

## TÁC DỤNG CỦA DỊCH CHIẾT VỎ QUẢ *ANNONA SQUAMOSA* L. TRONG PHÒNG VÀ ĐIỀU TRỊ VIÊM KHỚP DẠNG THẤP TRÊN CHUỘT

TRẦN THỊ PHƯƠNG NHUNG, NGUYỄN THỊ TRANG, TRẦN THỊ HẢI YẾN, TRẦN THỊ MINH TRANG, NGUYỄN THỊ THU THUYẾT, DƯƠNG THỊ THU THẢO, TRẦN THỊ THẢO VY, NGUYỄN THANH THUẬN, TÓNG THỊ THÙY DƯƠNG, HỒ THỊ THANH THANH, LÂM THƯỢNG PHÚ, NGUYỄN THỊ BẠCH TRANG, ĐẶNG PHÚ TÀI, LÂM THỊ HOÀNG MẾN, HÀ THỊ LUẬN, NGUYỄN NGỌC THANH TỬ, PHẠM QUANG TIẾN, CHÂU LỆ BÌNH

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

**Tóm tắt.** *Annona squamosa* là loại cây ăn quả nhiệt đới, thuộc họ *Annonaceae*, rất phổ biến ở Việt Nam. Chiết xuất ethanol từ vỏ quả *Annona squamosa* (AS) có chứa phenolic, alkaloids, coumarins, flavonoid, saponin, steroid, terpenoids, acid kaurenoic có khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm [1,2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết lập mô hình gây bệnh viêm khớp dạng thấp trên chuột với FCA và đánh giá hiệu quả của dịch chiết vỏ quả AS trong phòng và điều trị bệnh. Sau 14 tuần thí nghiệm, tác dụng của dịch chiết vỏ quả AS (400mg/kg thể trọng) đã làm thay đổi trọng lượng cơ thể, trọng lượng tuyến ức và lá lách, số lượng WBC, RF, CRP trong máu, đường kính khớp, nhiệt độ bàn chân, thể tích cẳng chân của chuột bị bệnh. Phân tích mô học sụn khớp cho thấy tác dụng của dịch chiết AS đã ức chế sự xâm lấn của tế bào miễn dịch vào chất nền khớp, làm giảm sự hình thành mảng sợi và phục hồi cấu trúc màng sụn. Do đó, chiết xuất ethanol vỏ quả AS giúp ngăn ngừa sự phát triển tế bào viêm trong viêm khớp dạng thấp, tăng số lượng bạch cầu và tăng khả năng miễn dịch của cơ thể.

**Từ khóa.** Viêm khớp dạng thấp, *Annona squamosa*, chất bổ trợ Freund's

### EFFECTS OF FRUIT PEEL EXTRACTS OF *ANNONA SQUAMOSA* L. FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS IN MICE

**Abstract.** *Annona squamosa* is a tropical fruit tree, it belongs to the *Annonaceae* family, which is very common in Vietnam. Fruit peel extracts of *Annona squamosa* (AS) contains phenolic, alkaloids, coumarins, flavonoid, saponin, steroid, terpenoids, and acid kaurenoic; it has antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory effects [1,2]. In this study, rheumatoid arthritis mouse model was established by Freund's complete adjuvant (FCA) and the effect of fruit peel extracts of *Annona squamosa* for the prevention and treatment of rheumatoid arthritis were evaluated. After 14 weeks, the fruit peel extracts AS (400mg/kg body weight) altered the body weight, thymus and spleen weights, blood WBC, CRP, RF number, diameter of joints, temperature and volume of foot induced by FCA. Histological analysis revealed that fruit peel extracts of AS inhibited invasion of the immune cells into the joint substrate, reduced the fiber formation and restored cartilage structure synovial membrane. Therefore, AS fruit peel extract prevents inflammatory cell growth of rheumatoid arthritis, increases the number of leukocytes and improves the body's immunity.

**Keywords.** Rheumatoid arthritis, *Annona squamosa*, Freund's complete adjuvant.

### 1. GIỚI THIỆU

Viêm khớp dạng thấp (RA) là bệnh tự miễn, xảy ra khi hệ thống miễn dịch bị rối loạn và tấn công nhầm vào các mô nối khớp của chính cơ thể dẫn đến màng hoạt dịch dày lên, chất lỏng tích tụ và bị viêm đặc hiệu, gây tổn thương sụn khớp và đầu xương dưới sụn [3]. Quá trình viêm ở tổ chức được khởi động bởi tế bào  $T_{CD4+}$  xâm nhập màng hoạt dịch. Lympho bào  $T_{CD4+}$  được hoạt hóa bởi kháng nguyên gây viêm khớp (vi khuẩn, virus, tự kháng nguyên) tiết ra nhiều chất trung gian hóa học (TNF, interleukin-1...) tác động lên hàng loạt tế bào (tế bào nội mô, tế bào màng khớp). Các tế bào này tương tác hình thành mảng sợi, phá hủy sụn khớp [4]. Hàng năm, bệnh RA gây viêm, hủy hoại, làm biến dạng khớp và ảnh hưởng đến khoảng 1% dân số thế giới [5]. Tỷ lệ mắc bệnh xảy ra ở trẻ em rất cao chiếm khoảng 0.008 đến 0.266 trên 1000 trẻ em mỗi năm [6].

Trong Tây y đã có nhiều loại thuốc tổng hợp được sử dụng để chữa trị RA như Osteomove, Mobic... với hiệu quả đạt 95% [7]. Gần đây, việc áp dụng các biện pháp chữa bệnh dân gian trong y học phương Đông truyền thống cũng được công nhận là biện pháp hỗ trợ để phòng ngừa và điều trị viêm khớp dạng thấp hữu hiệu. Nọc ong đã được sử dụng tiêm vào huyết đạo truyền thống (Zusanli) giúp giảm đau, giảm viêm, giảm phù nề trong điều trị viêm khớp dạng thấp [8]. Khi sử dụng nọc ong tiêm vào huyết Zusanli ở hai đầu gối của chuột bị RA (do FCA gây ra) đã làm ức chế các cytokine tiền viêm, các TNF- $\alpha$ , giảm sự xâm nhiễm tế bào lympho vào mô sụn khớp [9]. Nọc ong giúp giảm đau, giảm viêm, giảm thể tích chân chuột, cải thiện khả năng vận động [10]. Khảo sát tác dụng chống viêm của dịch chiết *Punica granatum* L. với thành phần giàu chất tannin (PGTF) trong mô hình chữa bệnh RA trên chuột đã cho thấy nồng độ protein phản ứng C (CRP), yếu tố thấp khớp (RF), các loại Oxy phản ứng (ROS), các loại Nitơ phản ứng (RNS), các enzym lysosome trong huyết thanh giảm đáng kể. Hơn nữa, chỉ số viêm khớp, mức độ phù nề chân, tỷ lệ lắng đọng Erythrocyte (ESR), hydroxyproline niệu, lượng bạch cầu, trọng lượng cơ thể được cải thiện đáng kể ở nhóm bệnh lý so với nhóm đối chứng [11]. Tác dụng chống viêm của chiết xuất ethanol 95% của EFC (chiết xuất *Fagopyrum cymosum*) trên mô hình chuột bị bệnh RA gây ra bởi FCA được thể hiện rõ sau 28 ngày chữa bệnh. EFC đã ức chế đáng kể tình trạng sưng chân sau, giảm trọng lượng, độ nhớt trong huyết tương, nồng độ interleukin-1 (IL-1) và yếu tố hoại tử khối u- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) trong huyết thanh của chuột. Từ đó kết luận, *F. cymosum* có hiệu quả trong việc ngăn chặn sự phát triển và tiến triển của viêm khớp thực nghiệm [12]. Các kết quả trên cũng được thể hiện qua nghiên cứu tác dụng bảo vệ của chiết xuất *Asarum* [13] và *Nyctanthes arbor-tristis* (NAT) trên chuột bị bệnh RA gây ra bởi FCA [14].

*Annona squamosa* (AS) là loại cây ăn quả và cây thuốc tự nhiên rất phổ biến. Lá cây được sử dụng như là chất diệt cỏ, chữa áp xe và ung thư..., vỏ quả được dùng để chữa đau răng, chống viêm nhiễm..., hạt được sử dụng để diệt côn trùng gây hại.... [15]. Đánh giá phytochemical (thành phần hóa học trong thực vật) của vỏ quả AS cho thấy sự hiện diện của các hoạt chất phenolic, alkaloids, anonaine, higenamin, roemerine, noreorydine, corydine, norisocorydine, isocorydine, glaucine, vitamin-c.  $\alpha$ - và  $\beta$ -pinine, limonene,  $\beta$ -farnesene,  $\beta$ -quả cây AS nguyên chất cho thấy trong vỏ quả AS các hợp chất có hoạt tính sinh học như phenolic, alkaloids, flavonoid, terpenoids, cyclopeptide ... có tác dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn hữu hiệu [17]. Cyclopeptide tự nhiên phân lập từ hạt của AS là cyclosquamosin D ( $A_1$ ) có tác dụng ức chế sự sản xuất các cytokine gây viêm trong lipopolysaccharide và các đại thực bào J347 của Pam3 Cys [18]. Có 19 loại alkaloids được phân lập từ AS, đa số là aporphine, ALKs được phân lập từ lá hoặc thân cây, là thành phần hoạt tính với các hoạt động như chống tăng huyết áp, chống co thắt, kháng histamine, chống viêm [19]. DITs (diterpenes) được tìm thấy ở nhiều phần khác nhau của AS, phần lớn trong số đó là entkaurane DIT. DITs cho thấy hoạt động chống viêm, chống lại các tế bào ung thư phổi, buồng trứng [20].

Gần đây, nhiều chiết xuất từ cây thuốc dân gian đã được nghiên cứu và chứng minh hiệu quả. Tuy nhiên, tác dụng chống viêm, giảm đau của chiết xuất từ vỏ quả *Annona squamosa* L. chưa được nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập một mô hình viêm khớp dạng thấp do FCA gây ra và nghiên cứu tác dụng của chiết xuất vỏ quả AS trong việc phòng và điều trị RA.

## 2. PHẦN CHÍNH

### 2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1.1. Nguyên liệu thực vật

Quả *Annona squamosa* L. (AS) được thu hoạch ở tỉnh Tây Ninh (Việt Nam). Mỗi quả có trọng lượng trung bình khoảng 200 - 250g, đường kính 7.5 cm. Vỏ quả AS được rửa, bóc vỏ và sấy khô ở 60°C cho đến khi đạt được độ ẩm  $\leq$  12%, nghiền thành bột có kích thước  $<$  0.5 mm. Bột AS được đóng gói trong chân không và bảo quản ở nhiệt độ phòng dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Chuẩn bị dịch chiết AS: Bột vỏ AS được chiết xuất với dung môi ethanol 60%, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 25/1 (v/w), thời gian chiết 5 phút, công suất vi sóng là 214 W (lò vi sóng Sanyo, Nhật Bản). Thu

dịch chiết xuất và lọc qua giấy Whatman số 4, đem xác định tổng hàm lượng phenolic (TPC) và dùng cho các thí nghiệm sau.

Phân tích tổng hàm lượng phenolic (TPC): Xác định theo phương pháp Folin Ciocalteu (FC). Cho 0.1ml dịch chiết phản ứng với 1.8 ml FC 10%, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, thêm 1.200 ml Natri cacbonat (15%, w/v). Hỗn hợp để yên trong bóng tối 90 phút đo độ hấp thụ ở bước sóng 765nm. Xây dựng đường chuẩn bằng acid galic và TPC được tính theo mg GAE/g CK (GAE: galic acid equivalent, CK: chất khô) [21]. Dịch chiết vỏ quả AS thu nhận tại phòng thí nghiệm phân tích sinh hóa trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh (F7.5) có chứa lượng phenolic tổng là 40.22 mg GAE/g.

### 2.1.2. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng Swiss (30 - 32 g) được Viện Pasteur Tp. HCM cung cấp. Chuột được nuôi trong lồng polypropylene tiêu chuẩn, lót bằng vỏ dăm bào. Nhà nuôi chuột được duy trì điều kiện chiếu sáng với chu kỳ sáng/tối 12h/12h, ở nhiệt độ khoảng  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm tương đối  $55 \pm 5\%$ . Chuột được cung cấp chế độ ăn uống trong phòng thí nghiệm tiêu chuẩn. Chuột thí nghiệm được phân ngẫu nhiên cho các nhóm khác nhau và được nuôi trong 1 tuần để thích ứng với điều kiện sống. Quy trình thử nghiệm tuân thủ nghiêm ngặt theo Tuyên bố Helsinki (1975) [22].

### 2.1.3. Thuốc và hóa chất

Chất bổ trợ của Freund's (FCA) sử dụng *Mycobacterium tuberculosis* chết nhiệt trong parafin lỏng ở nồng độ 10 mg/ml, được nhũ hóa trong dầu khoáng. FCA được cung cấp bởi Sigma Santa Clara, CA (D2354, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ).

Mobic hay còn gọi là Meloxicam [4-hydroxy-2-metyl-N-(5-metyl-2-tiazolyl)-2H-1, 2-benzothiazin-3-cacboxamit-1,1-dioxit], là loại thuốc chống viêm không steroid, có tác dụng giảm đau và chống viêm xương khớp. Mobic được sử dụng trong kiểm soát dương tính (thuốc đối chứng) trong nghiên cứu này. Mobic được cung cấp bởi Boehringer Ingelheim Espana S.A.

Thuốc thử Folin-Ciocalteu được mua từ Merck (Đức). Một thuốc thử trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic, độ tinh khiết: 97%) đã được mua từ Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ).

### 2.1.4. Thiết kế thí nghiệm cảm ứng thực nghiệm của viêm khớp

30 con chuột thí nghiệm được cho uống dịch chiết vỏ quả AS với liều lượng 200mg/kg thể trọng để phòng bệnh và 5 con chuột được cho ăn, uống bình thường (đối chứng), theo dõi trong 4 tuần [23,24,25,37]. Sau đó, 30 con chuột trên được gây bệnh RA (bởi FCA) theo phương pháp của Ekambaram và cộng sự [26], theo dõi đến tuần 6. Tiếp tục điều trị chuột bị bệnh RA với dịch chiết vỏ quả AS (liều 200, 300, 400 mg/kg thể trọng), theo dõi đến tuần 18 [27].

**Nhóm thực nghiệm:** Chuột thí nghiệm được chia vào các nhóm (thuộc các giai đoạn khác nhau).

Giai đoạn phòng bệnh: Chuột được chia vào 2 nhóm

Nhóm đối chứng (nhóm bình thường): 5 con chuột ăn, uống bình thường, khảo sát trong 4 tuần.

Nhóm uống dịch chiết vỏ quả AS (nhóm AS): 30 con chuột được cho uống dịch chiết vỏ quả AS (200mg/kg thể trọng), khảo sát trong 4 tuần.

Giai đoạn gây bệnh (nhóm RA): 30 con chuột nhóm AS được tiêm 0.1 ml FCA/con gây bệnh RA, khảo sát đến tuần thứ 6.

Giai đoạn chữa bệnh: 30 con chuột bị bệnh RA (nhóm RA) chia vào các nhóm, khảo sát đến tuần thứ 18.

Nhóm bệnh (đối chứng âm): chuột uống nước (200 ml/con)

Nhóm Mobic (đối chứng dương): chuột uống 1 mg/kg thể trọng /con thuốc Mobic

Nhóm ASL: chuột uống 200 mg/kg thể trọng /con dịch chiết vỏ quả AS

Nhóm ASM: chuột uống 300 mg/kg thể trọng /con dịch chiết vỏ quả AS

Nhóm ASH: chuột uống 400 mg/kg thể trọng /con dịch chiết vỏ quả AS

Hoạt tính phòng và chống bệnh RA của dịch chiết vỏ quả AS được xác định bằng cách đánh giá trọng lượng cơ thể, đường kính khớp, thể tích (mức độ phù nề) cẳng chân, nhiệt độ bàn chân vào các tuần thứ 0, 4, 6, 10, 14 và 18. Phân tích huyết học và sinh hóa máu, đánh giá mô học khớp được thực hiện vào các tuần thứ 0, 4, 6 và 18 của quá trình nghiên cứu.

### 2.1.5. Đánh giá các thông số thực nghiệm [27]

**Trọng lượng, nhiệt độ, đường kính, thể tích:** Mức độ nghiêm trọng của viêm khớp và khả năng hồi phục của khớp được xác định bởi sự thay đổi trọng lượng cơ thể, nhiệt độ bàn chân, đường kính khớp, thể tích cẳng chân. Các thông số trên được đo vào các tuần thứ 0, 4, 6, 10, 14 và 18 của quá trình nghiên cứu. Sử dụng thước đo kỹ thuật số verniercalliper đo đường kính khớp cổ chân tại vùng cẳng - bàn chân [11]. Đo mức độ phù nề (thể tích) cẳng chân chuột bằng phương pháp đo thể tích nước sử dụng plethysmometer (UGO BASIL) [28].

Sử dụng nhiệt kế hồng ngoại Microlife FR1MF11 để đo nhiệt độ bàn chân [29].

**Phân tích huyết học và sinh hóa máu:** Vào thời điểm cuối tuần thứ 0, 4, 6 và 18 của quá trình thí nghiệm, chuột được gây mê và được thu nhận máu từ tĩnh mạch đuôi. Máu được đựng trong ống tráng K<sub>2</sub>EDTA, được bảo quản lạnh ở 4°C. Sau đó, mẫu được gửi đến khoa huyết học và sinh hóa, bệnh viện 175 Thành phố Hồ Chí Minh để phân tích và đọc kết quả [30].

**Đánh giá mô học:** Thu nhận mô khớp chuột vào cuối tuần thứ 0, 4, 6 và 18 của quá trình thí nghiệm. Mô khớp của chuột được cố định trong formalin 10%. Sau đó, mẫu được gửi đến khoa giải phẫu bệnh, bệnh viện 175 Thành phố Hồ Chí Minh để nhuộm mẫu mô và đọc kết quả [31].

### 2.1.6. Phân tích thống kê

Các kết quả thực nghiệm được biểu diễn dưới dạng  $\bar{X} \pm SE$ . Dữ liệu được phân tích thống kê bằng cách phân tích ANOVA. Mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác giữa các nghiệm thức là  $p < 0.05$ .

## 2.2. Kết quả và biện luận

### 2.2.1. Trọng lượng cơ thể

Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch chiết AS lên trọng lượng cơ thể ở chuột

Giai đoạn	Nhóm thí nghiệm	Thời gian					
		0 tuần	4 tuần	6 tuần	10 tuần	14 tuần	18 tuần
Phòng bệnh	Nhóm bình thường	30.88 <sup>a</sup> ±0.51	31.37 <sup>b</sup> ±0.68				
	Nhóm AS	31.39 <sup>a</sup> ±0.62	32.75 <sup>b</sup> ±0.81				
Gây bệnh	Nhóm RA			31.24 <sup>c</sup> ±0.54			
	Nhóm bệnh				31.11 <sup>d</sup> ±0.63	30.57 <sup>d</sup> ±0.34	30.24 <sup>dA</sup> ±0.47
Chữa bệnh	Nhóm ASL				31.77 <sup>d</sup> ±0.58	32.6 <sup>e</sup> ±0.45	33.5 <sup>fB</sup> ±0.61
	Nhóm ASM				31.68 <sup>d</sup> ±0.58	33.49 <sup>e</sup> ±0.63	34.33 <sup>fC</sup> ±0.37
	Nhóm ASH				31.38 <sup>d</sup> ±0.69	33.47 <sup>e</sup> ±0.59	35.39 <sup>fD</sup> ±0.42
	Nhóm mobic				31.62 <sup>d</sup> ±0.61	32.96 <sup>e</sup> ±0.46	34.58 <sup>fE</sup> ±0.37

<sup>a,b,c,d,e,f</sup>: Các giá trị với các chữ cái khác nhau trong một hàng cho thấy kết quả khác nhau đáng kể ( $p < 0.05$ )

<sup>A,B,C,D,E</sup>: Các giá trị với các chữ cái khác nhau trong một cột cho thấy kết quả khác nhau đáng kể ( $p < 0.05$ )

Trọng lượng cơ thể chuột thuộc nhóm AS ở tuần thứ 4 tăng  $1.38 \pm 0.13$ g so với nhóm bình thường ( $p < 0.02$ ). Chiết xuất ethanol vỏ quả đã AS kích thích hoạt động tiêu hóa giúp trọng lượng cơ thể tăng. 2 tuần sau khi chuột bị bệnh RA gây ra bởi FCA (tuần 6), trọng lượng cơ thể giảm đáng kể ( $p < 0.05$ ) ở nhóm RA ( $32.75 \pm 0.81$ ) so với nhóm AS ( $31.24 \pm 0.54$ ). Giai đoạn điều trị với dịch chiết AS, trọng lượng cơ thể chuột ở các nhóm ASL, ASM, ASH đã tăng lên. Tuần 18, chuột nhóm ASH có trọng lượng cơ thể đạt  $35.39 \pm 0.42$ g cao hơn nhóm được uống mobic  $34.58 \pm 0.37$ g (đối chứng dương,  $p < 0.01$ ). Trong khi đó, trọng lượng cơ thể chuột ở nhóm bệnh giảm mạnh chỉ còn  $30.24 \pm 0.47$ g.

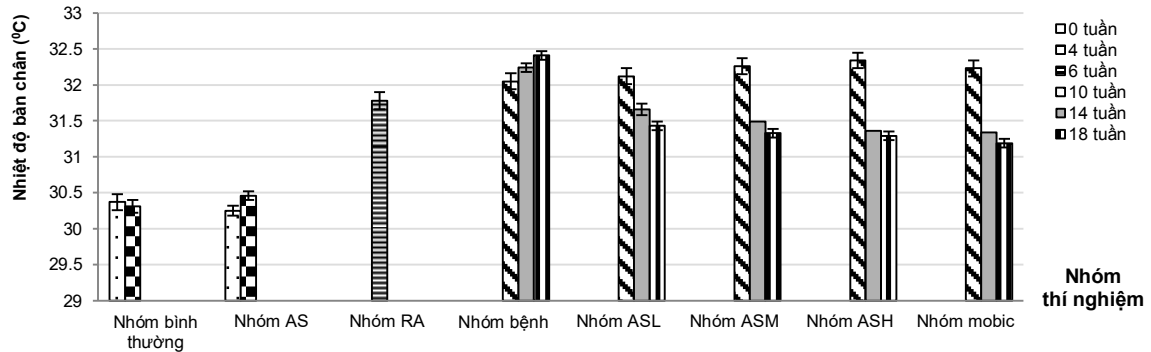
Trọng lượng cơ thể chuột bị giảm thường quan sát và biểu hiện rõ rệt khi bệnh RA tiến triển và là một trong những triệu chứng phổ biến nhất được quan sát thấy trong viêm khớp nặng. Trọng lượng cơ thể giảm do sự thay đổi trong cách ăn uống của chuột bị bệnh. Vào thời điểm này, khớp của chuột bị sưng, nóng, đỏ, đau nhức làm chúng biếng ăn, ít vận động. Việc bổ sung dịch chiết AS làm tăng quá trình trao đổi chất, ngăn chặn sự tạo ra các gốc tự do oxy hóa (ROS) trong các mô của chuột bị viêm khớp, có lợi cho sự tổng hợp vật chất trong cơ thể [27].

### 2.2.2. Nhiệt độ bàn chân

Nhiệt độ trung bình của bàn chân ở nhóm RA tăng  $1.32 \pm 0.06$ °C so với nhóm AS ở tuần 4 (hình 1). Bàn chân chuột đã sưng, nóng, đỏ và bị viêm do tác động của FCA. nhiệt độ bàn chân chuột bị bệnh RA sau

khi uống dịch AS đã có thay đổi đáng kể. Nhiệt độ bàn chân ở nhóm ASH đã giảm xuống chỉ còn  $31.29 \pm 0.08^\circ\text{C}$  tương đương nhóm mobic (đối chứng dương)  $31.19 \pm 0.09^\circ\text{C}$  thấp hơn hẳn so với nhóm bệnh  $32.41 \pm 0.05^\circ\text{C}$  ( $p < 0.05$ ) ở tuần 18. Điều trị RA bằng dịch AS đã giúp giảm nhiệt độ bàn chân.

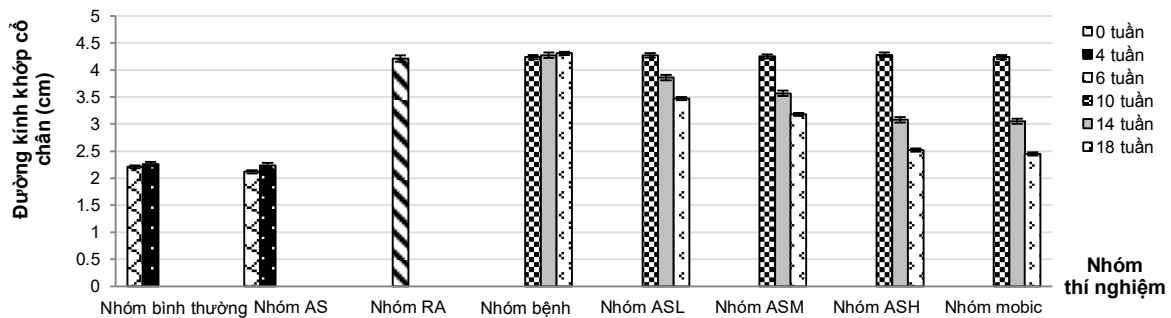
RA là một bệnh viêm khớp rối loạn tự miễn dịch do FCA gây ra. Sử dụng hệ thống nhiệt kế hồng ngoại rất nhạy cảm có thể phát hiện sự thay đổi nhiệt độ ở khớp mắt cá chân, cổ chân và bàn chân, giúp phát hiện chính xác những thay đổi nhiệt độ trong nhỏ các khu vực bề mặt khớp và bàn chân [32]. Bổ sung dịch chiết AS cho chuột bị RA đã giảm đáng kể nhiệt độ bàn chân chuột, thể hiện trạng thái viêm của khớp giảm dần.



Hình 1. Ảnh hưởng của dịch chiết AS lên nhiệt độ bàn chân chuột

### 2.2.3. Đường kính khớp

Đường kính khớp cổ chân của chuột nhóm RA (gây ra bởi FCA) tăng đáng kể ( $p < 0.01$ ) so với nhóm AS ( $tăng 1.98 \pm 0.01$  cm) và nhóm bình thường ( $tăng 1.95 \pm 0.02$  cm) (hình 2). Đường kính khớp cổ chân chuột nhóm RA sau khi tiêm FCA đạt cao nhất ( $4.21 \pm 0.06$  cm) thời điểm 6 tuần và nhóm bệnh ( $4.31 \pm 0.03$  cm) thời điểm 18 tuần. Ở các nhóm được uống dịch AS, đường kính khớp cổ chân chuột giảm đáng kể so với nhóm bệnh ( $p < 0.05$ ), giảm mạnh nhất là nhóm ASH chỉ còn  $2.52 \pm 0.04$  cm, tương đương với nhóm mobic  $2.45 \pm 0.03$  cm ( $p < 0.02$ ).



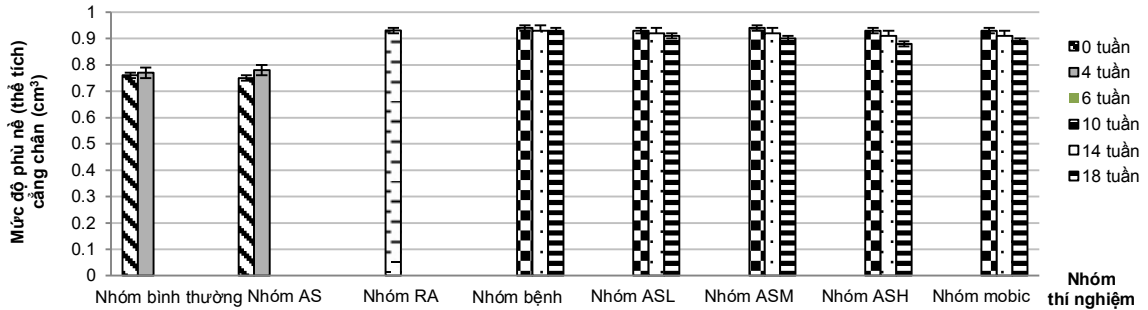
Hình 2. Ảnh hưởng của dịch chiết AS lên đường kính khớp cổ chân

### 2.2.4. Thể tích (độ phù nề) cẳng chân

Chiết xuất ethanol vỏ quả AS với liều 400mg/kg thể trọng (ASH) đã ức chế mạnh hiện tượng viêm, sưng, nóng, đỏ khớp và cẳng chân chuột, làm cho thể tích cẳng chân ở tuần 18 giảm mạnh (hình 3). Những con chuột bị RA ở trong tình trạng viêm (tuần 6) có thể tích cẳng chân tăng  $1.98 \pm 0.01$  cm<sup>3</sup> so với nhóm RA (tuần 4) ( $p < 0.05$ ). Việc cho chuột uống chiết xuất AS đã làm giảm đáng kể thể tích bàn chân chuột (nhóm ASL giảm 0.91 cm<sup>3</sup>, nhóm ASM giảm 0.9 cm<sup>3</sup>, nhóm ASH giảm 0.88 cm<sup>3</sup>) vào tuần 18. Uống thuốc mobic liều 1 mg/kg thể trọng (đối chứng dương) đã làm giảm thể tích cẳng chân chuột ở nhóm mobic xuống còn 0.89 cm<sup>3</sup> tương đương với nhóm ASH ( $p < 0.05$ ). Trong khi đó ở nhóm bệnh thể tích tăng mạnh lên 0.93 cm<sup>3</sup>. Chiết xuất ethanol vỏ quả AS ức chế viêm, giúp hồi phục khớp.

Bàn chân chuột sưng, đỏ, nóng do tác dụng của FCA cho thấy tình trạng viêm nghiêm trọng. Mức độ nghiêm trọng của viêm khớp có thể được xác định một cách khách quan bằng cách đo độ dày và thể tích

bàn chân [27]. Trong nghiên cứu này, bổ sung dịch AS làm giảm rõ rệt thể tích cẳng chân. Bàn chân của chuột được điều trị bằng dịch AS cho thấy tình trạng viêm giảm đáng kể.



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch chiết AS lên thể tích cẳng chân chuột

### 2.2.5. Huyết học và sinh hóa máu

Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết AS lên chỉ số WBC trong máu

Chỉ tiêu	Giai đoạn	Nhóm thí nghiệm	Thời gian			
			0 tuần	4 tuần	6 tuần	18 tuần
Phòng bệnh		Nhóm bình thường	3.76 <sup>a</sup> ±0.07	3.67 <sup>a</sup> ±0.06		
		Nhóm AS	3.49 <sup>a</sup> ±0.06	3.95 <sup>b</sup> ±0.08		
Hàm lượng WBC (x10 <sup>3</sup> tb/mm <sup>3</sup> )	Gây bệnh	Nhóm RA			9.54 <sup>c</sup> ±0.05	
		Nhóm bệnh				8.24 <sup>dA</sup> ±0.07
	Chữa bệnh	Nhóm ASL				6.75 <sup>dB</sup> ±0.06
		Nhóm ASM				5.93 <sup>dC</sup> ±0.07
		Nhóm ASH				4.89 <sup>dD</sup> ±0.42
		Nhóm mobic				4.58 <sup>dE</sup> ±0.37

<sup>a,b,c</sup>: Các giá trị với các chữ cái khác nhau trong một hàng cho thấy kết quả khác nhau đáng kể ( $p < 0.05$ )

<sup>A,B,C,D,E</sup>: Các giá trị với các chữ cái khác nhau trong một cột cho thấy kết quả khác nhau đáng kể ( $p < 0.05$ )

Lượng WBC của nhóm AS tăng cao hơn so với nhóm bình thường (tăng  $0.28 \pm 0.02 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ) (bảng 2). Phản ứng viêm khớp (do tác dụng của FCA) đã làm tăng đáng kể số lượng bạch cầu. Lượng WBC của nhóm RA đạt  $9.54 \pm 0.05 (\times 10^3 \text{tb/mm}^3)$  vào tuần thứ 6 tăng cao rất nhiều so với nhóm AS ( $3.95 \pm 0.08 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ) ở tuần thứ 4 ( $p < 0.05$ ). Điều trị bằng dịch AS cho thấy giảm đáng kể về số lượng WBC, nhóm ASH lượng WBC giảm chỉ còn  $4.89 \pm 0.42 (\times 10^3 \text{tb/mm}^3)$ , tương đương với nhóm mobic  $4.58 \pm 0.37 (\times 10^3 \text{tb/mm}^3)$  ( $p < 0.01$ ). Trong khi đó, nhóm bệnh không được điều trị lượng WBC đã tăng rất mạnh  $8.24 \pm 0.07 (\times 10^3 \text{tb/mm}^3)$ .

Sự gia tăng số lượng WBC ở chuột bị bệnh viêm khớp dạng thấp là do sự kích thích của hệ thống miễn dịch chống lại sự xâm nhập kháng nguyên [33]. Tăng WBC là do kích thích hệ thống miễn dịch chống lại các vi sinh vật gây bệnh xâm nhập [34]. Số lượng WBC tăng và di chuyển bạch cầu vào khu vực bị viêm của chuột bị viêm khớp đã được ngăn chặn đáng kể với việc xử lý chiết xuất AS.

Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch chiết AS đến các loại bạch cầu trong máu chuột

Chỉ tiêu	Giai đoạn	Nhóm thí nghiệm	Thời gian			
			0 tuần	4 tuần	6 tuần	18 tuần
Phòng bệnh		Nhóm bình thường	4.05 <sup>a</sup> ±0.05	4.13 <sup>a</sup> ±0.04		
		Nhóm AS	4.07 <sup>a</sup> ±0.02	4.12 <sup>a</sup> ±0.03		
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> tb/mm <sup>3</sup> )	Gây bệnh	Nhóm RA			5.51 <sup>b</sup> ±0.04	
		Nhóm bệnh				5.58 <sup>cA</sup> ±0.04
	Nhóm ASL				4.41 <sup>cB</sup> ±0.07	

Chữa bệnh	Nhóm ASM	4.29 <sup>cC</sup> ±0.06	
	Nhóm ASH	4.13 <sup>cD</sup> ±0.09	
	Nhóm mobic	4.08 <sup>cD</sup> ±0.08	
Phòng bệnh	Nhóm bình thường 2	0.053 <sup>a</sup> ±0.002	0.054 <sup>a</sup> ±0.001
	Nhóm AS 1	0.051 <sup>a</sup> ±0.002	0.054 <sup>a</sup> ±0.002
Gây bệnh	Nhóm RA 5	0.084 <sup>b</sup> ±0.005	
	Nhóm bệnh	0.089 <sup>cA</sup> ±0.006	
Chữa bệnh	Nhóm ASL	0.063 <sup>cB</sup> ±0.002	
	Nhóm ASM	0.064 <sup>cB</sup> ±0.004	
	Nhóm ASH	0.051 <sup>cC</sup> ±0.003	
	Nhóm mobic	0.052 <sup>cC</sup> ±0.007	
Phòng bệnh	Nhóm bình thường 2	0.113 <sup>a</sup> ±0.002	0.115 <sup>a</sup> ±0.002
	Nhóm AS 1	0.112 <sup>a</sup> ±0.002	0.116 <sup>a</sup> ±0.003
Gây bệnh	Nhóm RA 4	0.133 <sup>b</sup> ±0.004	
	Nhóm bệnh	0.141 <sup>cA</sup> ±0.002	
Chữa bệnh	Nhóm ASL	0.125 <sup>cB</sup> ±0.004	
	Nhóm ASM	0.121 <sup>cB</sup> ±0.005	
	Nhóm ASH	0.115 <sup>cC</sup> ±0.003	
	Nhóm mobic	0.114 <sup>cC</sup> ±0.001	

<sup>a,b,c</sup>: Các giá trị với các chữ cái khác nhau trong một hàng cho thấy kết quả khác nhau đáng kể ( $p < 0.05$ )

<sup>A,B,C,D</sup>: Các giá trị với các chữ cái khác nhau trong một cột cho thấy kết quả khác nhau đáng kể ( $p < 0.05$ )

Bạch cầu các loại trong máu chuột nhóm RA đã tăng mạnh so với nhóm AS (lymphocytes tăng  $1.39 \pm 0.01 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ , monocytes tăng  $0.03 \pm 0.003 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ , granulocytes tăng  $0.017 \pm 0.001 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ) ( $p < 0.01$ ) (Bảng 3). Sau khi được uống dịch chiết AS lymphocytes của nhóm ASH đạt  $4.13 \pm 0.09 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ , tương đương với nhóm Mobic là  $4.08 \pm 0.08 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ , giảm thấp hơn nhiều so với nhóm bệnh ( $5.58 \pm 0.04 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ). Lượng monocytes cũng giảm mạnh ở các nhóm ASL (giảm  $0.021 \pm 0.003 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ), ASM (giảm  $0.022 \pm 0.001 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ), ASH ( $0.033 \pm 0.002 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ) so với nhóm RA. Lượng granulocytes ở nhóm bệnh tăng cao hơn so với nhóm RA (tăng  $0.008 \pm 0.002 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ) ( $P, 0.05$ ), nhóm ASH giảm ( $0.018 \pm 0.001 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ) và tương đương với nhóm Mobic (giảm  $0.019 \pm 0.003 \times 10^3 \text{tb/mm}^3$ ) ( $p < 0.02$ ). Tế bào bạch cầu các loại giảm dần ở những con chuột được uống dịch chiết AS cho thấy tác dụng kháng viêm của AS trong chữa trị viêm khớp dạng thấp ở chuột Swiss.

Bạch cầu hạt là quần thể bạch cầu chính liên quan đến tình trạng viêm khớp do FCA gây ra ở khớp. Các tế bào bạch cầu được tạo ra trong tủy xương và di chuyển đến vị trí viêm. Quá trình viêm ở chuột RA được đặc trưng bởi phản ứng miễn dịch do tế bào T điều khiển, góp phần vào sự khởi đầu và duy trì tình trạng viêm khớp [35]. Hàm lượng các loại bạch cầu tăng đã được quan sát do tình trạng viêm khớp. Cytokine tiền viêm như TNF  $\alpha$ , IL-1 và IL-6 tạo ra được giải phóng vào hệ thống tuần hoàn. Các cytokine lưu hành này có xu hướng làm thay đổi chức năng của các cơ quan ở xa và tạo ra một loạt các thay đổi pro-atherogen bao gồm rối loạn chức năng nội mô, kháng insulin, rối loạn lipid máu, tác dụng prothrombotic và stress oxy hóa [36]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, dịch chiết AS kiểm soát đáng kể nồng độ các loại bạch cầu theo cách phụ thuộc vào liều cho uống so với nhóm kiểm soát viêm khớp và nhóm được điều trị bằng mobic.

Bảng 4. Ảnh hưởng của dịch chiết AS lên chỉ số sinh hóa máu

Chỉ tiêu	Giai đoạn	Nhóm thí nghiệm	Thời gian			
			0 tuần	4 tuần	6 tuần	18 tuần
Hàm lượng CRP (mgL <sup>-1</sup> )	Phòng bệnh	Nhóm bình thường	-	-		
		Nhóm AS	-	-		
	Gây bệnh	Nhóm RA			2.29 <sup>a</sup> ±0.57	
		Nhóm bệnh				2.35 <sup>bA</sup> ±0.28
	Chữa bệnh	Nhóm ASL				1.7b <sup>dB</sup> ±0.24
		Nhóm ASM				1.41 <sup>bC</sup> ±0.31
		Nhóm ASH				1.19 <sup>bD</sup> ±0.42
		Nhóm mobic				1.38 <sup>bE</sup> ±0.34
		Nhóm bình thường	-	-		
	Hàm lượng RF (mgL <sup>-1</sup> )	Phòng bệnh	Nhóm bình thường	-	-	
Nhóm AS			-	-		
Gây bệnh		Nhóm RA			4.04 <sup>a</sup> ±0.26	
		Nhóm bệnh				4.38 <sup>bA</sup> ±0.39
Chữa bệnh		Nhóm ASL				3.71 <sup>bB</sup> ±0.42
		Nhóm ASM				2.46 <sup>bC</sup> ±0.52
		Nhóm ASH				1.74 <sup>bD</sup> ±0.43
		Nhóm mobic				1.62 <sup>bE</sup> ±0.61
		Nhóm bình thường	-	-		

<sup>a,b</sup>: Các giá trị với các chữ cái khác nhau trong một hàng cho thấy kết quả khác nhau đáng kể ( $p < 0.05$ )

<sup>A,B,C,D,E</sup>: Các giá trị với các chữ cái khác nhau trong một cột cho thấy kết quả khác nhau đáng kể ( $p < 0.05$ )

Hàm lượng RF và CRP trong huyết thanh của nhóm bệnh (đối chứng âm) đã tăng (RF tăng 0.34 mgL<sup>-1</sup>, CRP tăng 0.06 mgL<sup>-1</sup>) ở tuần 18 so với nhóm RA ở tuần 6 ( $p < 0.05$ ). Điều trị bằng dịch AS lượng RF và CRP đều giảm dần. Đến tuần 18 ở nhóm ASH chỉ số RF là 1.74 ± 0.43 mgL<sup>-1</sup>, CRP là 1.19 ± 0.42 mgL<sup>-1</sup> tương đương với nhóm mobic (RF: 1.62 ± 0.61 mgL<sup>-1</sup>, CRP: 1.38 ± 0.34 mgL<sup>-1</sup>) ( $p < 0.01$ ). Chuột bị viêm khớp được điều trị bằng dịch AS đã có biểu hiện hồi phục so với nhóm bệnh.

CRP là chỉ số hiệu quả của tổn thương mô hoặc viêm ở gan [37]. CRP được hình thành trong sụn và các mô xương trải qua quá trình viêm [38]. Nồng độ CRP huyết tương tăng để đáp ứng với tình trạng viêm ở RA và các bệnh viêm khác. Nồng độ CRP cao hơn trong huyết tương cho thấy những thay đổi khớp mở rộng trong viêm khớp. Synovium của các khớp bị viêm có thể kích hoạt kích hoạt các đại thực bào và nguyên bào sợi, tạo ra các tế bào này để giải phóng thêm CRP [39]. Nồng độ CRP cao hơn trong huyết tương cho thấy những thay đổi khớp mở rộng trong viêm khớp [40]. CRP, RF và các dấu hiệu viêm là chỉ số của hoạt động thấp khớp. Tăng mức độ của tất cả các thông số này xác nhận sự khởi phát của viêm khớp [25]. RF được sản xuất bởi các tế bào B đã trải qua một quá trình đột biến soma theo kháng nguyên [41]. RF là một yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của RA. Tăng RF là do kích thích hệ thống miễn dịch chống lại các vi sinh vật gây bệnh xâm nhập [36.2]. Tăng mức độ RF ở những con chuột không có triệu chứng làm tăng đáng kể nguy cơ mắc phải RA [42]. Trong nghiên cứu hiện tại, nồng độ CRP, RF đã giảm đáng kể sau khi bổ sung dịch AS.

### 2.2.6. Hình thái ngoài và mô khớp

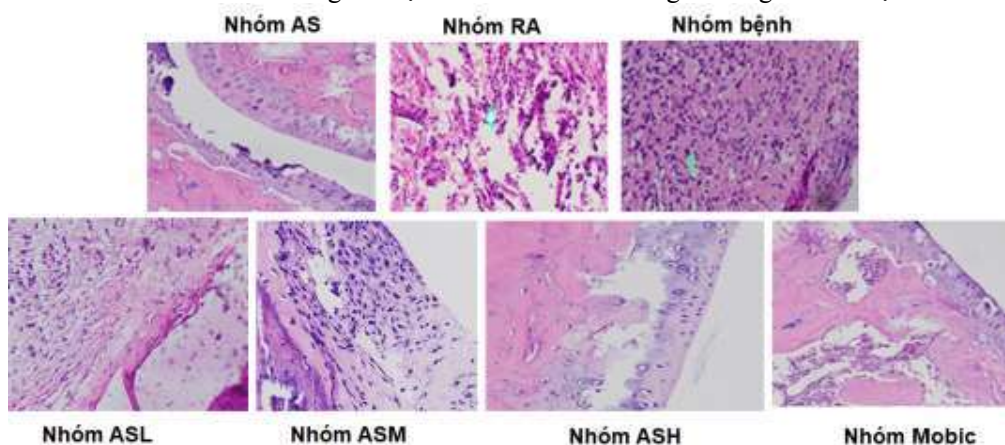
Mức độ nghiêm trọng của bệnh và ảnh hưởng của chiết xuất ethanol vỏ quả AS đối với hình thái ngoài cẳng chân chuột được thể hiện ở hình 3. Ở nhóm AS, chuột được uống dịch chiết vỏ quả AS phòng bệnh trong 4 tuần, cẳng chân, bàn và ngón chân bình thường, chuột vận động linh hoạt. Ngược lại, nhóm RA sau khi tiêm FCA, biểu hiện dấu hiệu đau khớp bao gồm sưng và đỏ ở khớp, hạn chế vận động và đau khi chạm vào, chuột đi lại khó khăn. Trạng thái viêm, sưng càng tăng lên ở nhóm bệnh sau 18 tuần theo dõi. Một số con chuột chân khớp khiếm và di chuyển xung quanh khó khăn bằng cách kéo bàn chân của chúng [27]. Ở các nhóm được uống điều trị bằng dịch chiết vỏ quả AS, các triệu chứng viêm giảm dần, thể hiện sự hồi phục khớp. Ở nhóm ASL (200 mg/kg thể trọng), cẳng chân đã bớt sưng. Nhóm ASM (300 mg/kg thể trọng) chuột vận động khá linh hoạt, chân giảm sưng, chất hoạt dịch tăng sinh, sụn khớp đã



được phục hồi. Đặc biệt ở nhóm ASH chân đã hết sưng, chuột vận động rất linh hoạt, có thể leo trèo để lấy thức ăn, tăng sinh hoạt dịch, không còn thâm nhiễm tế bào viêm. Kết quả nhóm mobic giống như nhóm ASH.



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch chiết AS hình thái ngoài cẳng chân chuột



Hình 4. Ảnh hưởng của dịch chiết AS đến cấu trúc mô khớp

Mức độ nghiêm trọng của bệnh và ảnh hưởng của chiết xuất ethanol vỏ quả AS đối với mô khớp bàn chân chuột được thể hiện ở hình 4. Ở nhóm AS, chuột được uống dịch chiết vỏ quả AS phòng bệnh trong 4 tuần, không có biểu hiện viêm, xói mòn sụn và hình thành pannus ở mô khớp. Ngược lại, nhóm RA sau khi tiêm FCA, tế bào viêm (tương bào, đại thực bào) xâm nhập vào chất nền (nhóm RA, nhóm bệnh), synoviocytes tăng sinh rõ rệt, hình thành pannus với sự ăn mòn sụn khớp. Trạng thái càng tăng lên ở nhóm bệnh sau 18 tuần theo dõi. Ở các nhóm được uống điều trị bằng dịch chiết vỏ quả AS, các triệu chứng viêm giảm dần, thể hiện sự hồi phục khớp. Ở nhóm ASL, biểu hiện thoái hóa sụn vừa phải và hình thành pannus nhẹ. Nhóm ASM chất hoạt dịch tăng sinh, sụn khớp đã được phục hồi. Đặc biệt ở nhóm ASH không còn thâm nhiễm tế bào viêm, bề mặt khớp nhẵn với sự gia tăng các lớp sụn khớp. Kết quả nhóm mobic giống như nhóm ASH.

Đánh giá mô học được thực hiện trong nghiên cứu này để xác định những thay đổi mô học về mức độ nghiêm trọng của bệnh giữa các nhóm, bao gồm viêm màng hoạt dịch, thoái hóa sụn và xói mòn xương. Màng hoạt dịch ở chuột mô khớp chuột RA dày hơn so với ở chuột đối chứng. Chứng minh sự phá hủy sụn và xương cực kỳ nghiêm trọng bên cạnh sự xâm nhập mạnh của các tế bào viêm vào khớp [27]. Tuy nhiên, ở chuột được bổ sung dịch AS, các phân tích mô bệnh học cho thấy tác dụng chống viêm mạnh, giảm đáng kể tình trạng mạch máu, sung huyết, tăng trưởng pannus, tổn thương sụn khớp và giảm không gian khớp

### 3. KẾT LUẬN

Chiết xuất ethanol vỏ quả AS liều 200, 300, 400 mg/kg thể trọng có tác dụng hiệu quả trong phòng và điều trị RA trên chuột Swiss trong mô hình viêm khớp dạng thấp bằng FCA. Sau 18 tuần chuột uống dịch AS phòng và điều trị RA đã thể hiện sự hồi phục qua sự giảm hạn chế vận động khớp, giảm nhiệt độ bàn chân, đường kính khớp, giảm thể tích cẳng chân, giảm tổn thương cấu trúc sụn khớp, giảm lượng WBC, các loại bạch cầu lympho, bạch cầu mono, bạch cầu hạt, RF, CRP trong máu. Chiết xuất ethanol vỏ quả AS liều 400 mg/kg thể trọng có hiệu quả tốt nhất trong phòng và điều trị RA.

### LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin cảm ơn các đồng nghiệp và cộng sự từ Khoa Huyết học và Sinh hóa, Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện 175 Thành phố Hồ Chí Minh, Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh, Khoa Ngoại xương khớp Bệnh viện Chấn thương chỉnh hình Thành phố Hồ Chí Minh, Phòng Thí nghiệm Công nghệ Động vật Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ chúng tôi trong dự án này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hemalathal K. et al. Anti-inflammatory activity of *Annona squamosa* Linn. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 2009, vol. 2 (1), pp. 17-20.
2. Rajsekhar Saha. Pharmacognosy and pharmacology of *Annona squamosa*: A review. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2011, vol. 2, pp. 1183-1189.
3. Gurion R., Lehman T.J.A., Moorthy L.N. Systemic arthritis in children: a review of clinical presentation and treatment. *International Journal of Inflammation*, 2011, vol. 20 (12), pp. 1-16.
4. Nguyễn Sào Trung và cộng sự. Bài giảng lý thuyết giải phẫu bệnh. Bộ môn giải phẫu bệnh, Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Tp. Hồ Chí Minh, 2011.
5. Schurgers E., Billiau A., Matthys P. Collagen-Induced Arthritis as an Animal Model for Rheumatoid Arthritis: Focus on Interferon- $\gamma$ . *Journal of Interferon & Cytokine*, 2011, vol. 31 (12), pp. 917-926.
6. Leonaviciene L., Vasiliauskas A., Bradūnaitė R., Vaitkiene D., Zabulyte D., Normantiene T., Lukosius A., Jonauskiene I. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of herbal preparation EM 1201 in adjuvant arthritic rats. *ScienceDirect Medicima*, 2015, vol. 51, pp. 368-377.
7. Arvind C., Bichile L., Rajadhyaksha A., Gadgil D., Maroli S., Goregaonkar A., Dhaon B. Randomized double-blind clinical drug trials of meloxicam in rheumatoid arthritis and osteoarthritis knees: an Indian experience. *APLAR Journal of Rheumatology*, 2004, vol. 7 (2), pp. 108-116.
8. Kwon Y.B. et al. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*, 2001, vol. 90, pp. 271-280.
9. Jae D. L., Su Y. K., Tae W. K., Sang H. L., Hyung I. Y., Doo I. L., Yun H. L. Anti-inflammatory effect of bee venom on type II collagen-induced arthritis. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2004, vol. 32 (3), pp. 361-367.
10. Cấn Văn Mão, Nguyễn Thị Hoa, Lê Hữu Thọ, Nguyễn Trung Nhân, Nguyễn Xuân Hải, Đỗ Văn Nhật Trường, Nguyễn Thị Thanh Mai. Đánh giá tác dụng chống viêm, giảm đau của nọc ong trên chuột được gây mô hình viêm khớp. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 2016, số 19, trang 64-70.
11. Gate S., Bandawane D., Beautikumari S., Patel A. Tannin rich fraction of *Punica granatum* Linn leaves ameliorates Freund/s adjuvant induced Arthritis in experimental animals. *Pharmacologia*, 2014, vol. 5 (1), pp. 19-31.
12. Lingling S., Pingtao W., Junhao G., Guang D. Anti-arthritic activity of ethanol extract of *Fagopyrum cymosum* with adjuvant-induced arthritis in rats. *Pharmaceutical Biology*, 2013, vol. 51 (6), pp. 783-789.

13. Wenqiang Z., Juan Z., Ming Z., Lin N. Protective effect of Asarum extract in rats with adjuvant arthritis. *Experimental and therapeutic medicine*, 2014, vol. 8, pp.1638-1642.
14. Maliha U., Zaigham A., Shumaila S., Nigarish U., Arham S., Shafiq R., Ahsan S. Nyctanthes arbor-tristis Ameliorated FCA-Induced Experimental Arthritis: A Comparative Study among Different Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, vol. 2017, pp. 1-13.
15. Rajsekhar Saha. Pharmacognosy and pharmacology of Annona squamosa: A review. *International Journal Of Pharmacy & Life Sciences*, 2011, vol. 2 (10), pp. 1183-1189 .
16. Sharma A., Sharmab A.K., Chanda T., Khardiya M., Agarwalb S.. Preliminary phytochemical screening of fruit peel extracts of Annona Squamosa Linn. *Journal of Current Pharma Research*, 2013, vol. 4 (1), pp. 1038-1043.
17. Kaladhar S., Duddukuri G.R., Yarla N.S. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities from raw fruit peel crude extracts of Annona Squamosa Linn. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical*, 2015, vol. 4 (1), pp. 1373-1380.
18. Dellaia A., Maricicb I., Kumarb V., Arutyunyanc S., Bouraouia A., Nefzic A. Parallel synthesis and anti-inflammatory activity of cyclic peptides cyclosquamosin D and Met-cherimolacyclopeptide B and their analogs. *Pubmed*, 2010, vol. 20 (19), pp. 5653- 5657.
19. Souza F.T.C., Santos E.R., CruzSilva J., Valentim I.B., Rabelo T.B., Andrade N.R.F., Silva L.K.S. Production of nutritious flour from residue custard apple (*Annona squamosa* L.) for the development of new products. *Hindawi Journal of Food Quality*, 2018, vol. 1, pp. 1-10.
20. Ma C. , Chen Y. , Chen J. , Li X. , Chen Y. A Review on *Annona squamosa* L.: Phytochemicals and Biological Activities. *World Scientific*, 2017, vol. 45, pp. 933-964.
21. Umesh B. J., Vishwas A. B.. Phenolic composition and antioxidant capacity of wine prepared from custard apple (*Annona squamosa* L.) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2014, ISSN 1745-4549, pp. 1-9.
22. Declaration of Helsinki 1975. Recommendations guiding medical doctors in biomedical research involving human subjects, Adopted by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan. (October 1975).
23. Yasunori Omata et al. Group 2 Innate Lymphoid Cells Attenuate Inflammatory Arthritis and Protect from Bone Destruction in Mice. *Cell Reports*, 2018, vol. 24(1), pp. 169-180
24. Bradford D. F., Adeshina A., Michael E., Andrea B.. Animal models of rheumatoid pain: experimental systems and insights. *Arthritis Research & Therapy*, 2017, vol. 19(1460), pp. 1-9
25. Ruckmani A., Vinayak M., Vijayashree R., Arunkumar R., Venugopala R. K., Lakshmipathy P., Madhavi E., Sobita D. Anti-rheumatism activity of ethanolic extract of *Sesamum indicum* seed extract in Freund/s complete adjuvant induced arthritis in Wistar albino rats. *Juornal of Tradition and Complementary Medicine*, 2018, vol. 8(3), pp. 377-386
26. Ekambaram S., Perumal S.S., Subramannian V. Evaluation of antiarthritic activity of *strychnos potatorum* Linn seeds in Freund/s adjuvant induced arthritic rat model. *BMC Complementary Altern. Med.*, 2010, vol. 10, pp. 1472-1482.
27. Zaida Z., Afqah A. R., Ammu K. R., Sui K. C., Huzwah K.. Investigation of the curative effects of palm vitamin E tocotrienols on autoimmune arthritis disease in vivo. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9 (16793), pp. 1-11.
28. Griffioen M.A., Dernetz V.H., Yang G.S., Griffith K.A., S Dorsey.G., Renn C.L. Evaluation of Dynamic Weight Bearing for Measuring Nonevoked Inflammatory Hyperalgesia in Mice. *Nurs Res*, 2015, vol. 64 (2), pp. 81–87.

29. Lahoti A., Kalra B.S., Tekur U. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory activity of fixed dose combination: Non-steroidal anti-inflammatory drugs in experimental animals. *Original research*, 2014, vol. 25 (5), pp. 551-554.
30. Akramas L., Leonavičienė L., Vasiliauskas A., Bradūnaitė R., Vaitkienė D., Zabulytė D., Normantienė T., Lukošius A., Jonauskienė I. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of herbal preparation EM 1201 in adjuvant arthritic Rats. *ScienceDirect Medicina*, 2015, vol. 51, pp. 368-377.
31. Trio P.Z., You S., He X., He J., Sakao K., Hou D.X. Chemopreventive functions and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds. *Food Funct*, 2014, vol. 5 (5), pp. 833-844.
32. Snehalatha U., Anburajan M., Venkatraman B., Menaka M., Baldev R. Evaluation of Rheumatoid Arthritis in Small Animal Model using Thermal Imaging. *International Conference on Signal Processing*, 2016, DOI: 10.1109/ICSCCN.2011.6024658, pp. 315-321
33. Sathishkumar R., Vijayakumar R., Ranjithkumar R., Veerappan C., Ramya P., Dina P., Jagannathan S., Rahul G. P. Effect of *Elaeocarpus sphaericus* in Freund's complete adjuvant (fca) induced rheumatoid arthritis in albino rats. *Indo-Global Research Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, vol. 2(3), pp. 378-382.
34. Maria M., Engeniusz M., Miroslaw K., Maria K. P. Iwona Adjuvant induced disease in rats: clinical findings and morphological and biochemical changes in blood and histological changes in internal organs. *Rheumatology*, 1983, vol. 21, pp. 213-245
35. Tetsuro N., Toshihiko K., Nakao I., Hiroki K., Katsuyuki F., Toru A.. No mixing of granulocytes and other lymphocytes in the inflamed joints of parabiosis mice with collagen-induced arthritis: possible in situ generation. *Immunology*, 2005, vol. 114, pp. 133-138
36. Madhavi G. P., Kilambi P. Anti-arthritic activity of a classical Ayurvedic formulation Vatari Guggulu in rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2016, vol. 6, pp. 389-394
37. Sproston N. R., Ashworth, J. J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in immunology*, 2018, vol. 9, pp. 754-766.
38. Kim K. W., Kim B. M., Moon H. W., Lee S. H., Kim H. R. Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 2015, vol. 17, pp. 41-53
39. Ballou S. P., Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine*, 1992, vol. 4, pp. 361-368
40. Müller L. U., Pap T., Gay R. E., Neidhart M., Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 1, pp. 102-110
41. Schroder A. E., Greiner A., Seyfert C., Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, pp. 221-225.
42. Halldorsdottir H. D., Jonsson T., Thorsteinsson J., Valdimarsson H. A prospective study on the incidence of rheumatoid arthritis among people with persistent increase of rheumatoid factor. *Ann Rheum Dis*, 2000, vol. 59, pp. 149-151.

*Ngày nhận bài: 09/11/2019*

*Ngày chấp nhận đăng: 05/03/2020*