời điểm ban đầu, sau 6 tuần và sau 12 tuần bằng cách nhốt riêng mỗi chuột vào lồng chuyển hóa, cho chuột làm quen lồng trong ngày thứ nhất, cân lượng cám và lượng nước uống đã sử dụng

trong 24 giờ tiếp theo. Sau 6 tuần thử nghiệm, tiến hành lấy máu đuôi chuột và xét nghiệm đánh giá các thông số: Sinh hóa (AST, ALT, cholesterol toàn phần, triglycerid máu, creatinin huyết, acid uric, glucose), huyết học (số lượng hồng cầu - RBC, hematocrit - HCT, hemoglobin - HGB, số lượng hemoglobin trung bình - MCH, nồng độ hemoglobin trung bình - MCHC, thể tích trung bình của hồng cầu - MCV, số lượng bạch cầu - WBC, số lượng tiểu cầu - PLT). Sau 12 tuần thử nghiệm, tiến hành lấy máu đuôi chuột và xét nghiệm đánh giá các thông số sinh hóa, huyết học. Gây mê, mổ quan sát các cơ quan gan, thận, tim, lách, phổi, dạ dày, ruột. Xét nghiệm vi thể gan, thận (lấy ngẫu nhiên 50% số động vật).

Phương pháp thống kê, xử lý số liệu

Tất cả dữ liệu được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm sai số chuẩn ($M \pm SD$). Dùng phép kiểm Mann Whitney một chiều một yếu tố so sánh sự khác biệt giữa các lô và Wilcoxon signed-rank so sánh sự khác biệt đầu - cuối trong cùng một lô, phần mềm STADA và Microsoft Excel 2017 để thống kê dữ liệu và vẽ đồ thị.

4. Kết quả

4.1. Xác định liều có tác dụng điều hòa lipid máu của bột sấy phun từ đài hoa của cây Bụt giấm

Sau 48 giờ tiêm tyloxapol gây rối loạn lipid ở chuột nhắt, so với lô bệnh lý không được điều trị, BSP sử dụng đường uống, liều 15 mg/kg chuột nhắt không làm giảm các thông số lipid máu, BSP sử dụng đường uống liều 30 mg/kg chuột nhắt làm giảm cholesterol toàn phần 11% ($p = 0,0065$) và làm giảm LDL 65% ($p = 0,0039$), BSP sử dụng đường uống liều 45 mg/kg chuột nhắt làm giảm LDL 42% ($p = 0,0374$), BSP sử dụng đường uống liều 60 mg/kg chuột nhắt không

làm giảm các thông số lipid máu, BSP sử dụng đường uống liều 75 mg/kg chuột nhất làm giảm LDL 35% ($p = 0,0374$), BSP sử dụng đường uống liều 90 mg/kg chuột nhất làm giảm cholesterol toàn phần 9% ($p 0,025$) và làm giảm LDL 56% ($p = 0,0104$). Như vậy, liều có tác dụng điều hòa rối loạn lipid máu tốt nhất của bột sây phun từ đài hoa bụp giấm (BSP) trong khoảng liều từ 15 mg/kg đến 90 mg/kg chuột nhất là 30 mg/kg chuột nhất.

4.2. Xây dựng quy trình bào chế, tiêu chuẩn cơ sở và độ ổn định của cốm Bụp giấm từ Bột sây phun đài hoa Bụp giấm

Từ kết quả khảo sát các công thức trong phòng thí nghiệm, chọn được công thức tối ưu là công thức số 6 của quy trình sát hạt ướt với ưu điểm cho khối bột đồng đều, hạt cốm đều, mùi vị tốt, sau khi sây khô đạt được độ ẩm $< 5\%$. Tiến hành bào chế quy mô phòng thí nghiệm 3 lô, mỗi lô 2000 sản phẩm.

Cốm Bụp giấm (BG) có dạng hạt nhỏ, xộp, khô, màu đỏ, đồng đều về hình dạng và màu sắc. Không có hiện tượng hút ẩm, không bị mềm và biến màu. Đạt yêu cầu của DĐVN V về độ ẩm, độ đồng đều khối lượng và độ tan. Định tính bằng phản ứng hóa học và sắc ký lớp mỏng đạt yêu cầu. Cốm Bụp giấm có chứa 2,47 mg (0,12%) delphinidin-3-*O*-sambubiosid và 0,67 mg (0,03%) cyanidin-3-*O*-sambubiosid. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng đồng thời delphinidin-3-*O*-sambubiosid và cyanidin-3-*O*-sambubiosid trong cốm Bụp giấm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) cho thấy độ tin cậy cao từ cách xử lý mẫu đến điều kiện phân tích, đảm bảo tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng.

Độ ổn định: Sau 3 tháng lưu ở điều kiện lão hóa cấp tốc, cốm Bụp giấm đã có những “biến đổi đáng kể”, biến đổi về hình thức cảm quan

và hàm lượng hoạt chất. Do đó, tuổi thọ của Búp giấm cần được xác định ở điều kiện bảo quản thường. Sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ thường, cốm Búp giấm vẫn giữ nguyên tình trạng ban đầu về các chỉ tiêu cảm quan, độ ẩm, định lượng hoạt chất delphinidin-3-*O*-sambubiosid và cyanidin-3-*O*-sambubiosid (thay đổi trong giới hạn cho phép). Dự kiến tuổi thọ của thuốc: $Y = X + 3 \text{ tháng} = 15 \text{ tháng}$ (Y: Tuổi thọ đề xuất; X: Khoảng thời gian của dữ liệu thực).

4.3. Tác dụng của cốm Búp giấm trên một số gen điều hòa chuyển hóa lipid

Nồng độ được chọn cho các thử nghiệm tiếp theo đối với cốm Búp giấm là 1000 $\mu\text{g/mL}$, với Lipistad là 10 $\mu\text{g/mL}$, liều mẫu phối hợp BG và LP là 250/2,5 $\mu\text{g/mL}$. Đây được xem là nồng độ cao nhất của mẫu không gây chết tế bào Hep G2.

Kết quả kiểm tra đường cong nóng chảy đều chỉ xuất hiện một đỉnh nóng chảy chứng tỏ chỉ có 1 sản phẩm, không có sản phẩm kí sinh, chứng tỏ môi là đặc hiệu. Kết quả được xác định ở các thời điểm 24h và 48h sau khi cảm ứng BG, LP và phối hợp BG và LP. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần lặp sinh học, mỗi phản ứng PCR lặp lại 2 lần kỹ thuật.

Đối với gen LDLR, sau 24 giờ cảm ứng, cả BG, LP và mẫu phối hợp BG + LP đều làm tăng biểu hiện gen, trong đó, LP làm tăng biểu hiện nhiều nhất (2 lần). Tuy nhiên, sau 48 giờ cảm ứng, BG làm tăng biểu hiện gen LDLR đến 2,22 lần, đồng thời, mẫu phối hợp làm tăng cao nhất 3,51 lần.

Đối với gen SREBP-2, sau 24 giờ cảm ứng, cả 3 mẫu đều làm tăng biểu hiện gen, với mẫu phối hợp làm tăng cao nhất, đạt 4,72 lần. Tuy nhiên, sau 48 giờ, mẫu LP làm tăng biểu hiện cao hơn, đạt 4,23 lần.

Đối với gen HMGCoA, sau 24 giờ và 48 giờ cảm ứng, chỉ có mẫu LP và mẫu phối hợp BG với LP làm tăng biểu hiện gen.

Đối với gen AMPK, cả 3 mẫu đều làm tăng biểu hiện gen, trong đó, tăng cao nhất là mẫu phối hợp BG với LP, đạt 3,34 lần. Sau 48 giờ, chỉ có mẫu BG và mẫu phối hợp còn làm tăng biểu hiện gen.

So với mẫu đối chứng, mẫu cốm BG ở nồng độ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 24 giờ cảm ứng gen, làm tăng biểu hiện LDLR 0,87 lần, tăng biểu hiện SREBP-2 0,88 lần, giảm biểu hiện HMGCoA 0,08, tăng biểu hiện AMPK 0,11 lần. Sau 48 giờ cảm ứng gen làm tăng biểu hiện LDLR 1,22 lần, tăng biểu hiện SREBP-2 1,53 lần, giảm biểu hiện HMGCoA 0,28, tăng biểu hiện AMPK 0,52 lần.

So với mẫu đối chứng, mẫu Lipistad ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 24 giờ cảm ứng gen, làm tăng biểu hiện LDLR 1,0 lần, tăng biểu hiện SREBP-2 3,66 lần, tăng biểu hiện HMGCoA 1,64 lần, tăng biểu hiện AMPK 0,77 lần. So với mẫu đối chứng, mẫu Lipistad ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 48 giờ cảm ứng gen làm tăng biểu hiện LDLR 0,48 lần, tăng biểu hiện SREBP-2 3,23 lần, tăng biểu hiện HMGCoA 1,27, giảm biểu hiện AMPK 0,24 lần.

So với mẫu đối chứng, mẫu phối hợp BG + LP ở nồng độ 250/2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 24 giờ cảm ứng gen, làm tăng biểu hiện LDLR 0,37 lần, tăng biểu hiện SREBP-2 3,72 lần, tăng biểu hiện HMGCoA 0,41 lần, tăng biểu hiện AMPK 2,34 lần. So với mẫu đối chứng, mẫu phối hợp BG + LP ở nồng độ 250/2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 48 giờ cảm ứng gen làm tăng biểu hiện LDLR 2,51 lần, tăng biểu hiện SREBP-2 2,03 lần, tăng biểu hiện HMGCoA 0,85, tăng biểu hiện AMPK 0,16 lần.

4.4. Tác dụng điều hòa lipid máu và dự phòng gan nhiễm mỡ không do rượu của cốm Bụp giấm

Tác dụng điều hòa lipid máu của cốm Bụp giấm trên chuột nhất gây rối loạn lipid máu nội sinh bằng tyloxapol

Tại thời điểm 48 giờ sau khi tiêm tyloxapol gây rối loạn lipid ở chuột nhất, so sánh hiệu số nồng độ lipid máu đầu – cuối, so với lô bệnh lý không được điều trị thì: Fenofibrat sử dụng đường uống liều 50 mg/kg chuột nhất/ngày x 3 liều làm giảm cholesterol toàn phần 11% ($p = 0,0284$), tăng HDL 35% ($p = 0,0002$) và làm giảm LDL 44% ($p = 0,0012$). Cốm Bụp giấm sử dụng đường uống liều 400 mg/kg chuột nhất/ngày x 3 liều làm giảm cholesterol toàn phần 12% ($p = 0,0126$), tăng HDL 51% ($p = 0,0002$) và làm giảm LDL 53% ($p = 0,0002$).

Tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của cốm Bụp giấm trên chuột nhất gây rối loạn lipid máu ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid

So sánh hiệu số giữa thời điểm sau 1 tuần điều trị và sau 8 tuần gây bệnh, so với lô bệnh lý không được điều trị thì lô điều trị bằng atorvastatin 10 mg/kg có nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid máu đều giảm ($p = 0,046$ và $0,0117$). Lô điều trị bằng cốm BG 400 mg/kg có nồng độ triglycerid giảm ($p = 0,0063$), nồng độ HDL tăng ($p = 0,0033$).

Tác dụng dự phòng rối loạn lipid máu của cốm Bụp giấm trên chuột nhất rối loạn lipid máu ngoại sinh bằng chế độ ăn giàu lipid

Sau 6 tuần thử nghiệm, so với lô bệnh lý, lô uống atorvastatin dự phòng có chỉ số cholesterol toàn phần giảm 19%, LDL giảm 44% ($p = 0,022$ và $0,013$); lô uống cốm Bụp giấm dự phòng có chỉ số cholesterol toàn phần giảm 28%, LDL giảm 56% ($p = 0,0069$ và $0,0016$). Các chỉ

số giữa lô uống atorvastatin và uống cốm Bụp giảm khác biệt nhau không có ý nghĩa thống kê.

Tác dụng dự phòng gan nhiễm mỡ không do rượu của cốm Bụp giảm

So với lô bệnh lý, chuột thử nghiệm ở lô uống atorvastatin có cholesterol toàn phần giảm 28%, LDL giảm 62%, các chỉ số triglycerid máu, HDL, ALT, AST và glucose khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, ALT và AST bất thường, hai thông số này có tăng 43% và 36% nhưng chỉ tập trung ở 1 số chuột (tăng 2 – 3 lần), độ lệch chuẩn SD cao.

So với lô bệnh lý, chuột thử nghiệm ở lô uống cốm Bụp giảm có HDL tăng 24%, LDL giảm 58%, AST giảm 20%, các chỉ số cholesterol toàn phần, triglycerid, ALT và glucose khác biệt không có ý nghĩa thống kê. So với lô chứng uống nước cất, chỉ số HDL tăng 30%, glucose tăng 9%. So với lô uống atorvastatin, chỉ số HDL tăng 29%. Đồng thời, xét nghiệm vi thể gan cho thấy tỷ lệ thoái hóa mỡ không bào nhỏ giảm 1%.

So với lô bệnh lý, chuột thử nghiệm ở lô uống thuốc kết hợp atorvastatin và Bụp giảm có cholesterol toàn phần giảm 18%, triglycerid giảm 17%, LDL giảm 58%, các chỉ số HDL, ALT, AST và glucose khác biệt không có ý nghĩa thống kê. So với lô chứng uống nước cất, chỉ số HDL tăng 27%, ALT tăng 115%, glucose tăng 11%. So với lô uống atorvastatin, chỉ số HDL tăng 27%.

4.5. Độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của cốm Bụp giảm trên chuột nhắt

Độc tính cấp của cốm Bụp giảm trên chuột nhắt

Liều tối đa có thể bơm qua đầu kim của cốm Bụp giảm là 15 g/kg.

Trong suốt thời gian 72 giờ đầu tiên và 2 tuần quan sát tiếp theo, không ghi nhận được bất kỳ dấu hiệu bất thường nào xảy ra trên chuột thử nghiệm. Tất cả các chuột đều ăn uống và hoạt động bình thường, không có chuột chết. Do đó, không tìm được LD_{50} vì lô chuột uống 15 g/kg là liều tối đa thuốc phân tán vào nước có thể qua kim để cho uống được mà không có chuột chết. Cốm Bụp giấm có độ an toàn cao trên động vật thử nghiệm và có $D_{max} = 15$ g/kg.

Độc tính bán trường diễn của cốm Bụp giấm trên chuột nhắt

Biểu hiện chung, cân nặng, mức độ ăn, uống

Trong suốt thời gian thử nghiệm (12 tuần), chuột trong lô uống cốm Bụp giấm (BG) liều 1 (0,4 g/kg) và liều 2 (0,8 g/kg) có mức độ ăn uống, đi lại bình thường; tình trạng phân, lông và các biểu hiện bên ngoài không khác biệt so với lô chứng uống nước cất. Chuột trong lô uống cốm Bụp giấm liều 3 (4 g/kg) có biểu hiện đi phân mềm (phân ướt hơn so với phân của lô chứng và không định hình) từ tuần thứ 6 trở đi. Cân nặng chuột của cả 3 lô thử nghiệm uống cốm BG đều giảm ở tuần thứ 5 và từ tuần thứ 8 đến tuần thứ 12 so với lô chứng uống nước cất. Lượng nước và lượng thức ăn tiêu thụ của chuột giữa các lô khác biệt nhau không có ý nghĩa thống kê tại các thời điểm: Ban đầu, sau 6 tuần và sau 12 tuần thử nghiệm.

Chỉ số xét nghiệm sinh hóa

Sau 6 tuần thử nghiệm, so với lô chứng uống nước cất: Lô uống cốm BG 0,4 g/kg có chỉ số glucose giảm 14% ($p < 0,01$). Lô uống cốm BG 0,8 g/kg có các chỉ số sinh hóa khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Lô uống cốm BG 4 g/kg có chỉ số acid uric giảm 11% ($p < 0,001$), ALT tăng 28% ($p < 0,01$), AST tăng 12% ($p < 0,01$).

Sau 12 tuần thử nghiệm, so với lô chứng uống nước cất: Lô uống cốm BG 0,4 g/kg có chỉ số glucose giảm 13% ($p < 0,05$). Lô uống cốm BG 0,8 g/kg có chỉ số cholesterol toàn phần giảm 8% ($p < 0,05$). Lô uống cốm BG 4 g/kg có chỉ số triglycerid tăng 11% ($p < 0,01$).

Chỉ số xét nghiệm huyết học

Chỉ số huyết học của chuột giữa các lô trong thử nghiệm khác biệt nhau không có ý nghĩa thống kê tại thời điểm ban đầu và sau 6 tuần thử nghiệm.

Sau 12 tuần thử nghiệm, lô uống cốm Bup giảm liều 0,4 g/kg có chỉ số MCH giảm 9 % ($p < 0,05$), lô uống cốm Bup giảm liều 4 g/kg có số lượng tiểu cầu PLT giảm 5 % ($p < 0,01$).

Chỉ số trọng lượng gan, thận, lách của chuột giữa các lô trong thử nghiệm khác biệt nhau không có ý nghĩa thống kê sau 12 tuần.

Sau 12 tuần thử nghiệm, so với lô chứng uống nước cất, lô uống cốm Bup giảm 0,4 g/kg và 0,8 g/kg có kết quả vi phẫu gan bình thường. Lô uống cốm Bup giảm 4 g/kg có kết quả vi phẫu gan bình thường, vi phẫu thận có viêm mô kẽ thận mức độ trung bình 2/10 chuột, mức độ nhẹ 8/10 chuột. Chuột được gây mê, giải phẫu, quan sát tim, phổi, gan, thận, lách, ruột, bàng quang. Kết quả bình thường, không khác biệt so với lô uống nước cất.

6. Kết luận và kiến nghị

6.1. Kết luận

1. Liều có tác dụng điều hòa rối loạn lipid máu tốt nhất của bột sáy phun từ đài hoa Bup giảm (BSP) trong khoảng liều từ 15 mg/kg đến 90 mg/kg chuột nhất là 30 mg/kg.

2. Cốm Bup giảm, 2g/ gói (BSP 0,15 g; manitol 1,84 g; aspartam 0,01 g; nước cất 0,12 ml) được bào chế bằng quy trình xát hạt ướt cho

thấy ưu thế trong bào chế và được lựa chọn nghiên cứu thử nghiệm. Cóm Bụp giám đạt các chỉ tiêu: (1) cảm quan, (2) độ ẩm, (3) độ tan, (4) độ đồng đều khối lượng, (5) định tính bằng phản ứng hóa học và sắc ký lớp mỏng, (6) định lượng bằng phương pháp HPLC với quy trình được thẩm định. Cóm Bụp giám ổn định sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện thường. Dự đoán tuổi thọ là 15 tháng.

3. Cóm Bụp giám tác động lên quá trình chuyển hóa lipid máu thông qua việc làm tăng cảm ứng LDLR, SREBP-2 và AMPK. Cóm Bụp giám ở nồng độ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sau 24 giờ cảm ứng gen, làm tăng biểu hiện LDLR 0,87 lần, tăng biểu hiện SREBP-2 0,88 lần, giảm biểu hiện HMGCoA 0,08 lần, tăng biểu hiện AMPK 0,11 lần. Sau 48 giờ cảm ứng gen làm tăng biểu hiện LDLR 1,22 lần, tăng biểu hiện SREBP-2 1,53 lần, giảm biểu hiện HMGCoA 0,28, tăng biểu hiện AMPK 0,52 lần. Sự phối hợp giữa cốm Bụp giám và LP (atorvastatin) làm tăng hiệu quả trên các gen LDLR, SREBP-2 và AMPK.

4. Cóm Bụp giám sử dụng liều 400 mg/kg chuột nhất x 3 liều làm giảm cholesterol toàn phần 12%, tăng HDL 51% và làm giảm LDL 53% trên chuột nhất gây rối loạn lipid máu nội sinh bằng tyloxapol 500 mg/kg trong 48 giờ. Cóm Bụp giám sử dụng trong 7 ngày với liều 400 mg/kg làm giảm triglycerid và tăng HDL trên chuột nhất gây rối loạn lipid máu ngoại sinh bằng dung dịch giàu lipid trong 8 tuần. Đồng thời, làm giảm cholesterol toàn phần 28% và LDL 56% khi sử dụng để dự phòng rối loạn lipid máu trong 6 tuần sử dụng chế độ ăn giàu lipid. Cóm Bụp giám cho thấy khả năng dự phòng bệnh lý gan nhiễm mỡ trên chuột nhất với mức liều 400 mg/kg sử dụng trong 4 tuần. Trên mô hình gây gan nhiễm mỡ do chế độ ăn, so với lô bệnh lý, chuột thử

nghiệm ở lô uống cốm Bụp giấm có HDL tăng 24%, LDL giảm 58%, AST giảm 20%, tỷ lệ thoái hóa mỡ không bào nhỏ giảm 1%.

5. Cốm Bụp giấm có $D_{\max} = 15$ g/kg (liều tối đa có thể cho uống mà không có thú vật thử nghiệm nào chết), tương đương 75 g/người 60kg. Cốm Bụp giấm sử dụng ở cả ba mức liều 0,4 g/kg, 0,8 g/kg và 4 g/kg thể hiện độ an toàn khi sử dụng liên tục trong 12 tuần, không gây chết động vật thử nghiệm hoặc biểu hiện bất thường về đại thể.

6.2. Kiến nghị

1. Khảo sát mức liều có tác dụng điều hòa lipid máu khi sử dụng phối hợp cốm Bụp giấm và atorvastatin.

2. Khảo sát tác dụng của cốm Bụp giấm trên gen SREBP-1a, khảo sát cơ chế làm giảm triglycerid của cốm Bụp giấm.

3. Nghiên cứu đánh giá độ ổn định của cốm Bụp giấm ở điều kiện thường trong thời gian dài (trên 24 tháng).

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Lê Thị Lan Phương, Huỳnh Trần Quốc Dũng, Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Phương Dung (2017), "Xây dựng quy trình định lượng đồng thời delphinidin-3-*O*-sambubiosid và cyanidin-3-*O*-sambubiosid trong cốm Bụp giấm bằng phương pháp HPLC", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 21 (6), tr. 62-67.
2. Lê Thị Lan Phương, Nguyễn Phương Dung (2018), "Đánh giá độc tính cấp và bán trường diễn của cốm Bụp giấm trên chuột nhắt trắng", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 22 (5), tr. 25-33.
3. Lê Thị Lan Phương, Nguyễn Phương Dung (2018), "Đánh giá tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của cốm Bụp giấm trên chuột nhắt trắng", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 22 (5), tr. 58-64.
4. Lê Thị Lan Phương (2021), "Đánh giá tác dụng dự phòng bệnh lý gan nhiễm mỡ không do rượu của cốm Bụp giấm", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 25 (5), tr. 222-227.