

TIỀM NĂNG CHỐNG VIÊM KHỚP CỦA CHIẾT XUẤT ETHANOL THÔ TỪ QUẢ CỌ ĐUÔI CÁ ĐỐI VỚI BỆNH VIÊM KHỚP DẠNG THẤP DO THUỐC BỔ TRỢ HOÀN TOÀN CỦA FREUND GÂY RA Ở CHUỘT

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG

Viện Công nghệ sinh học và thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh
tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v68i02.5074>

Tóm tắt. *Caryota nanas* L. là một trong những loại cây trồng phổ biến ở Việt Nam. Người Việt Nam thường sử dụng *C. nanas* như một vị thuốc cổ truyền để chữa viêm khớp, viêm dạ dày, ghê lở, nhọt, hoặc giảm đau tự nhiên. Tuy nhiên, tác dụng chống viêm khớp của chiết xuất quả *C. nanas* vẫn chưa được khoa học chứng minh hoặc ghi nhận. Nghiên cứu hiện tại đã đánh giá hiệu quả cải thiện của chiết xuất thô của quả *Caryota nanas* L. (EeCN) (với ba liều khoảng 100, 200 và 300 mg/kg thể trọng) trên mô hình viêm khớp do thuốc bổ trợ hoàn chỉnh của Freund gây ra. Những thay đổi về chu vi và đường kính chân, chỉ số và điểm số viêm khớp, thông số viêm, thay đổi mô học trong mô khớp của các nhóm thí nghiệm đã được ghi nhận. Không giống như nhóm không được điều trị, nhóm được điều trị bằng EeCN cho thấy trọng lượng tương đối của tuyến ức và lách giảm đáng kể (tương ứng là 6,32% và 7,09%), nhiệt độ cơ thể và chân (1,4°C và 1,3°C), chu vi và đường kính chân (10,34 mm và 8,89 mm), chỉ số và điểm viêm khớp (17,25 và 7,87), mức độ bạch cầu, ESR, RF, CRP (2,94 x10³tb/mm³, 2,41 mm/giờ, 6,71 mg/L và 6,27 mg/L, tương ứng) ($p < 0,001$), và tăng đáng kể trọng lượng cơ thể (13,57%), mức hồng cầu (2,96 x10⁶tb/mm³) ($p < 0,001$). Kiểm tra mô bệnh học cho thấy giảm mạnh tình trạng viêm hoạt dịch và tổn thương sụn, cũng như cải thiện đáng kể không gian khớp. Chiết xuất Ethanol thô của quả *Caryota nanas* L. (300 mg/kg) có khả năng điều trị viêm khớp; nó có thể là một ứng cử viên đầy hứa hẹn cho việc kiểm soát bệnh viêm khớp.

Từ khóa: *Caryota nanas* L., CFA, viêm khớp dạng thấp

1. GIỚI THIỆU

Viêm khớp dạng thấp (RA) là một bệnh đa hệ thống mãn tính đặc trưng bởi tình trạng viêm màng hoạt dịch dai dẳng liên quan đến các khớp ngoại vi dẫn đến suy giảm dần chức năng của khớp [1]. Khoảng 1% dân số thế giới và 0,28% dân số Việt Nam mắc bệnh RA [2, 3]. Bệnh RA phổ biến ở phụ nữ có độ tuổi từ 40 đến 60 [4]. Một nhóm các loại thuốc như thuốc chống viêm không steroid (NSAID), glucocorticoid, thuốc chống thấp khớp (DMARD), thuốc sinh học đối kháng TNF- α , IL và chất ức chế kinase JANUS (JKI) đã được sử dụng để giảm đau, giảm phản ứng miễn dịch qua trung gian viêm và hạn chế tổn thương khớp [1]. Các NSAID truyền thống bao gồm ibuprofen, diclofenac, meloxicam, mobic có tác dụng ức chế cyclooxygenase (COX) I và (COX) II, ngăn chặn sự tổng hợp prostaglandin (PGs) liên quan đến viêm khớp [5]. Tuy nhiên, NSAID có tác dụng giảm đau và chống viêm nhưng không ngăn cản sự tiến triển của RA và có thể gây ra những tác dụng phụ. Việc sử dụng NSAID có thể dẫn đến các yếu tố nguy cơ về tim mạch, tăng huyết áp tâm thu, gây suy và loét đường tiêu hóa ... [5, 6]. Các tác dụng phụ, độc tính tiềm ẩn và chi phí cao của NSAIDS, DMARDS, ... đã hạn chế việc sử dụng chúng [7]. Do đó, lĩnh vực nghiên cứu về bệnh RA đã tiến bộ nhanh chóng theo hướng điều trị bằng thảo dược. Đã có nhiều phương pháp điều trị bằng thảo dược an toàn và hiệu quả trong việc cải thiện cơn đau, chống viêm, giảm sưng tấy, ... [5]. Tác dụng chống viêm khớp của một số cây thuốc như *Zingiber officinale*, *Aloe barbadensis*, *Withania somnifera* Linn đã được chứng minh [8]. Hiện nay, nhiều loại cây thuốc mới đang được thăm dò và nghiên cứu nhằm tìm ra các loại thuốc thảo dược mới, có hiệu quả điều trị bệnh tốt nhưng giảm tác dụng phụ đến mức tối thiểu nhất [5].

Caryota nanas L. (cây cọ đuôi cá) là một cây thuộc họ Arecaceae được trồng nhiều ở các nước Châu Á. Cây thường mọc ở trong các khu rừng ẩm ướt, râm mát, hoặc bên bờ suối. Ở Việt Nam, *C. nanas* khá phổ biến và thường gặp ở các huyện miền núi như Nam Trà My, Tây Giang, ... tỉnh Quảng Nam [9]. Ở Ấn Độ cây *C. nanas* được khuyến cáo sử dụng để điều trị suy nhược tinh thể và rối loạn tiết niệu, nước ép của quả *C. nanas* được đắp lên trán để điều trị cho bệnh nhân bị bệnh đau nhức nửa đầu [10]. Trong y học dân gian,

chiết xuất từ hoa và quả *C. nanas* được sử dụng để điều trị loét dạ dày, đau nửa đầu, ngộ độc rắn cắn, sưng phù thấp khớp ... [11]. Quả *C. nanas* có chứa các tinh thể canxi oxalat là chất gây kích ứng da và cầm máu. Hoa của *C. nanas* được sử dụng để cải thiện sự phát triển của tóc. Rễ *C. nanas* được dùng làm thuốc chữa bệnh răng miệng. Nhựa *C. nanas* rất ngọt, được sử dụng để sản xuất đường (thường gọi là đường thốt nốt) [10]. Tác dụng chống viêm khớp của chiết xuất quả *C. nanas* vẫn chưa được khoa học chứng minh, nhưng trong y học dân gian Việt Nam công dụng của nó trong điều trị viêm khớp dạng thấp đã được nhắc đến. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát tiềm năng của chiết xuất Ethanol thô từ quả *C. nanas* trong điều trị RA trên chuột.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu:

Quả *C. nanas* thu hái tại nông trại Hoa hồng, Tây Giang, Quảng Nam vào tháng 10 năm 2019 (Hình 1A). Mẫu chúng được lưu giữ tại phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh. Quả được rửa sạch bằng nước máy sau đó rửa bằng nước cất, phơi khô trong bóng râm và nghiền thành bột mịn bằng máy trộn (Hình 1B và 1C). Bột quả *C. nanas* được đóng gói chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 1C).

Chiết xuất ethanol quả *C. nanas*: Bột khô của quả *C. nanas* được trộn với ethanol theo tỷ lệ 1:10 (W/V) và được ngâm ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ trong điều kiện được khuấy liên tục ở khoảng cách đều đặn. Dịch lọc được lọc qua giấy lọc Whatmann No.4. ethanol được loại bỏ khỏi hỗn hợp bằng cách lọc và làm bay hơi bằng thiết bị cô quay (Thụy Sĩ). Chiết xuất ethanol thu từ quả *C. nanas* đã được thu nhận (đặt tên là EeCN) và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo (Hình 1D) [12].



Hình 1. Chiết xuất ethanol thô từ quả *C. nanas*. A. Quả *C. nanas* tươi; B. Quả *C. nanas* phơi khô; C. Bột quả *C. nanas*; D. Chiết xuất ethanol thô quả *C. nanas* (EeCN)

2.2. Sàng lọc hóa thực vật của EeCN:

Việc sàng lọc EeCN để tìm các thành phần hóa thực vật khác nhau được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn [13-18] được mô tả trong Bảng 1.

2.3. Động vật thí nghiệm:

Nghiên cứu được thực hiện trên chuột đực Swiss albino khỏe mạnh, 7 – 8 tuần tuổi, cân nặng 30 ± 2 g. Chuột được thu mua từ Viện Pasteur, TP. HCM và được chăm sóc tại nhà nuôi động vật của Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp TP. HCM (nhiệt độ 29 ± 2 °C, độ ẩm 60-70%, chu kỳ 12h/12h biến thiên giữa sáng và tối). Chuột được nuôi thích nghi với điều kiện mới trong 7 ngày trước khi bắt đầu thí nghiệm. Chuột được nuôi trong lồng kính có kích thước dài x rộng x cao = 60 x 30 x 30 cm (54 cm³) đảm bảo sự thoải mái cho vật nuôi. Vật liệu đăm gỗ dùng để lót chuồng đã được phun Effective Microorganisms (EM) khử trùng và xử lý mùi hôi. Những con chuột được tiêu thụ thức ăn viên tiêu chuẩn dành cho loài gặm nhấm và nước đã được lọc trước [19]. Việc điều trị động vật được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) [20]. Quy trình kiểm tra được thực hiện theo đúng Tuyên bố của Helsinki (2014) [21]. Tất cả động vật được con người chăm sóc theo quy định Pháp luật Việt Nam

TIÊM NĂNG CHỐNG VIÊM KHỚP...

về sử dụng và chăm sóc động vật thí nghiệm và theo Bộ Y tế Việt Nam Hướng dẫn về đạo đức trong nghiên cứu y sinh [22].

Bảng 1. Các xét nghiệm hóa thực vật sơ bộ chiết xuất ethanol thô quả *C. nanas*

Hợp chất hóa học	Thử nghiệm	Quan sát
Tanin (thử nghiệm Braymer)	2ml EeCN + 2ml H ₂ O + 2-3 drops FeCl ₃ (5%)	Kết tủa xanh
Flavonoit	1ml EeCN + 1ml Pb(OAc) ₄ (10%)	Màu vàng
Tecpenoit	2ml EeCN + 2ml (CH ₃ CO) ₂ O + 2-3 drops conc. H ₂ SO ₄	Màu đỏ đậm
Saponin (thử nghiệm Foam)	a. 5ml EeCN + 5ml H ₂ O + heat b. 5ml EeCN + Olive oil (few drops)	Xuất hiện bọt Các dạng nhũ tương
Steroid thử nghiệm (Salkowski)	2ml EeCN + 2ml CHCl ₃ + 2ml H ₂ SO ₄ (conc.)	Vòng màu nâu đỏ ở đường giao nhau
Glycosit (thử nghiệm Liebermann)	2ml EeCN + 2ml CHCl ₃ + 2ml CH ₃ COOH	Màu tím sang xanh lam đến xanh lục
Ancaloit (thử nghiệm Hager)	2ml EeCN + few drops of Hager's reagent	Kết tủa vàng
Phenol	2ml EeCN + 2ml FeCl ₃	Xuất hiện màu hơi xanh
Cacbonhydrat (thử nghiệm Molisch)	2ml EeCN + 10ml H ₂ O + 2 drops Ethanolic anaphthol (20%) + 2ml H ₂ SO ₄ (conc.)	Vòng tím đỏ ở đường giao nhau
Protein (thử nghiệm Xanthoproteic)	1ml EeCN + 1ml H ₂ SO ₄ (conc.)	Kết tủa trắng
Flavon, Xanthone thử nghiệm Fortaleza: Edições EUF)	2mL EeCN (1mg/mL Ethanol) được điều chỉnh thành 3, 5 phần nhỏ	Xanh tím – xuất hiện Flavon Màu vàng – xuất hiện Xanthones

2.4. Thuốc thử, hóa chất và thiết bị:

Quả *C. nanas* do nông trại Hoa hồng, Tây Giang, Quảng Nam cung cấp; CFA (Complete Freund's Adjuvant) được mua từ Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ; Mobic được mua từ Boehringer Ingelheim, Việt Nam; Bộ nhuộm HE; Cân điện tử kỹ thuật Entris (Đức); Thuốc cấp Vernier (Mitutoyo, Nhật Bản); Nhiệt kế hồng ngoại DT-8806C (Đài Loan); Tất cả các hóa chất khác đều được mua từ Sigma (St. Louis, MO).

2.5. Cầm ứng viêm khớp:

Viêm khớp dạng thấp (RA) được gây ra bằng cách tiêm dưới da một liều đơn 0,1 mL FCA vào bàn chân sau bên phải của chuột tùy theo trọng lượng cơ thể của chúng ở ngày "0" [23]. RA phát triển trong 7 ngày. Tất cả những con chuột đã biểu hiện các dấu hiệu của RA như sưng tấy, đỏ khớp, cứng và khó cử động khớp trong giai đoạn này [24]. Các dấu hiệu lâm sàng, cân nặng, nhiệt độ, đường kính và chu vi chân, điểm số và chỉ số viêm khớp được theo dõi và ghi lại. Vào ngày thứ 8, các mẫu máu được thu thập bằng cách lấy máu qua tĩnh mạch đuôi để làm các xét nghiệm huyết học và sinh hóa ban đầu. Điều trị bằng chiết xuất Ethanol thô quả *C. nanas* (EeCN) bắt đầu từ ngày thứ 8 sau khi cầm ứng viêm khớp và tiếp tục trong 21 ngày. Quá trình điều trị đã kết thúc vào ngày thứ 28 [1].

2.6. Lựa chọn liều lượng và thiết kế thử nghiệm:

Trong nghiên cứu này khảo sát về độc tính cấp của EeCN đã không được tiến hành vì tính an toàn của EeCN lên đến 5000 mg/kg đã được thực hiện và xác nhận trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi về "Đánh giá độc tính cấp và bán mãn tính của chiết xuất Ethanol thô quả *C. nanas* ở chuột". Ba liều EeCN (100, 200 và 300 mg / kg) được lựa chọn trên cơ sở EeCN có tính an toàn và có tác dụng bảo vệ gan, thậm chí ở liều mãn tính cao nhất là 500 mg/kg.

Thiết kế thử nghiệm: Tổng số 36 con chuột (30 ± 2 g) được chia thành sáu nhóm (6 con/nhóm). Các nhóm thí nghiệm được thiết kế theo mô tả của Aloke và cộng sự (2019) [5]. Nhóm bình thường: Đối chứng bình thường, chuột khỏe mạnh, nhận nước muối sinh lý 5 mg/kg. Nhóm RA: Đối chứng âm, chuột RA không được điều trị, nhận 5 mg/kg nước muối sinh lý mỗi ngày. Nhóm RA+Mobic: Đối chứng tích cực, chuột RA được điều trị bằng thuốc chuẩn mobic (0,2 mg/kg) [25]. Nhóm RA+EeCN₁₀₀, Nhóm nhóm RA+EeCN₂₀₀, Nhóm RA+EeCN₃₀₀: Chuột RA nhận được 100, 200 và 300 mg EeCN/kg tương ứng.

2.7. Khối lượng cơ thể và khối lượng cơ quan tương đối:

Khối lượng cơ thể của chuột được đo 7 ngày một lần. Vào ngày thứ 28, những con chuột bị hy sinh bằng cách hít khí CO₂, lá lách và tuyến ức được thu thập. Sử dụng cân điện tử Sartorius Entris 3202i-1S (Đức) để đo khối lượng của cơ thể và các cơ quan.

Phần trăm tăng khối lượng cơ thể (WG) được tính theo công thức:

$$WG (\%) = \frac{\text{Khối lượng cơ thể vào cuối mỗi tuần (g)}}{\text{Khối lượng cơ thể ban đầu (g)}} \times 100 \quad [26]$$

Khối lượng tương đối của cơ quan nội tạng được tính theo công thức:

$$\text{Khối lượng cơ quan tương đối (\%)} = \frac{\text{khối lượng nội tạng tuyệt đối (g)}}{\text{khối lượng cơ thể vào ngày phẫu thuật (g)}} \times 100 \quad [27]$$

2.8. Thân nhiệt và nhiệt độ bàn chân:

Nhiệt độ cơ thể (vùng bụng) của chuột được đo ngay lập tức trước và sau khi tiêm CFA bằng nhiệt kế hồng ngoại Thermometer DT-8806C (Đài Loan). Đặt chuột nằm trên bề mặt phẳng, vùng bụng hoặc vùng da của bàn chân sau bên phải của nó áp vào phía trên phần cảm biến hồng ngoại của nhiệt kế. Giữ cò của máy để đo thân nhiệt và nhiệt độ của bàn chân cho đến khi nhiệt độ hiển thị trên máy. Thân nhiệt và nhiệt độ của bàn chân sau của chuột được đo 7 ngày/lần [26, 28, 29].

2.9. Chu vi bàn chân và đường kính khớp:

Chu vi và đường kính bàn chân phải (phần bàn chân nằm ngay phía trên lớp đệm cổ chân) là chỉ số để đánh giá tốc độ sưng và mức độ phù nề của bàn chân. Sử dụng thước cặp Vernier kỹ thuật số (Mitutoyo, Nhật Bản) để đo chu vi bàn chân và đường kính. Các phép đo được thực hiện hàng tuần trước và sau khi chuột được tiêm CFA. Sự thay đổi về đường kính khớp được tính bằng hiệu giữa đường kính khớp cuối cùng và ban đầu [30]. Chu vi bàn chân được xác định bằng cách đo hai đường kính vuông góc của khớp: đường kính ở sau và đường kính trước-sau. Chu vi bàn chân được tính theo công thức: Chu vi (cm) = $2\pi\sqrt{(a^2 + b^2)}/2$. Trong đó: a – đường kính bên, b – đường kính trước – sau [31].

2.10. Chỉ số và điểm số viêm khớp:

Chỉ số và điểm số viêm khớp được đo 7 ngày/lần. Tình trạng viêm và sưng ở mỗi bàn chân sau được tính điểm như sau: cấp 0 = bình thường, 1 = đỏ và sưng nhẹ, nhưng rõ ràng ở mắt cá, 2 = mắt cá chân bị đỏ và sưng vừa phải, 3 = đỏ và sưng nghiêm trọng toàn bộ bàn chân, 4 = chi bị viêm tối đa với sự tham gia của nhiều khớp. Mức độ nghiêm trọng ở mỗi con chuột được đánh giá theo các biến thể về ban đỏ, phù nề, sự hiện diện của các nốt và sự liên quan của các khớp khác không được tiêm thuốc. Tổng điểm viêm khớp (SC) tối đa là 16 trên mỗi con chuột [32]. Chỉ số viêm khớp (AI) được xác định theo công thức sau:

$$AI = \frac{\text{Đường kính chân sau vào ngày "X" - Đường kính chân sau vào ngày "0"}}{\text{Đường kính chân sau vào ngày "0"}} \quad [33]$$

2.11. Các thông số viêm:

Máu được thu nhận bằng phương pháp thu nhận máu tĩnh mạch đuôi hoặc mắt ở chuột [34] và đựng trong ống tráng K₂EDTA hoặc ống không chứa chất chống đông máu, được bảo quản lạnh ở 4°C. Mẫu được gửi đến khoa huyết học và sinh hóa, bệnh viện Quân y 175 TP. HCM để phân tích và đọc kết quả. Thông số hồng cầu (RBC), bạch cầu (WBCs), bạch cầu lympho (LYM), bạch cầu mono (MONO), bạch cầu hạt (GRA), tốc độ lắng hồng cầu (ESR). Thông số sinh hóa được khảo sát là alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphate (ALP), protein phản ứng C (CRP), yếu tố dạng thấp (RF) [35].

2.12. Mô bệnh khớp:

Mô khớp đã được thu thập, một phần được bảo quản trong tủ lạnh -80 độ, một phần được rửa bằng dung dịch formalin đệm trung tính (NBF) 10%. Sau khi cố định, các phần mô được rửa sạch và khử nước bằng cồn 70%, 90% và cồn tuyệt đối, tiếp tục làm sạch bằng hai lần thay xylene. Sau đó, các mô được nhúng vào sáp parafin tạo khối mô và được cắt lát mỏng 4 µm bởi một microtome. Cố định mô vào các phiến kính và nhuộm màu bằng hematoxylin-eosin. Các phiến kính được khử sáp bằng cồn 50%, 70%, 95%, cồn tuyệt

đổi và làm mất nước bằng xylen. Sử dụng DPX và nắp đậy được gắn cố định trên phiến kính. Quan sát dưới kính hiển vi ánh sáng để kiểm tra thay đổi mô học. Ảnh chụp vi thể của các phần mẫu mô đã chọn dưới độ phóng đại của vật kính x20 bằng máy ảnh kỹ thuật số tích hợp tự động (EVOS XL, Hoa Kỳ) [36]. Mẫu bệnh phẩm được gửi đến khoa Giải phẫu bệnh, bệnh viện Quân y 175 Tp. HCM để nhuộm mẫu mô và đọc kết quả.

2.13. Phân tích thống kê:

Các kết quả thực nghiệm được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Dữ liệu được phân tích thống kê bằng cách phân tích ANOVA. Tiến hành thực hiện kiểm tra so sánh của Tukey bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVIII. Mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác giữa các nghiệm thức là $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Phân tích thành phần hóa thực vật của EeCN:

Quá trình sàng lọc hóa thực vật sơ bộ của EeCN cho thấy sự hiện diện của alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, terpenoid, phenol, glycoside, steroid, cacbohydrate (Bảng 1) và vắng mặt protein, flavon và xanthone trong EeCN. Hơn nữa, sự hiện diện của một số hợp chất hoạt tính sinh học như rutin, axit béo, ... trong EeCN cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước [11, 37]. Mục đích sàng lọc hóa thực vật là để tiêu chuẩn hóa thuốc thảo dược. Flavonoid có chức năng bảo vệ chống lại chứng viêm, kết tập tiểu cầu, dị ứng, các gốc tự do, độc tố gan, vi khuẩn, khối u, viêm loét. Flavonoid có tác dụng ức chế miễn dịch, chống viêm, chống oxy hóa, làm giảm các triệu chứng của RA bằng cách ngăn chặn việc tạo ra NO, TNF- α , PGE₂, kích hoạt NF- κ B. Alkaloid được sử dụng làm thuốc giảm đau, diệt khuẩn và chống viêm. Sự hiện diện của polyphenol cho thấy EeCN có thể hoạt động như chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất điều hòa hormone và chống viêm [38]. Những kết quả này cung cấp thêm thông tin cho các thí nghiệm tiếp theo để chứng minh các hoạt tính sinh học khác của EeCN như hoạt động chống viêm khớp.

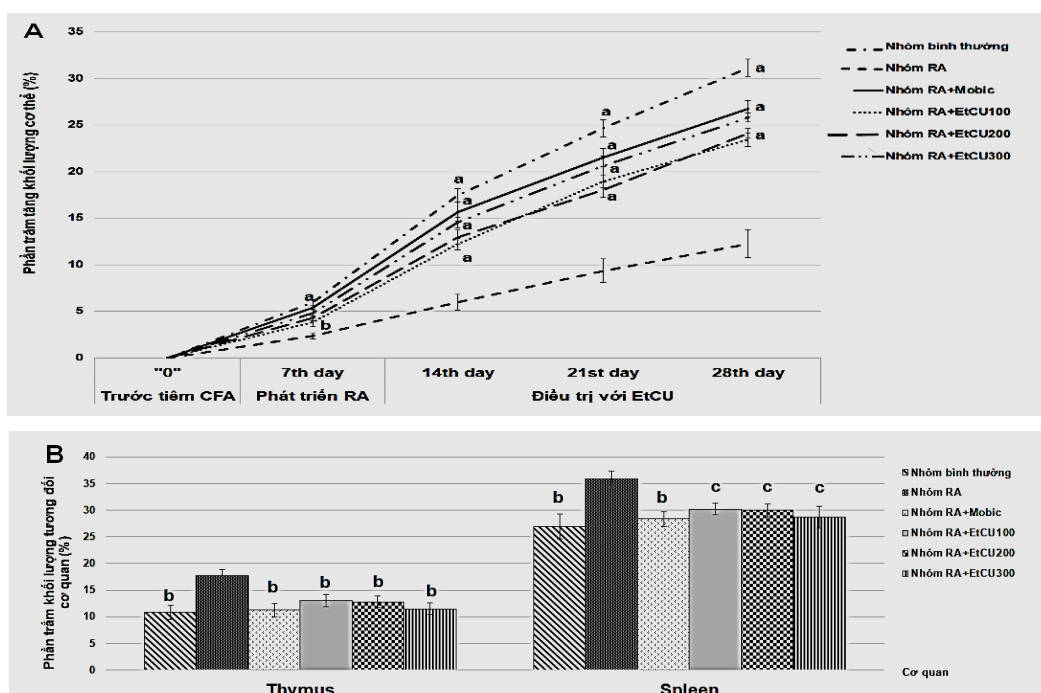
3.2. Khối lượng cơ thể và khối lượng cơ quan tương đối:

Khối lượng cơ thể là một yếu tố dự báo sức khỏe, đặc biệt là trong các trạng thái bệnh lý [39]. Sự thay đổi khối lượng cơ thể ở động vật là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá phản ứng của thuốc đối với tình trạng viêm [40]. Trong nghiên cứu này, thay đổi đáng kể về khối lượng cơ thể được ghi nhận ở chuột RA do CFA gây ra tương tự với kết quả nghiên cứu của Mondal và cộng sự (2016) [41] cho thấy tình trạng viêm khớp đã làm giảm đáng kể khối lượng cơ thể ở chuột cảm ứng CFA so với chuột bình thường ($p < 0,001$) so với nhóm bình thường. Ở động vật thuộc các nhóm được điều trị bằng các liều EeCN khác nhau và mức độ tăng khối lượng cơ thể có ý nghĩa ($p > 0,001$) so với động vật của nhóm RA cho thấy hiệu quả của EeCN và mức độ trong việc ức chế viêm khớp (Hình 2A).

Giảm cân và suy mòn là những đặc điểm phổ biến ở bệnh RA, nguyên nhân là do tăng sản xuất cytokine làm tăng tỷ lệ trao đổi chất khi nghỉ ngơi, tăng phân hủy protein, sức ăn của động vật kém dần. Do động vật bị bệnh RA không đáp ứng được đầy đủ nhu cầu dinh dưỡng, đặc biệt là nhu cầu về calo và protein, vì vậy đã xảy ra tình trạng sụt cân [42]. Điều trị bằng đường uống với EeCN đã cải thiện mô hình tăng cân ở những con chuột bị viêm khớp do hiệu quả chống viêm của các chất chiết xuất từ quả *C. nanas*. Sự hiện diện của saponin trong EeCN ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng trưởng và tiêu hóa thức ăn. Saponin có khả năng kích thích tăng tính thấm qua màng, kích hoạt hệ thống miễn dịch và có tác dụng hạ cholesterol trong máu [43].

Tuyến ức hoạt động như một cơ quan miễn dịch trung ương và lá lách là một cơ quan miễn dịch ngoại vi. Những thay đổi trong chỉ số tuyến ức và lá lách phản ánh chức năng miễn dịch tổng thể của cơ thể [44]. Để đánh giá ảnh hưởng của EeCN đến các chỉ số cơ quan miễn dịch, khối lượng của lá lách và tuyến ức đã được xác định sau thời gian thử nghiệm (28 ngày) (Hình 2B). Dữ liệu chỉ ra rằng điều trị với EeCN (liều uống 100, 200 và 300 mg/kg) đã làm giảm đáng kể khối lượng tương đối của tuyến ức và lá lách ($p < 0,01$, $p < 0,05$). Do đó, EeCN có thể phát huy tác dụng ức chế miễn dịch ở mô hình chuột bị RA. Chức năng chính của tuyến ức là sản xuất tế bào lympho T và tiết hormone tuyến ức, do đó tuyến ức chủ yếu tham gia vào quá trình miễn dịch tế bào. Mức độ cao của tế bào lympho B và đại thực bào thường có trong lá lách, tỷ lệ tế bào lympho B hiện diện nhiều hơn, do đó, lá lách có liên quan chặt chẽ hơn với miễn dịch dịch thể. Nghiên cứu hiện tại đã chứng minh rằng EeCN làm giảm các chỉ số của tuyến ức và lá lách, cho thấy rằng EeCN với sự hiện diện của flavonoid có tác dụng ức chế miễn dịch, chống viêm, chống oxy hóa, làm giảm

các triệu chứng của RA bằng cách ngăn chặn việc tạo ra NO, TNF- α , PGE2 và kích hoạt NF-kB [38]. Từ đó có thể ức chế các hoạt động miễn dịch của tuyến ức và lá lách ở chuột RA. Những gợi ý này phù hợp với báo cáo của Bihani và cộng sự (2014) [30] chiết xuất của *Cyathocline purpurea* có tác dụng làm tăng đáng kể khối lượng cơ thể và giảm khối lượng tương đối của tuyến ức và lá lách.



Hình 2. Hiệu quả điều trị của EeCN đối với (A) Mức độ tăng cân của cơ thể, (B) Khối lượng tương đối của tuyến ức và lá lách của chuột RA. Các giá trị được biểu thị bằng Mean \pm SD, n = 6 và được ước tính bằng cách sử dụng One-way ANOVA và kiểm tra HSD Tukey posthoc. So sánh được thực hiện giữa 1) Nhóm bình thường Vs Nhóm RA; 2) Nhóm RA Vs Nhóm RA+EeCN₁₀₀, nhóm RA+EeCN₂₀₀, nhóm RA+EeCN₃₀₀, nhóm RA+Mobic. ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3.3. Thân nhiệt và nhiệt độ bàn chân:

RA là một bệnh đa hệ thống mãn tính đặc trưng bởi tình trạng viêm màng hoạt dịch dai dẳng liên quan đến các khớp ngoại vi. Khi khớp bị viêm có thể dẫn đến sưng, đau, nóng, đỏ tại các khớp, nhiệt độ cơ thể và nhiệt độ bàn chân tại vùng bị viêm sẽ tăng trong đợt tiến triển bệnh [1].

Bảng 2. Hiệu quả điều trị của EeCN đối với thay đổi của thân nhiệt và nhiệt độ bàn chân ở chuột RA

Chỉ tiêu	Nhóm thí nghiệm	Trước tiêm CFA	Khởi phát RA	Điều trị RA với EeCN		
		Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21	Ngày 28
Thân nhiệt (°C)	Bình thường	36,7 \pm 0,21	^a 36,6 \pm 0,22	^a 36,7 \pm 0,35	^a 36,6 \pm 0,35	^a 36,7 \pm 0,34
	RA	36,7 \pm 0,14	39,1 \pm 0,25	39,4 \pm 0,29	38,8 \pm 0,32	38,6 \pm 0,28
	RA+Mobic	36,7 \pm 0,16	39,2 \pm 0,19	^a 38,5 \pm 0,32	^a 37,9 \pm 0,23	^a 37,1 \pm 0,26
	RA+EeCN ₁₀₀	36,6 \pm 0,25	39,3 \pm 0,23	^a 38,8 \pm 0,29	^a 38,5 \pm 0,28	^a 37,6 \pm 0,33
	RA+EeCN ₂₀₀	36,8 \pm 0,22	39,1 \pm 0,18	^a 38,7 \pm 0,27	^a 38,4 \pm 0,35	^a 37,5 \pm 0,28
	RA+EeCN ₃₀₀	36,7 \pm 0,13	39,4 \pm 0,24	^a 38,5 \pm 0,35	^a 38,1 \pm 0,31	^a 37,2 \pm 0,29
Nhiệt độ bàn chân (°C)	Bình thường	26,9 \pm 0,19	^a 26,8 \pm 0,24	^a 26,7 \pm 0,27	^a 26,9 \pm 0,18	^a 26,8 \pm 0,22
	RA	26,8 \pm 0,23	29,7 \pm 0,28	29,9 \pm 0,21	29,3 \pm 0,24	28,7 \pm 0,27
	RA+Mobic	26,6 \pm 0,26	29,6 \pm 0,22	^a 28,5 \pm 0,29	^a 28,1 \pm 0,28	^a 27,3 \pm 0,24
	RA+EeCN ₁₀₀	26,7 \pm 0,19	29,7 \pm 0,25	^a 28,8 \pm 0,23	^a 28,6 \pm 0,29	^a 27,8 \pm 0,25
	RA+EeCN ₂₀₀	26,8 \pm 0,17	29,5 \pm 0,28	^a 28,7 \pm 0,26	^a 28,5 \pm 0,22	^a 27,7 \pm 0,29
	RA+EeCN ₃₀₀	26,9 \pm 0,22	29,8 \pm 0,21	^a 28,5 \pm 0,24	^a 28,2 \pm 0,25	^a 27,4 \pm 0,21

TIỀM NĂNG CHỐNG VIÊM KHỚP...

Các giá trị được biểu thị bằng Mean \pm SD, n = 6 và được ước tính bằng cách sử dụng One-way ANOVA và kiểm tra HSD Tukey posthoc. So sánh được thực hiện giữa 1) Nhóm bình thường và Nhóm RA; 2) Nhóm RA và Nhóm RA+EeCN₁₀₀/nhóm RA+EeCN₂₀₀/nhóm RA+EeCN₃₀₀/nhóm RA+Mobic. ^a*p*<0.001, ^b*p*<0.01, ^c*p*<0.05 được xem là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Nhiệt độ trung bình của cơ thể và nhiệt độ bàn chân ở nhóm bình thường là 36,7 \pm 0,21°C và 26,9 \pm 0,19°C, không có sự thay đổi đáng kể trong suốt quá trình thí nghiệm. Sau khi khởi phát viêm khớp nhiệt độ trung bình của cơ thể và bàn chân đã tăng lên 39,1 \pm 0,25°C và 29,7 \pm 0,28°C. Xử lý bằng EeCN và mobic giúp nhiệt độ trung bình của cơ thể đã giảm 37,2 \pm 0,29°C và 37,1 \pm 0,26°C (*p*<0,001); nhiệt độ trung bình của bàn chân cũng giảm xuống còn 27,7 \pm 0,29°C và 27,3 \pm 0,24°C (*p*<0,001). Sự giảm nhiệt độ cơ thể và nhiệt độ bàn chân ở các nhóm được điều trị với các liều EeCN cũng khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng âm (nhóm RA) (*p*<0,001) (Bảng 2).

Kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể gây khởi phát các phản ứng miễn dịch. Tế bào lympho T tập trung nhiều ở các khớp, giải phóng các cytokin như IL-1, IL-6, TNF- α ... chúng tác động lên tế bào lympho B, đại thực bào, tế bào nội mô mạch máu màng hoạt dịch... Tế bào lympho B sản xuất globulin miễn dịch, tạo phức hợp miễn dịch lắng đọng tại màng hoạt dịch, gây tổn thương khớp. Sung, đau, nóng, tấy đỏ và viêm tại các khớp do phần mềm bị sưng hoặc do tràn dịch khớp [45]. Khi viêm cơ thể sản sinh ra chất trung gian của đáp ứng viêm (cytokine, interleukin ...) nhằm bảo vệ và sửa chữa tổn thương. Những chất này phối hợp với nhau đã làm suy giảm khả năng điều hoà nhiệt, gây tăng nhiệt độ [46]. Sự hiện diện của polyphenol, flavonoid, alkaloid, ... cho thấy khả năng bảo vệ, chống lại chứng viêm [47]. Bằng chứng là nhiệt độ cơ thể và nhiệt độ bàn chân viêm đã giảm ở các nhóm được điều trị bởi EeCN so với nhóm bệnh RA. Ruckmani và cộng sự (2018) [1] trong báo cáo của mình cũng khẳng định việc sử dụng chiết xuất *Sesamum indicum* điều trị cho chuột RA đã làm giảm thân nhiệt và nhiệt độ bàn chân của chuột.

3.4. Chu vi bàn chân và đường kính khớp

Bảng 3. Hiệu quả điều trị của EeCN đối với thay đổi của chu vi bàn chân và đường kính khớp ở chuột RA

Chỉ tiêu	Nhóm thí nghiệm	Trước tiêm	Khởi phát	Điều trị RA với EeCN		
		CFA	RA	Ngày 14	Ngày 21	Ngày 28
Chu vi bàn chân (mm)	Bình thường	7,84 \pm 0,24	^a 7,81 \pm 0,66	^a 7,87 \pm 0,59	^a 7,95 \pm 0,71	^a 8,01 \pm 0,89
	RA	8,02 \pm 0,28	15,38 \pm 0,51	^a 18,82 \pm 0,68	^a 19,14 \pm 0,78	^a 19,28 \pm 0,91
	RA+Mobic	7,73 \pm 0,37	15,52 \pm 0,77	11,46 \pm 0,72	9,66 \pm 0,57	8,85 \pm 0,69
	RA+EeCN ₁₀₀	7,95 \pm 0,25	15,43 \pm 0,53	^a 12,73 \pm 0,64	^a 10,69 \pm 0,69	^a 9,78 \pm 0,75
	RA+EeCN ₂₀₀	7,91 \pm 0,29	15,55 \pm 0,64	^a 12,85 \pm 0,51	^a 10,55 \pm 0,62	^a 9,56 \pm 0,56
	RA+EeCN ₃₀₀	7,82 \pm 0,31	15,34 \pm 0,75	^a 11,77 \pm 0,76	^a 9,82 \pm 0,73	^a 8,94 \pm 0,68
Đường kính khớp (mm)	Bình thường	0,54 \pm 0,11	^a 0,54 \pm 0,14	^a 0,55 \pm 0,12	^a 0,54 \pm 0,09	^a 0,55 \pm 0,07
	RA	0,53 \pm 0,14	8,37 \pm 0,54	10,79 \pm 0,77	10,83 \pm 0,89	10,97 \pm 0,77
	RA+Mobic	0,55 \pm 0,12	8,26 \pm 0,49	^a 4,45 \pm 0,69	^a 2,76 \pm 0,75	^a 1,91 \pm 0,78
	RA+EeCN ₁₀₀	0,54 \pm 0,13	8,33 \pm 0,61	^a 5,41 \pm 0,74	^a 3,72 \pm 0,79	^a 2,67 \pm 0,83
	RA+EeCN ₂₀₀	0,55 \pm 0,09	8,31 \pm 0,47	^a 5,26 \pm 0,76	^a 3,54 \pm 0,85	^a 2,45 \pm 0,65
	RA+EeCN ₃₀₀	0,55 \pm 0,08	8,29 \pm 0,52	^a 4,88 \pm 0,81	^a 2,98 \pm 0,89	^a 1,99 \pm 0,72

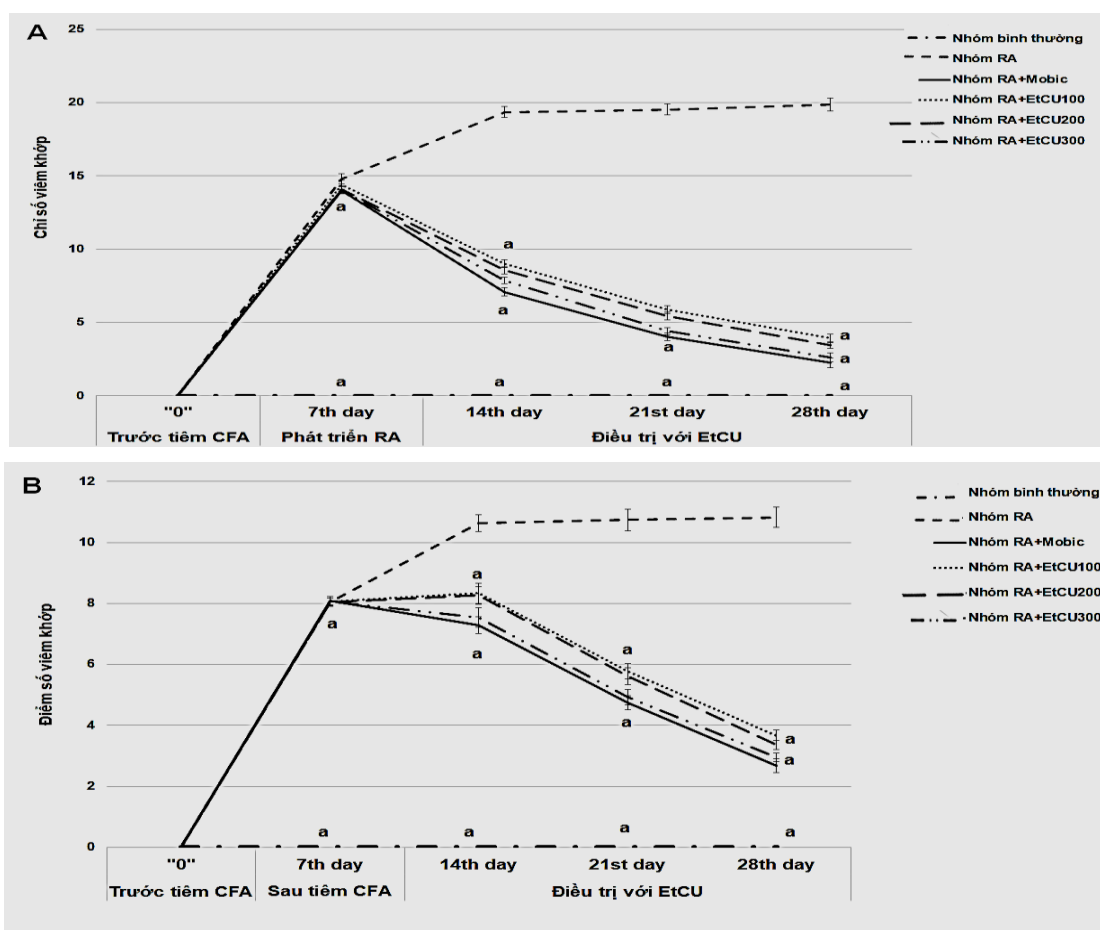
Các giá trị được biểu thị bằng Mean \pm SD, n = 6 và được ước tính bằng cách sử dụng One-way ANOVA và kiểm tra HSD Tukey posthoc. So sánh được thực hiện giữa 1) Nhóm bình thường và Nhóm RA; 2) Nhóm RA và Nhóm RA+EeCN₁₀₀/nhóm RA+EeCN₂₀₀/nhóm RA+EeCN₃₀₀/nhóm RA+Mobic. ^a*p*<0.001, ^b*p*<0.01, ^c*p*<0.05 được xem là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

RA khiến hệ thống miễn dịch của cơ thể tấn công màng hoạt dịch, nơi chứa các khớp, dẫn đến viêm và sưng tấy. Sưng khớp xảy ra khi có sự gia tăng chất lỏng trong các mô bao quanh khớp [45]. Phép đo chu vi bàn chân và đường kính khớp của chuột cho thấy rõ sự tăng kích thước đáng kể ở nhóm chuột viêm khớp do CFA gây ra. Hiện tượng sưng phù đã giảm dần ở các nhóm được điều trị bằng các liều EeCN và thuốc tiêu chuẩn mobic vào cuối lịch trình thí nghiệm (Bảng 3). Hiệu quả này có được là nhờ tác dụng của các hợp chất hoạt tính sinh học hiện diện trong EeCN, những hợp chất này có tác dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm, giảm đau... [38]. Kết quả nghiên cứu hiện tại phù hợp với báo cáo của Modark và cộng sự (2011) [48] sử dụng chiết xuất *Drynaria quercifolia* đã làm giảm chu vi bàn chân và đường kính khớp ở chuột RA.

Mô hình viêm khớp do CFA gây ra ở chuột là mô hình được sử dụng nhiều để nghiên cứu các đặc tính chống thấp khớp của các hợp chất khác nhau [48]. Phép đo chu vi bàn chân và đường kính khớp được sử dụng để đánh giá mức độ viêm và mô tả tác dụng điều trị của EeCN trên chuột thí nghiệm (Bảng 3). Tất cả những con chuột thí nghiệm đều được chú ý bởi sự gia tăng đường kính chân vào ngày thứ 7 và đạt tối đa vào ngày thứ 14 trái ngược với những con chuột bình thường ($p < 0,001$). Những con chuột bị viêm khớp do CFA gây ra được ghi nhận với biểu hiện mẩn đỏ, sưng tấy, ban đỏ quanh khớp và phù nề ở các khớp của chúng. Điều trị bằng thuốc tiêu chuẩn mobic đã làm giảm đáng kể ($p < 0,001$) sưng chân ngược với nhóm RA do CFA gây ra. Những con chuột được sử dụng EeCN từ ngày 8-28 đã giảm đáng kể chu vi bàn chân và đường kính khớp so với nhóm đối chứng âm (nhóm RA) ($p < 0,001$). Tuy nhiên, những con chuột đối chứng khỏe mạnh bình thường không cho thấy bất kỳ sự thay đổi nào về chu vi bàn chân và đường kính khớp (Bảng 3).

3.5. Chỉ số và điểm số khớp:

Chỉ số và điểm số viêm khớp là các chỉ tiêu đo lường mức độ tổn thương khớp do viêm khớp gây ra [45]. Việc kiểm tra hình thái của bàn chân sau của chuột thí nghiệm được trình bày trong Hình 2. Sau khi tiêm CFA vào bàn chân sau của chuột gây sưng và tấy đỏ cho thấy sự phát triển của chứng viêm. Chỉ số và điểm số khớp đạt tối đa vào ngày thứ 14 và sau đó tăng nhẹ đến ngày thứ 28 ($p < 0,001$). Chỉ số và điểm số khớp giảm đáng kể ở những con chuột được điều trị bằng mobic ($p < 0,001$). Tuy nhiên, việc bổ sung các liều EeCN cũng đã làm giảm đáng kể ($p < 0,001$) chỉ số và điểm số khớp so với chuột không được điều trị (nhóm RA) (Hình 2). Những con chuột đối chứng khỏe mạnh bình thường không có bất kỳ dấu hiệu ban đỏ nào trên bàn chân sau. Điều tra vĩ mô bàn chân sau của chuột thí nghiệm được thể hiện trong Hình 4A.



Hình 3. Hiệu quả điều trị của EeCN đối với (A) Chỉ số viêm khớp, (B) Điểm số viêm khớp của chuột RA. Các giá trị được biểu thị bằng Mean \pm SD, n = 6 và được ước tính bằng cách sử dụng One-way ANOVA và kiểm tra HSD Tukey posthoc. So sánh được thực hiện giữa 1) Nhóm bình thường Vs Nhóm RA; 2) Nhóm RA Vs Nhóm RA+EeCN₁₀₀, nhóm RA+EeCN₂₀₀, nhóm RA+EeCN₃₀₀, nhóm RA+Mobic. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Chăm điểm khớp là một tiêu chuẩn đánh giá mức độ sưng phồng của các khớp sau khi được tiêm CFA và điều trị với EeCN. EeCN làm giảm đáng kể chỉ số khớp và bảo vệ chống lại sự thay đổi hình thái khớp bằng cách giảm sưng và đỏ, cùng với ức chế sự phát triển của các tổn thương thứ cấp [38]. Những phát hiện trong nghiên cứu này về chỉ số và điểm số khớp biểu hiện tác dụng của CFA và EeCN là đồng bộ với một nghiên cứu trước đây của Uttra và cộng sự [49]. Họ đã báo cáo rằng tiêm CFA cho thấy các tổn thương khớp, làm tăng chỉ số và điểm số khớp ở chuột RA trái ngược với chuột đối chứng bình thường, trong khi sử dụng chiết xuất *Ribes orientale* đã làm giảm điểm số và chỉ số khớp.

3.6. Các thông số viêm:

Ước tính nồng độ các thông số viêm trong máu và huyết thanh của chuột là đặc điểm quan trọng của đánh giá bệnh RA [32]. Quan sát những thay đổi của các thông số viêm trong suốt quá trình thí nghiệm (Bảng 4) thấy rằng việc tiêm CFA đã làm tăng đáng kể nồng độ ESR, WBCs, LYM, MONO, GRA, AST, ALP, ALT, CRP và RF và giảm nồng độ RBC trong máu của chuột ở nhóm RA so với nhóm đối chứng bình thường ($p < 0,001$, $p < 0,01$). Sử dụng EeCN và thuốc tiêu chuẩn mobic điều trị cho chuột RA dẫn đến giảm đáng kể nồng độ của ESR, WBCs, LYM, MONO, GRA, CRP, AST, ALP, ALT và RF và tăng nồng độ của RBC ($p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$). Nồng độ của RF và CRP đã tăng lên (9.34 ± 1.36 U/L và 8.21 ± 1.25 U/L, tương ứng) ở chuột kiểm soát bệnh so với chuột đối chứng bình thường. Tuy nhiên, EeCN làm giảm RF và CRP ở động vật được sử dụng EeCN ở mức 300 mg/kg (tương ứng là 2.64 ± 0.34 U/L và 2.14 ± 0.39 U/L) và điều trị bằng thuốc tiêu chuẩn mobic (tương ứng là 2.04 ± 0.36 U/L và 2.46 ± 0.38 U/L) so với nhóm RA không được điều trị (Bảng 4).

Bảng 4. Hiệu quả điều trị của EeCN đối với thay đổi các thông số viêm ở chuột RA

Parameters	Nhóm bình thường	Nhóm RA	Nhóm RA-Mobic	Nhóm RA-EeCN ₁₀₀	Nhóm RA-EeCN ₂₀₀	Nhóm RA-EeCN ₃₀₀
RBC ($\times 10^6$ cells/mm ³)	^a 8.37 \pm 0.29	4.33 \pm 0.53	^b 7.56 \pm 0.59	^b 6.74 \pm 0.38	^c 6.88 \pm 0.51	^b 7.29 \pm 0.48
ESR (mm/hr)	^a 4.38 \pm 0.24	7.24 \pm 0.49	^b 4.45 \pm 0.35	^c 5.67 \pm 0.38	^c 6.11 \pm 0.46	^b 4.83 \pm 0.32
WBC ($\times 10^3$ tb/mm ³)	^a 5.23 \pm 0.33	9.66 \pm 0.39	^a 6.27 \pm 0.25	^b 7.79 \pm 0.21	^b 7.65 \pm 0.22	^a 6.72 \pm 0.24
Lymphocytes ($\times 10^3$ tb/mm ³)	^a 3.33 \pm 0.32	5.88 \pm 0.27	^a 3.75 \pm 0.18	^b 4.78 \pm 0.16	^a 4.52 \pm 0.13	^a 4.09 \pm 0.14
Monocytes ($\times 10^3$ tb/mm ³)	^b 1.41 \pm 0.21	2.32 \pm 0.17	^a 1.53 \pm 0.05	^b 1.89 \pm 0.07	^b 1.85 \pm 0.05	^a 1.62 \pm 0.04
Granulocytes ($\times 10^3$ tb/mm ³)	^a 0.49 \pm 0.04	1.46 \pm 0.05	^a 0.99 \pm 0.07	^b 1.12 \pm 0.06	^b 1.28 \pm 0.08	^a 1.69 \pm 0.09
CRP (mg/L)	^a 0.14 \pm 0.04	8.21 \pm 1.25	^a 2.04 \pm 0.36	^a 3.47 \pm 0.41	^a 3.45 \pm 0.52	^a 2.14 \pm 0.39
RF (mg/L)	^a 0.16 \pm 0.05	9.34 \pm 1.36	^c 2.46 \pm 0.38	^b 3.75 \pm 0.43	^b 3.69 \pm 0.55	^b 2.64 \pm 0.34
ALP (U/L)	^a 130,76 \pm 0,36	135,25 \pm 0,33	^a 131,75 \pm 0,66	^a 132,64 \pm 0,37	^a 132,78 \pm 0,48	^a 131,97 \pm 0,59
AST (U/L)	^a 97,26 \pm 0,75	104,77 \pm 0,37	^a 99,41 \pm 0,64	^a 101,55 \pm 0,38	^a 101,28 \pm 0,43	^a 99,62 \pm 0,58
ALT (U/L)	^a 69,35 \pm 0,32	78,57 \pm 0,34	^a 72,38 \pm 0,45	^a 74,56 \pm 0,42	^a 74,43 \pm 0,33	^a 72,27 \pm 0,54

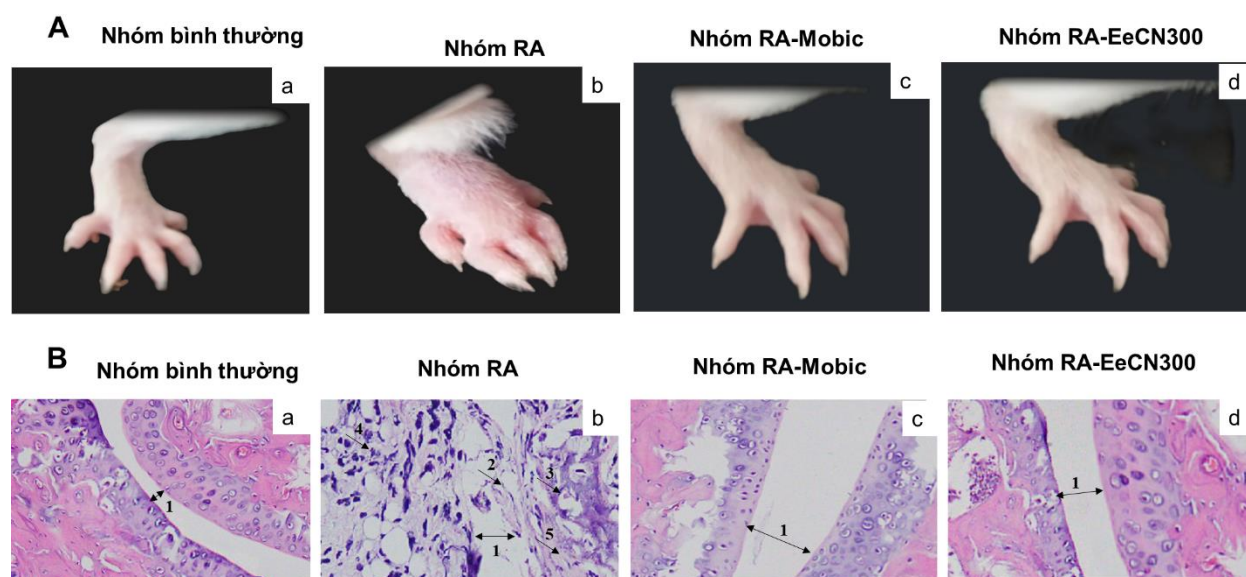
Các giá trị được biểu thị bằng Mean \pm SD, n = 6 và được ước tính bằng cách sử dụng One-way ANOVA và kiểm tra HSD Tukey posthoc. So sánh được thực hiện giữa 1) Nhóm bình thường và Nhóm RA; 2) Nhóm RA và Nhóm RA+EeCN₁₀₀/nhóm RA+EeCN₂₀₀/nhóm RA+EeCN₃₀₀/nhóm RA+Mobic. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,05$ được xem là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Sự giảm nồng độ RBC ở chuột CFA là do thiếu máu, nguyên nhân là do suy tủy xương, giảm erythropoietin và tổn thương hồng cầu. Các quá trình này bị ảnh hưởng bởi IL-1 β . EeCN và mobic làm tăng đáng kể giá trị RBC, tức là ức chế sự khởi phát của thiếu máu do làm giảm giá trị IL-1 β . Sự gia tăng WBCs, LYM, MONO, GRA là kết quả từ việc kích hoạt hệ thống miễn dịch tấn công mầm bệnh và giải phóng TNF- α và IL-1 β đã được ghi nhận ở chuột kiểm soát bệnh. Sự sụt giảm đáng kể các thông số trên ở chuột được điều trị cho thấy tác dụng điều hòa miễn dịch của EeCN làm giảm giá trị TNF- α và IL-1 β . Tương tự, nhóm kiểm soát bệnh gia tăng số lượng ESR, cho thấy mức độ tăng cường của các protein viêm trong máu do tăng nồng độ IL-6. Tuy nhiên EeCN và thuốc tiêu chuẩn mobic đã làm giảm đáng kể mức IL-6, do đó làm giảm sự hình thành các cytokine gây viêm, từ đó giảm ESR. RF tăng cao trong huyết thanh của nhóm kiểm soát bệnh và giảm đáng kể ở những con chuột được điều trị bằng EeCN và mobic, thể hiện tác dụng bảo vệ của

EeCN trong điều trị RA. Nghiên cứu trước đó đã ghi nhận rằng các cytokine như IL-6, TNF- α và IL-1 β điều chỉnh sự hình thành CRP từ gan. EeCN đã làm giảm các biểu hiện của IL-6, IL-1 β và TNF- α , do đó làm giảm nồng độ CRP trong huyết thanh ở chuột RA được sử dụng EeCN. Nồng độ AST và ALT trong huyết thanh tăng lên liên quan đến việc tăng cường nồng độ bradykinin trong chứng viêm và cho thấy độc tính với gan. Chức năng ALP có liên quan đến sự tiêu hủy của xương và là một chỉ tiêu đánh giá về tính toàn vẹn của lysosom. Trong nghiên cứu hiện tại, giá trị ALP tăng trong máu đã được quan sát thấy ở chuột kiểm soát bệnh. EeCN và thuốc tiêu chuẩn (mobic) đã làm giảm đáng kể giá trị AST, ALT và ALP, điều này có thể gợi ý sự ổn định của lysosome, giảm sự suy yếu của xương và giảm nồng độ bradykinin [38]. Mbiantcha và cộng sự (2017) trong nghiên cứu của họ về ảnh hưởng của chiết xuất *Piptadeniastrum africanum* đến điều trị RA ở chuột cũng báo cáo kết quả tương tự về sự thay đổi các thông số viêm [39].

3.7. Mô bệnh khớp:

Nghiên cứu mô bệnh học khớp của chuột đối chứng khỏe mạnh cho thấy không bị viêm, không thâm nhiễm tế bào lympho và không có hoại tử xương, màng syn bình thường, không gian khớp hoạt dịch và không gian chung không bị mở rộng (Hình 4Ba). Một loạt các tế bào viêm xâm nhập vào syn khớp, màng syn bị phá hủy, tăng sinh mô hạt, thâm nhiễm tế bào lympho, tương bào, tăng sản khớp, hình thành các mảng pannus, mở rộng không gian khớp hoạt dịch và không gian chung đã được quan sát thấy trong mô bệnh khớp của chuột thuộc nhóm kiểm soát bệnh khớp (Hình 4Bb). Ngược lại với những thay đổi bệnh lý của nhóm RA, động vật được sử dụng EeCN hoặc mobic cho thấy khả năng bảo vệ khớp đáng kể so với nhóm bệnh khớp. EeCN với liều uống 100 và 200 mg/kg đã cho thấy tác dụng chống lại sự hoại tử của xương, lượng tế bào viêm xâm nhiễm ít và tổn thương syn giảm tối thiểu, màng hoạt dịch đã dần hồi phục, không gian khớp hoạt dịch và không gian chung đã dần thu hẹp. Đặc biệt, hiệu quả bảo vệ khớp của EeCN (300 mg/kg) hoặc thuốc tiêu chuẩn mobic (0,2 mg/kg) khá rõ rệt qua phân tích mô bệnh khớp. Mô khớp không còn thâm nhiễm tế bào lympho, bề mặt khớp nhẵn, màng syn trở lại bình thường, không có hoại tử xương, giảm tăng sản hoạt dịch và hình thành pannus, không gian khớp hoạt dịch và không gian chung đã trở lại bình thường (Hình 4Bc, 4Bd).



Hình 4. Kiểm tra mô bệnh học khớp bằng phương pháp nhuộm hematoxylin và eosin (ảnh hiển vi x 200) cho thấy tác dụng của điều trị bằng EeCN trên chuột bị viêm khớp do dùng tá dược. Ký hiệu: Khoang khớp (1), phi đại màng hoạt dịch (2), hình thành nốt sần (3), thâm nhiễm tế bào (4) và xói mòn (5).

Những thay đổi mô bệnh học khớp đã chỉ ra vai trò bảo vệ đáng kể của EeCN chống lại các tình trạng bệnh khớp. Việc giảm chấn thương mô có thể là do hoạt động chống oxy hóa bằng cách loại bỏ các gốc tự do, do hoạt tính kháng viêm của EeCN. Do đó, tác dụng điều hòa miễn dịch, chống viêm ở chuột RA của EeCN cho thấy tiềm năng điều trị viêm khớp của loại thảo dược mới này. Nhóm Mbiantcha (2017) [39] đánh giá việc điều trị viêm khớp của chiết xuất *Piptadeniastrum africanum* cho thấy nó có thể bảo vệ mô khớp, những kết quả này tương tự như kết quả của nghiên cứu của hiện tại.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng EeCN ở mức liều 300 mg/kg có hiệu quả điều trị đáng kể trên chuột bị viêm khớp do CFA gây ra, chứng minh cho tác dụng truyền thống của nó. Sự hiện diện của các hoạt chất sinh học trong EeCN như flavonoid, phenol, alkaloid, steroid, terpenoit, v.v., với tác dụng hiệp đồng của chúng đã thể hiện tiềm năng chống oxy hóa và chống viêm khớp mạnh mẽ. Những kết quả này cho thấy chiết xuất Ethanol thô từ quả *Caryota nanas* L. là ứng cử viên tiềm năng cho việc điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự từ Khoa Huyết học và Sinh hóa, Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện Quân Y 175 Tp.HCM và Viện Pasteur Tp.HCM, Phòng Thí nghiệm Công nghệ Động vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM đã hỗ trợ chúng tôi trong dự án này. Tác giả cũng gửi lời cảm ơn đến anh Nguyễn Ngọc Thanh Tú, anh Phạm Quang Tiên, chị Lâm Thị Hoàng Mến, chị Hà Thị Luận đã tham gia, hỗ trợ giúp dự án thành công

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Ruckmani, V. Meti, R. Vijayashree, R. Arunkumar, V. R. Konda, L. Prabhu, E. Madhavi, S. Devi, "Anti-rheumatoid activity of ethanolic extract of Sesamum indicum seed extract in Freund's complete adjuvant induced arthritis in Wistar albino rats", *Journal of traditional and complementary medicine*, 2018, 8(3), 377-386. DOI: 10.1016 / j.jtcme.2017.06.003.
2. L. Carmona, V. Villaverde, C. Herná ndez-García, J. Ballina, R. Gabriel, A. Laffon, "The prevalence of rheumatoid arthritis in Spain", *Scientific Reports*, 2020, 10(1), 1-9. DOI: 10.1038 / s41598-020-76511-6.
3. T.T.M. Hoa, J. Damarwan, C. S. Le, N. V. Hung, C. T. Nhi, T. N. An, "Prevalence of the rheumatic diseases in urban Vietnam: a WHO-ILAR COPCORD study", *The Journal of rheumatology*, 2003, 30(10), 2252-2256., PMID: 14528525.
4. Kobak, S. and C. Bes, "An autumn tale: geriatric rheumatoid arthritis", *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2018, 10(1), 3-11. DOI: 10.1177 / 1759720X17740075.
5. C. Alope, U. A. Ibiom, O. U. Orji, E. I. Ugwuja, N. N. Ezeani, P. M. Aja, N. A. Obasi, "Anti-arthritis potentials of ethanol and aqueous extracts of stem bark of *Cleistanthus patens* on complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats", *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 2019, 12(2). DOI: 10.1016/j.jaim.2018.12.009.
6. A. Ma, Y. Yang, Q. Wang, Y. Wang, J. Wen, Y. Zhang, "Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells", *Molecular medicine reports*, 15(6), 3615-3622, 2017. DOI: 10.3892 / mmr.2017.648.
7. X. Shen, C. Li, H. Zhao, S. Li, J. Chen, Y. Kobayashi, W.g Shen, "Inhibitory effects of a traditional Chinese herbal formula TBL-II on type II collagen-induced arthritis in mice", *Journal of ethnopharmacology*, 2011, 134(2), 399-405. DOI: 10.1016 / j.jep.2010.12.033.
8. Kadhim, M., A. Kaizal, I. Hameed, "Medicinal plants used for treatment of rheumatoid arthritis: A review", *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2016, 8(12), 1685-1694. ISSN- 0975 1556.
9. P.T.N. Trinh, N. T. T. Quynh, M. D. Tri, P. N. Minh, N. T. L. Thuy, L. H. Truong, N. N. Tuan, L. T. Dung, "New cerebroside and chondrocyte proliferation activity of *Caryota mitis* L.", *Natural product research*, 2018, 32(22), 2632-2638. DOI: 10.1080 / 14786419.2017.1375919.
10. R. Vaishnavi, V. Suneetha, "Phytochemical analysis on *Caryota nanas* (fishtail palm) fruit from VIT university campus for pharmaceutical use", *Der Pharmacia Lettre*, 2013, 5(3), 71-75. ISSN 0975-5071.
11. D. Ananth, S. Thilagar, A. Rameshkumar, R. Jeyadevi, S. B. Aseervatham, "Chemical constituents, in vitro antioxidant and antimicrobial potential of *Caryota nanas* L.", *Free Radicals and Antioxidants*, 2013, 3(2), 107-112. DOI:10.1016 / j.fra.2013.05.008.

12. M. Radhakrishnan, S. Ramesh, R. Elangomathavan, S. Patharajan, "Acute toxicity on the ethanolic fruit extracts of *Morinda* sp. in Wistar albino rats", *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2015, 6, 44-52. ISSN 0975-7538.
13. A. Sofowora, "Research on medicinal plants and traditional medicine in Africa", *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1996, 2(3), 365-372. DOI: 10.1089 / acm.1996.2.365.
14. A. Harborne, "*Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*", Springer Science & Business Media, 1998.
15. H.K. Zanu, J.K. Kagya-Agyemang, W.K.J. Kwenin, F.R.K. Bonsu, E. Antwi, S. Ateni, "Physiological response of broiler chickens to neem (*Azadirachta indica*) and akakapenpen (*Rauvolfia vomitoria*) decoctions: Performance and carcass characteristics", *International Journal of Poultry Science*, 2011, 10(9), 730 - 733. DOI: 10.3923/ijps.2011.730.733
16. M. Yadav, S. Chatterji, S. K. Gupta, G. Watal, "Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine", *Int J Pharm Pharm Sci*, 2014, 6(5), 539-42. ISSN- 0975-1491.
17. R. S. Kujur, V. Singh, M. Ram, H. N. Yadava, K. K. Singh, S. Kumari, B. K. Roy, "Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetis rats", *Pharmacognosy Journal*, 2010, 2(14), 27-32. DOI: 10.4103 / 0974-8490.69128.
18. P. Tiwari, M. Kaur, H. Kaur, "Phytochemical screening and extraction: a review", *Internationale pharmaceutica scientia*, 2011, 1(1), 98-106.
19. D. M. El-Tedawy, M. M. Abd-Alhaseeb, M. W. Helmy, A. I. Ghoneim, "Systemic bee venom exerts anti- arthritic and anti- inflammatory properties in a rat model of arthritis", *Biomedical Reports*, 2020, 13(4), 1-1. DOI: 10.3892 / br.2020.1327.
20. Organization, W.H., "*General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine*", World Health Organization, 2000.
21. S. A Hurst, "Declaration of Helsinki and protection for vulnerable research participants", *Jama*, 2014, 311(12), 1252-1252. DOI: 10.1001 / jama.2014.1281.
22. M.O.H. Vietnam, "*National guideline on ethics in biomedical research*". Hà Nội, 2013.
23. M. Whitehouse, "Adjuvant arthritis 50 years on The impact of the 1956 article by CM Pearson, "Development of arthritis, peri arthritis and periostitis in rats given adjuvants", *Inflammation research*, 2007, 56(4), 133-138. DOI: 10.1007 / s00011-006-6117-8.
24. B. Newbould, "Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant", *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 1963, 21(1), 127-136. DOI: 10.1111 / j.1476-5381.1963.tb01508.x.
25. N. Nagai, F. Ogata, H. Otake, N. Kawasaki, "Oral administration system based on meloxicam nanocrystals: decreased dose due to high bioavailability attenuates risk of gastrointestinal side effects", *Pharmaceutics*, 12(4), 313, 2020. DOI: 10.3390 / dược12040313.
26. N. A. Al-Affifi, A. M. Alabsi, M. M. Bakri, A. Ramanathan, "Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats", *BMC complementary and alternative medicine*, 2018, 18(1), 1-14. DOI: 10.1186 / s12906-018-2110-3 .
27. S. O. Aniagu, F. C. Nwinyi, D. D. Akumka, G. A. Ajoku, S. Dzarma, K. S. Izebe, M. Ditse, P. E. C. Nwaneri, C. Wambebe, K. Gamanie, "Toxicity studies in rats fed nature cure bitters", *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4(1), 72-78. ISSN: 1684-5315.
28. Kawakami, Y., R. Sielski, and T. Kawakami, Mouse body temperature measurement using infrared thermometer during passive systemic anaphylaxis and food allergy evaluation, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 139, e58391, 2018. DOI: 10.3791 / 58391.
29. J. Alam, I. Jantan, E. Kumolosasi, M. A. Nafiah, M. A. Mesaik, "Suppressive effects of the standardized extract of *Phyllanthus amarus* on type ii collagen-induced rheumatoid arthritis in sprague dawley rats", *Current pharmaceutical biotechnology*, 2018, 19(14), 1156-1169. DOI: 10.2174 / 1389201020666181211124954.
30. Bihani, G.V., S.R. Rojatar, S.L. Bodhankar, "Anti-arthritic activity of methanol extract of *Cyathocline purpurea* (whole plant) in Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats", *Biomedicine & Aging Pathology*, 2014, 4(3), 197-206. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2014.04.007>.

31. M. S. Elsheem, A. H. Hasanin, A. Mansour, S. I. Mehrez, M. Abdel-Bary, "Etanercept improved anemia and decreased hepcidin gene expression in a rat model of rheumatoid arthritis", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 112, 108740. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108740.
32. X. Cui, R. Wang, P. Bian, Q. Wu, V. D. D. Seshadri, L. Liu, "Evaluation of antiarthritic activity of nimbolide against Freund's adjuvant induced arthritis in rats", *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 2019, 47(1), 3391-3398. DOI: 10.1080 / 21691401.2019.1649269.
33. C. Das, A. Bose, D. Das, "Ayurvedic Balarista ameliorate anti-arthritis activity in adjuvant induced arthritic rats by inhibiting pro-inflammatory cytokines and oxidative stress", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2021, 11(3), 228-237. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.04.006>.
34. J. Hoff, "Methods of blood collection in the mouse", *Animal*, 2000, 29(10): 47-53.
35. V. Akhouri, M. Kumari, A. Kumar, "Therapeutic effect of Aegle marmelos fruit extract against DMBA induced breast cancer in rats", *Scientific Reports*, 2020, 10(1), 1-12. DOI: 10.1038 / s41598-020-72935-2.
36. L. S. Yazan, Y. S. Ong, N. E. Zaaba, R. M. Ali, J. B. Foo, Y. S. Tor, "Anti-breast cancer properties and toxicity of Dillenia suffruticosa root aqueous extract in BALB/c mice", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015, 5(12), 1018-1026. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.008>.
37. A. K. Srivastav, R. Singh, S. Manimegalai, V. D. Rajeswari, "Identification of flavonoids in methanolic extract of Caryota nanas (fish tail palm): a phytochemical screening involving structure analysis by FTIR spectroscopy", *Research Journal of Phytochemistry*, 2015, 9(3), 127-136. DOI:10.3923 / rjphyto.2015.127.136.
38. M. Manan, U. Saleem, M. S. H. Akash, M. Qasim, M. Hayat, Z. Raza, B. Ahmad, "Antiarthritic Potential of Comprehensively Standardized Extract of Alternanthera bettzickiana: In Vitro and In Vivo Studies", *ACS omega*, 2020, 5(31), 19478-19496. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01670>.
39. M. Mbiantcha, J. Almas, S. U. Shabana, D. Nida, F. Aisha, "Anti-arthritis property of crude extracts of Piptadeniastrum africanum (Mimosaceae) in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats". *BMC complementary and alternative medicine*, 2017, 17(1), 1-16. DOI: 10.1186 / s12906-017-1623-5.
40. S. Naik, S. Wala, "Arthritis, a complex connective and synovial joint destructive autoimmune disease: animal models of arthritis with varied etiopathology and their significance", *Journal of postgraduate medicine*, 2014, 60(3), 309. ISSN: 0022-3859.
41. P. Mondal, S. Das, K. Mahato, S. Borah, J. A. Junejo, K. Zaman, "Evaluation of anti-arthritis potential of the hydro-alcoholic extract of the stem bark of plumeria rubra in freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2016, 7(9), 3675. ISSN: 0975-8232.
42. A. A. Adeneye, A. I. Oreagba, I. O. Ishola, H. A. Kalejaiye, "Evaluation of the anti-arthritis activity of the hydroethanolic leaf extract of Alchornea cordifolia in rats", *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2014, 11(2), 402-410. DOI: 10.4314 / ajtcam.v11i2.26.
43. T. K. Das, D. Banerjee, D. Chakraborty, M. C. Pakhira, B. Shrivastava, R. C. Kuhad, "Saponin: Role in animal system", *Veterinary World*, 2012, 5(4), 248. DOI: 10.5455/vetworld.2012.248-254.
44. X. Li, Z. Wu, B. He, W. Zhong, "Tetrandrine alleviates symptoms of rheumatoid arthritis in rats by regulating the expression of cyclooxygenase - 2 and inflammatory factors", *Experimental and therapeutic medicine*, 2018, 16(3), 2670-2676. DOI: 10.3892 / etm.2018.6498.
45. I. B. McInnes, G. Schett, "The pathogenesis of rheumatoid arthritis", *New England Journal of Medicine*, 2011, 365(23), 2205-2219. DOI: 10.1056 / NEJMra1004965.
46. C. Sahlmann P. Ströbel, "Pathophysiology of inflammation", *Nuklearmedizin*, 2016, 55(1), 1-6. PMID: 26875429.
47. M. Yu, I. Gouvinhas, J. Rocha, A. I. Barros, "Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources", *Scientific reports*, 2021, 11(1), 1-14. DOI: 10.1038 / s41598-021-89437-4.
48. D. Modak, S. Paul, S. Sarkar, S. Thakur, S. Bhattacharjee, "Validating potent anti-inflammatory and anti-rheumatoid properties of Drynaria quercifolia rhizome methanolic extract through in vitro, in vivo, in silico and GC-MS-based profiling", *BMC complementary medicine and therapies*, 2021, 21(1), 1-20. DOI: 10.1186 / s12906-021-03265-7.

49. A. M. Uttra, Alamgeer, M. Shahzad, A. Shabbir, S. Jahan, I. A. Bukhari, A. M. Assiri, "Ribes orientale: A novel therapeutic approach targeting rheumatoid arthritis concerning pro-inflammatory cytokines, inflammatory enzymes and anti-inflammatory cytokines", *Journal of ethnopharmacology*, 2019, 237, 92-107. DOI: 10.1016 / j.jep.2019.03.019.

ANTI-ARTHRITIC POTENTIAL OF CRUDE EXTRACT OF FISHTAIL BRUSH FRUITS ON COMPLETE FREUND'S ADJUVANT-INDUCED RHEUMATOID ARTHRITIS IN MICE

PHUONG-NHUNG TRAN THI

*Institute of Food and Biotechnology, Industrial University of Ho Chi Minh City
tranthiphuongnhung@iuh.edu.vn*

Abstract. *Caryota nanas* Lour is one of the most popular plants in Vietnam. Vietnamese people usually use *C. nanas* as a traditional medicine to treat arthritis, gastritis, scabies, and boils, or natural pain relief. However, the anti-arthritic effect of *C. nanas* fruit extract has not been scientifically proven or documented yet. The current study evaluated the ameliorative effect of crude extract of *Caryota nanas* L. fruits (EeCN) (with three doses of about 100, 200, and 300 mg/kg body weight) on the arthritis model induced by Freund's complete adjuvant. The changes in paw circumference and diameter, arthritis index and score, inflammatory parameter, and histological changes in the joint tissue of experimental groups were recorded. Unlike the untreated group, the group treated with EeCN showed a significant decrease in the relative weight of thymus and spleens (6.32% and 7.09%, respectively), body and paw temperature (1.4°C và 1.3°C), paw circumference and diameter (10.34 mm and 8.89 mm), arthritis index and score (17.25 and 7.87), WBCs, ESR, RF, CRP levels (2.94×10^3 cells/mm³, 2.41 mm/hr, 6.71 mg/L, and 6.27 mg/L, respectively) ($p < 0.001$), and remarkably increased body weight (13.57%), RBC level (2.96×10^6 cells/mm³) ($p < 0.001$). Histopathological examination showed a gross reduction in synovial inflammation and cartilage damage, as well as a significant improvement in joint space. The crude ethanol extract of *Caryota nanas* L. fruit (300 mg/kg) has the potential for the treatment of arthritis; it could be a promising candidate for the management of arthritis.

Keywords: *Caryota nanas* L., CFA, rheumatoid arthritis

Ngày gửi bài: 26/08/2021

Ngày chấp nhận đăng: 12/03/2022